



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

**Estudio de la expresión de genes que participan en modificaciones epigenéticas en
pacientes con periodontitis y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con periodontitis**

TESIS

Para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS (BIOLOGÍA BUCAL)

PRESENTA:

CHRISTIAN ALEJANDRA MANRÍQUEZ PÉREZ

TUTORES:

DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN

Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León

DRA. MARTHA EUGENIA FAJARDO ARAUJO

Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Guanajuato

CD. DE MÉXICO. OCTUBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

Agradecimientos	5
Dedicatoria	6
Índice general		
Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
1. EPIGENÉTICA	14
1.1 Concepto		
1.2 Nucleosomas y Cromatina		
1.3 Mecanismos epigenéticos		
1.3.1 Metilación de DNA		
1.3.2 Modificación de histonas		
1.3.3 Micro RNAs		
2. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS POR ACETILACIÓN DE HISTONAS	22
2.1 Histonas acetiltransferasas		
2.1.1 Histonas acetiltransferasas tipo A		
2.1.2 Inhibidores de histonas acetiltransferasas		

2.2 Histonas desacetilasas

2.2.1 Inhibidor de histonas deacetiltransferasas

3. EPIGENÉTICA Y PERIODONTITIS 26

3.1 Periodontitis

3.2 Clasificación de la periodontitis, workshop 1999.

3.2.1 Periodontitis crónica

3.2.2 Periodontitis agresiva

3.2.3 Enfermedades sistémicas asociadas a periodontitis

3.3 Epidemiología de la periodontitis

3.4 Metilación de DNA en la periodontitis

3.5 Modificación de histonas en la periodontitis

3.5.1 Influencia de los patógenos periodontales en la modificación de la cromatina

3.6 miRNAs en la periodontitis

3.7 Inhibidores de histonas deacetilasas en periodontitis

3.8 Futuro de la epigenética en periodontitis

4. EPIGENÉTICA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2 34

4.1 Diabetes Mellitus tipo 2

4.2 Epidemiología Diabetes Mellitus tipo 2

4.3 Metilación de DNA en Diabetes Mellitus tipo 2

4.4 Modificación de histonas en Diabetes Mellitus tipo 2

4.5 miRNAs en Diabetes Mellitus tipo 2

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
6. JUSTIFICACIÓN	42
7. HIPÓTESIS	43
8. OBJETIVOS	44
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	45
10. MATERIALES Y MÉTODOS	46
10.1 Características del estudio		
10.2 Selección y obtención de las muestras		
10.2.1 Recolección de la información		
10.2.2 Criterios de inclusión		
10.2.3 Criterios de exclusión		
10.2.4 Criterios de eliminación		
10.2.5 Variables dependientes e independientes		
10.3 Obtención del perfil de expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B en los diferentes grupos de pacientes.		
10.3.1 Extracción de RNA total		
10.3.2 Integridad y pureza del RNA		
10.3.3 Purificación de RNA con tratamiento con DNase I		
10.3.4 Síntesis de cDNAs		
10.3.5 Diseño de primers		
10.3.5.1 Diseño de primers mediante software RealTime Design™		
10.3.5.2 Evaluación de primers mediante OligoEvaluator™		

10.3.5.3 Especificidad de los primers diseñados

10.3.5.4 Diseño de primers específicos para los genes KAT2A,
KAT2B Y KAT5

10.3.5.5 Prueba de primers

10.3.5.6 PCR tiempo real

11 RESULTADOS 61

11.1 Selección y obtención de la muestra

11.2 Prueba de especificidad de primers

11.3 Nivel de expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B de los
diferentes grupos de pacientes

11.4 PCR punto final

12 CONSIDERACIONES ÉTICAS 71

13 DISCUSIÓN 72

14 CONCLUSIONES 76

REFERENCIAS 77

ANEXOS 91

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme esa oportunidad de obtener un grado académico más, apostando en mi interés científico.

Al Programa de Doctorado y Maestría en Ciencia Médicas, Odontológicas y de la Salud de la UNAM.

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León por brindarme toda la infraestructura para desempeñarme íntegramente como profesionista y ser humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante la realización de mi proyecto de investigación.

A la comunidad científica en México y en el extranjero aportando en el desarrollo de mi formación científica.

A los responsable de las clínicas odontológicas de la Escuela Nacional de Estudios Superiores de León, Guanajuato, a la Dra. Paola Campos que estaba al pendiente de mi trayectoria, a los alumnos de odontología y sus pacientes candidatos para mi proyecto.

Al Dr. Julio César Vega Arreguín por ser mi tutor en este proyecto, por su apoyo y confianza brindando las herramientas para llevarlo a cabo.

A la Dra. Harumi Shimada Beltrán de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM.

Al Dr. Julio César Amezcua Romero de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM, por su apoyo técnico en la parte experimental y por haber revisado la tesis.

A la Dra. López Marín, Dra. Fernandez Presas, Dra. Mercado Celis y científicos que con su disposición formaron parte de mi revisión de tesis.

Dedicatorias

***A mi familia** quienes siempre están conmigo, mis queridísimos padres que sin ellos no hubiera podido ser, por ser mis grande pilares en todos mis proyectos, a ellos les debo mis éxitos. A mi único hermano Hugo Alberto por su ejemplo y apoyo impulsándome a marcar la diferencia como profesionalista. Y a mis tres hermanas por acompañarme en cada instante de mi vida.*

***Al Dr. Luis Xoca** a quien agradezco gran parte de la solución a mis problemas durante mi proyecto, bonita coincidencia ese día que realizabas tu estancia doctoral en el laboratorio, mil gracias por tu paciencia a pesar de las distancias, por esas sugerencias tan productivas para mi proyecto, por tu experiencia científica y por nunca olvidarte de mi, gracias amigo!*

***A los docentes** en especial a la Dra. Laura Acosta, Dra. Connie Arenas, Dr. Julio Amezcua, que formaron parte de mi desarrollo profesional, compartiendo su experiencia y conocimiento científico.*

***A mis compañeros de aula** por lo aprendido y en especial a quien ahora es mi amiga, Mónica Anaya.*

A la vida, a todos los que hacen ciencia y tecnología con beneficios en pro de la humanidad.

Índice de figuras

Figura 1. Organización del material genético.	15
Figura 2. Diferentes formas de metilación de DNA.	17
Figura 3. Influencia de la acetilación de las histonas en la transcripción de genes.	19
Figura 4. miRNAs	21
Figura 5. Eventos epigenéticos en una lesión periodontal.	26
Figura 6. Procedimiento general para el estudio de los niveles de expresión de los genes.	50
Figura 7. Integridad RNA	52
Figura 8. Software Real Time Design™	55
Figura 9. Software OligoEvaluator™	55
Figura 10. Software PCR Products	56
Figura 11. Prueba de especificidad de primers	64
Figura 12. PCR punto final de los genes KAT5, KAT2A, KAT2B y del gen control GAPDH en los diferentes grupos de estudio.	69

Índice de tablas y gráficas

Tabla 1. Familia de histonas acetiltransferasas (HAT) y sustratos específicos.	23
Tabla 2. Criterios de inclusión.	47
Tabla 3. Criterios de exclusión.	47
Tabla 4. Criterios de eliminación.	48
Tabla 5. Variables dependientes e independientes.	48
Tabla 6. Reactivos para la extracción de RNA con Trizol TM Reagent.	51
Tabla 7. Reactivos para la purificación de RNA con DNase libre de RNasas.	52
Tabla 8. Reactivos para síntesis de cDNA con Super Script TM Reverse Transcriptase.	53
Tabla 9. Diseño de primers específicos.	56
Tabla 10. Reactivos del Kit Taq DNA polymerase de 500 U.	57
Tabla 11. Condiciones de amplificación de cDNAs con Taq polymerase 500 U.	58
Tabla 12. Reactivos para reacciones con maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.	59
Tabla 13. Condiciones de amplificación de DNAs con SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.	60
Tabla 14. Características clínicas de cada grupo de pacientes.	62

Gráfico 1. Niveles de expresión de KAT2A.	66
Gráfico 2. Niveles de expresión de KAT2B.	67
Gráfico 3. Niveles de expresión de KAT5.	68
Gráfico 4. PCR punto final.	70

RESUMEN

Introducción: El estudio de los cambios epigenéticos en diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y periodontitis representa una gran oportunidad para generar conocimiento y crear futuros enfoques terapéuticos. Los mecanismos epigenéticos son modificaciones químicas en el genoma que no afectan la secuencia del DNA, son reversibles, heredables y modifican la expresión génica.

La DM2 se caracteriza por una hiperglucemia causada por un defecto en la acción de la insulina. La DM2 se considera un factor de riesgo en la severidad de la periodontitis favoreciendo el crecimiento de bacterias en el periodonto, lo que aumenta la susceptibilidad a padecer periodontitis acelerando su progresión. Por este motivo, se considera a la periodontitis como la 6ª complicación más común de la DM2.

Tanto la DM2 como la periodontitis presentan cambios, exaltando el sistema inmune (TNF- α , IL-1, IL-6, etc.) que pudieran estar controlados por modificaciones epigenéticas tales como metilación de DNA y modificación de histonas.

Objetivo: Determinar y comparar los niveles de expresión de genes que participan en modificaciones epigenéticas en pacientes con periodontitis y pacientes con DM2 y periodontitis.

Metodología: Se realizaron extracciones de RNA de tejido periodontal de tres grupos de pacientes. Grupo 1: pacientes con DM2 y periodontitis; Grupo 2: pacientes con periodontitis únicamente; Grupo 3: pacientes sanos. Posteriormente, se realizó reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real para el análisis de expresión de genes específicos que participan en modificaciones epigenéticas.

Resultados: Se observó una disminución en la expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B involucrados en la acetilación de histonas, en pacientes con DM2 y periodontitis comparado con el grupo de sanos.

Conclusiones: Los genes KAT5, KAT2A y KAT2B participan en la modificación epigenética de acetilación de histonas disminuyendo la transcripción de genes, por lo tanto, la disminución de la expresión de estos genes sugiere la ocurrencia de una inhibición en la expresión de genes en el tejido periodontal de pacientes con DM2 y periodontitis comparado con pacientes sanos.

ABSTRACT

Introduction: The study of epigenetic changes in diabetes mellitus type 2 (DM2) and periodontitis represents a great opportunity to generate knowledge and creating future therapeutic approaches. The epigenetic mechanisms are chemical modifications in the genome that do not affect the DNA sequence of the inheritable, are reversible, and modify the gene expression.

The DM2 is characterized by hyperglycemia caused by a defect in insulin action. The DM2 is considered a risk factor in the severity of periodontitis favoring the growth of bacteria in the periodontium, which increases the susceptibility to periodontitis, accelerating their progression. For this reason, it is considered that periodontitis is the 6th most common complication of DM2.

The DM2 as the periodontitis changes occur, exalting the immune system (TNF-, IL-1, IL-6, etc.) that may be controlled by epigenetic modifications such as DNA methylation and histone modification.

Objective: Determine and compare the expression levels of genes involved in epigenetic modifications in patients with periodontitis periodontitis and patients with DM2 and periodontitis.

Methodology: Periodontal tissue RNA extractions from three groups of patients were performed, Group 1: patients with DM2 and periodontitis; Group 2: patients with periodontitis only; Group 3: healthy patients. RNA was used to do real-time RT-PCR for gene expression analysis of specific genes involved in epigenetic modifications.

Results: There has been a decrease in the expression of the genes KAT5, KAT2A, KAT2B genes involved in histone acetylation in patients with DM2 and periodontitis compared to the healthy group.

Conclusions: The genes KAT5, KAT2A and KAT2B genes participate in the epigenetic modification of the histone acetylation, decreasing the transcription of genes, therefore, the decrease in the expression of these genes suggests the occurrence of an inhibition in the expression of genes in the periodontal tissue of patients with DM2 and periodontitis with healthy ones.

INTRODUCCIÓN

La epigenética es el estudio de los mecanismos moleculares que repercuten en la alteración de la estructura de la cromatina, involucrando modificaciones covalentes sobre el DNA que regulan la expresión génica sin alterar la secuencia primaria de los genes. Este campo emergente de estudio ha contribuido de manera importante al entendimiento de las interacciones gen-medioambiente (Esteller M. 2008).

La epigenética ha demostrado tener relación con la salud del individuo, en su descendencia y en la evolución de la especie humana, esto hace que sea de suma relevancia conocer los mecanismos implicados y la exploración de su papel en condiciones patológicas (Robles RG. 2012). Su naturaleza reversible abre la puerta no sólo a comprender, sino también a tratar enfermedades de origen poligénico y multifactorial, como la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Fermín I. 2013) y la periodontitis, considerada ésta última la sexta complicación de la DM2 (Wang TF. 2014).

La Federación Internacional de Diabetes (FID) estima que para el año 2035 la Diabetes Mellitus (DM) incrementará su prevalencia a 592 millones de personas con este padecimiento (IDF 2015). Se sabe que de 90-95 % de la población diagnosticada con DM son pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Taylor GW. 2001), la cual es un trastorno metabólico debido al déficit progresivo de secreción de insulina sobre la base de una insulinoresistencia (ADA 2015). A nivel bucodental la DM2 es considerada un factor de riesgo para la periodontitis al favorecer el crecimiento de ciertas especies bacterianas en el periodonto, lo que aumenta la susceptibilidad de la periodontitis al acelerar su progresión, y el impacto de la inflamación periodontal sobre el estado y complicaciones de la DM (Pranckeviciene A. 2014).

La periodontitis es un trastorno patológico desencadenado por la respuesta del huésped contra las bacterias patógenas presentes en la biopelícula dental que ocasiona inflamación crónica del periodonto y se caracteriza en su forma avanzada por la pérdida de la fijación de tejidos blandos y consecuentemente

por una pérdida progresiva de hueso alveolar que conlleva a la pérdida prematura de órganos dentales (Wang, 2014). Así mismo, se ha reportado que la prevalencia y severidad de la enfermedad periodontal aumenta con la edad y debido a factores como el aspecto socioeconómico (Aljehani YA. 2014). De los diferentes tipos de periodontitis existentes, la periodontitis crónica es la más común. Este tipo de periodontitis tiene una prevalencia significativa alrededor de los 35 años de edad y para su desarrollo requiere de una gingivitis precursora, lo que relaciona el desarrollo de la enfermedad con la presencia de placa bacteriana y cálculo dental, característico de dicha enfermedad periodontal (Igari K. 2014). Las actividades de prevención de la periodontitis están enfocadas en la eliminación de placa bacteriana y sarro, debido a que estos son los principales agentes responsables del desarrollo de la enfermedad (Kim J. 2006). Sin embargo, existen enfermedades sistémicas como la DM2, que exacerbaban clínicamente a la periodontitis. Por ello, se ha mostrado interés en encontrar nuevos biomarcadores genéticos que ayuden a explicar la clínica de estas dos enfermedades (Bascones-Martínez A. 2015).

La aplicación de conocimientos moleculares novedosos es una alternativa en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para la reconstrucción de defectos óseos en pacientes diabéticos, tales como el estudio en los cambios del epigenoma generados por factores ambientales y hábitos como alimentación, fumar, infecciones, diabetes etc. (Wang TF. 2014). En los últimos años se han identificado biomarcadores genéticos asociados a la periodontitis, los cuales han impulsado la investigación epigenética con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares de este padecimiento (Lindroth AM. 2013).

Aunado a lo anterior, el estudio de los cambios producidos en el epigenoma podría impactar en la resolución de enfermedades y sus consecuentes complicaciones. En el presente trabajo nos enfocamos en la identificación de cambios en la expresión de los genes KAT2A, KAT5 y KAT2B, los cuales están involucrados en la modificación epigenética de las histonas, particularmente en

su acetilación, lo cual regula la transcripción de otros genes al descompactar la cromatina (Imai K. 2011). El análisis de la expresión de estos genes en pacientes con DM2 y periodontitis podría proporcionar biomarcadores útiles para estudios encaminados a la detección temprana de estas enfermedades, o bien, podría generar conocimiento básico novedoso útil para el diseño de tratamientos futuros y prevención (Razzouk S. 2013).

1 EPIGENÉTICA

1.1 CONCEPTO

La epigenética es el estudio de los mecanismos moleculares que repercuten en la alteración de la estructura de la cromatina, involucrando modificaciones covalentes sobre el DNA que regulan la expresión génica sin alterar la secuencia primaria de los genes. Este campo emergente de estudio ha contribuido de manera importante al entendimiento de las interacciones gen-medioambiente (Esteller M. 2008).

1.2 NUCLEOSOMAS Y CROMATINA

En las células eucariotas, la cromatina es la forma estructural empaquetada del DNA dentro del núcleo y está compuesta, además de DNA, de proteínas. Por su parte, los nucleosomas que conforman a la cromatina están compuestos de un octámero de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3, H4) y aproximadamente 147 pares de bases nitrogenadas del DNA (Fig. 1).

La estructura de las histonas es predominantemente globular, excepto sus colas amino-terminales (N-terminales), las cual sobresalen de su forma estructural. Una característica particular de las histonas es la variedad de modificaciones covalentes postraduccionales que sus residuos aminoácidos pueden tener. Las modificaciones más estudiadas son: acetilación, metilación y fosforilación. Estas modificaciones se han encontrado asociadas a los dos tipos de cromatina que existen en el genoma (heterocromatina inactiva y eucromatina activa) y su actividad está relacionada con la transcripción de genes (Kouzarides T. 2007).

La heterocromatina se caracteriza por ser una estructura de cromatina más compacta que se encuentra en la periferia de los cromosomas, les confiere protección y participación en la separación de los cromosomas en mitosis. En mamíferos, el silenciamiento (inhibición de la expresión de genes) de la heterocromatina está asociado con niveles bajos de acetilación y altos de metilación. Por otra parte, la eucromatina, forma estructural de la cromatina caracterizada por estar ligeramente compactada, representa una gran proporción del genoma y es flexible debido a que los genes que contiene pueden estar en un estado transcripcional activo o inactivo (Zhang Y. 2001).

En el estado transcripcional inactivo, los bajos niveles de acetilación, metilación y fosforilación de las histonas impiden el acceso de los factores de transcripción a los genes y de ésta manera evitan su expresión. (Bernstein BE. 2005). Así mismo, se ha reportado que la metilación de la histona 3 en el residuo de lisina 7 (H3K7) está implicada en el silenciamiento de cromatina (inhibición de la expresión de genes) mientras que la metilación de la histona 4 en residuo de lisina 4 (H3K4) participa en la activación (expresión de genes) de la cromatina. Entre las modificaciones de las histonas también se incluye la metilación (Kacem S. 2009).

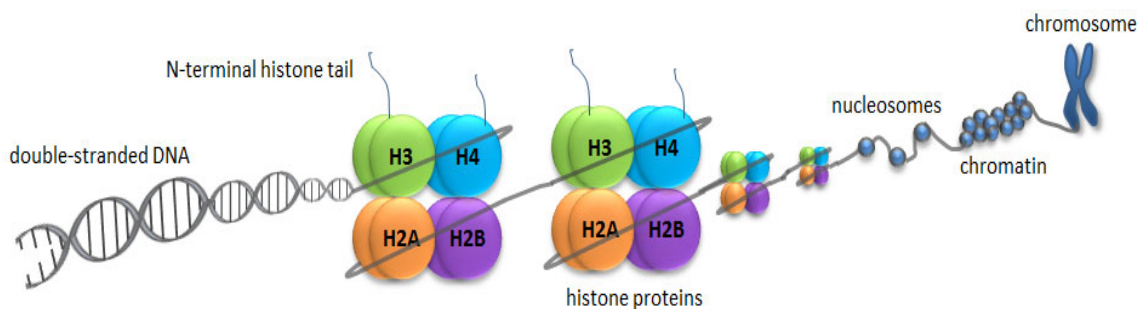


Figura 1. Organización del material genético. Los nucleosomas son estructuras que contienen DNA

enrollado alrededor de cuatro pares de proteínas histonas H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas H3 y H4 presentan colas de residuos aminoácidos libres en sus extremos N-terminales (imagen tomada de: <http://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/>)

1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Los mecanismos epigenéticos afectan la expresión de genes y responden a diferentes factores ambientales y hábitos, tales como la exposición a sustancias químicas, hábitos alimenticios, padecimiento de enfermedades, infecciones y en general el estilo de vida de cada individuo. Además de controlar el desarrollo de fenotipos específicos y la salud, estos mecanismos se caracterizan por ser alteraciones químicas en el DNA que se sabe son heredables o adquiridas durante la vida de los organismos (Barros SP. 2009). Los mecanismos epigenéticos están directamente relacionados con la transformación molecular y remodelación de la cromatina y se agrupan en tres categorías principales: metilación de DNA, modificación postraduccional de histonas y micro RNAs. Estos mecanismos no se excluyen mutuamente entre sí y pueden interactuar entre sí de manera positiva o negativa (Portela A. 2010).

1.3.1 Metilación de DNA

La metilación de DNA es el mecanismo epigenético más estudiado en humanos y ocurre exclusivamente en los dinucleótidos CpG del genoma que tienden a agruparse en regiones llamadas islas CpG, y se caracteriza por poseer 200 bases con un contenido de al menos el 50% de citosinas (C) y guaninas (G). Los dinucleótidos suelen ser bastante raros en genomas de mamíferos (1%), sin embargo, aproximadamente el 60% de los promotores de genes humanos están asociados con las islas CpG (Straussman R. 2009).

En general, la metilación de las islas CpG está asociada con el silenciamiento de genes debido a la agregación de grupos químicos metilo a las regiones CpG. También la metilación del DNA inhibe directamente la transcripción al excluir el reclutamiento de proteínas de unión que van a los sitios de origen de replicación en el DNA (Esteller M. 2007). Sin embargo, la metilación del DNA no se asocia con frecuencia con la activación transcripcional, sin embargo, se ha propuesto que podría estar relacionada con la eficacia de la elongación y en la prevención

de falsos iniciadores durante la transcripción (Thompson JP. 2010). La metilación del DNA no está solamente ligada a la regulación de la transcripción. Una fracción significativa de metilación en CpG se ha encontrado en elementos repetidos de DNA. Y se ha detectado que esta metilación es necesaria para proteger la integridad de los cromosomas, por lo cual se encuentra muy conservada para prevenir reacciones de fragmentación que causan la inestabilidad cromosomal, translocaciones y ruptura de genes (Esteller M. 2007).

La regulación de la metilación de DNA es mediada por una familia de enzimas llamadas metiltransferasas (DNMT) que catalizan la transferencia de grupos metilo desde la S-adenosil metionina. En mamíferos, hasta el momento, se han reportado 5 tipos de DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, de las cuales solo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b poseen actividad metiltransferasas (Esteller M. 2007).

Una de las cuestiones más intrigantes sobre la metilación del DNA, es como este mecanismo es dirigido a secuencias específicas en el genoma. Varios mecanismos se han propuesto, principalmente basados en interacciones de las DNMTs con otros factores epigenéticos tales como la modificación de histonas (Esteve PO. 2009).

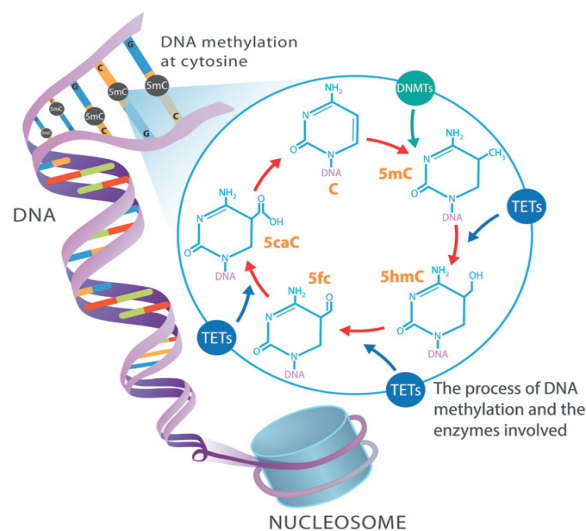


Figura 2. Diferentes formas de metilación de DNA en la que se observa

enzimas que llevan acabo la metilación en la citosinas (imagen tomada de: Larsson L. 2015).

1.3.2 Modificación de histonas

Las histonas están formadas por dos dominios: una región central plegada, que interactúa con el DNA, formada por una hélice- α larga, flanqueada por dos hélices- α cortas, y un dominio N-terminal poco estructurado de 15 a 30 residuos, denominados “colas de histonas”, donde se llevan a cabo diversas modificaciones postraduccionales que afectan a la estructura y función de la cromatina (Sarma K. 2005).

Se han reportado al menos ocho tipos de modificaciones epigenéticas en las histonas, de las cuales las más estudiadas han sido la acetilación, la metilación y la fosforilación. La metilación de histonas puede ser mono, di o tri-metil lisina, o mono-di-metil arginina (Shilatifard A. 2006). Las diferentes modificaciones, así como la combinación entre ellas, proporcionan un enorme potencial de respuestas funcionales, ya que son dinámicas y cambian rápidamente en respuesta a diversos estímulos celulares (Li B. 2007).

Las consecuencias funcionales de las modificaciones de histonas se pueden dividir en dos categorías: el establecimiento del estado global de la cromatina y la transcripción génica modificada por histonas, en donde el grado de condensación de la cromatina está asociado con niveles bajos de acetilación y niveles elevados de metilación en H3K9, H3K27 y H4K20. La metilación de H3K9 está implicada en el silenciamiento de la heterocromatina. En cambio, las regiones de la eucromatina presentan mayor flexibilidad funcional, los genes pueden estar activados o permanecer inactivos y el DNA puede ser desempaquetado para la replicación o la reparación. En general, los genes transcripcionalmente inactivos presentan bajos niveles de acetilación, metilación y fosforilación, mientras que la eucromatina transcripcionalmente activa, tiene niveles elevados de acetilación (Kouzarides T. 2007) (Figura 3).

Por otra parte, la metilación de histonas es estable en comparación con la acetilación, ocurre en las cadenas laterales de lisinas y argininas de las proteínas y está catalizada por enzimas específicas que se agrupan en varias clases: a) histona metiltransferasas específicas de lisina, las cuales contienen el dominio SET y son responsables de las metilaciones en las histonas H3 (residuos K4, K9, K27, K36 y H4K20); b) lisina metil-transferasas sin dominio SET, las cuales metilan a H3K79 y c) arginina metil-transferasas que metilan distintos residuos de arginina en las histonas H3 y H4 (Bannister AJ. 2005).

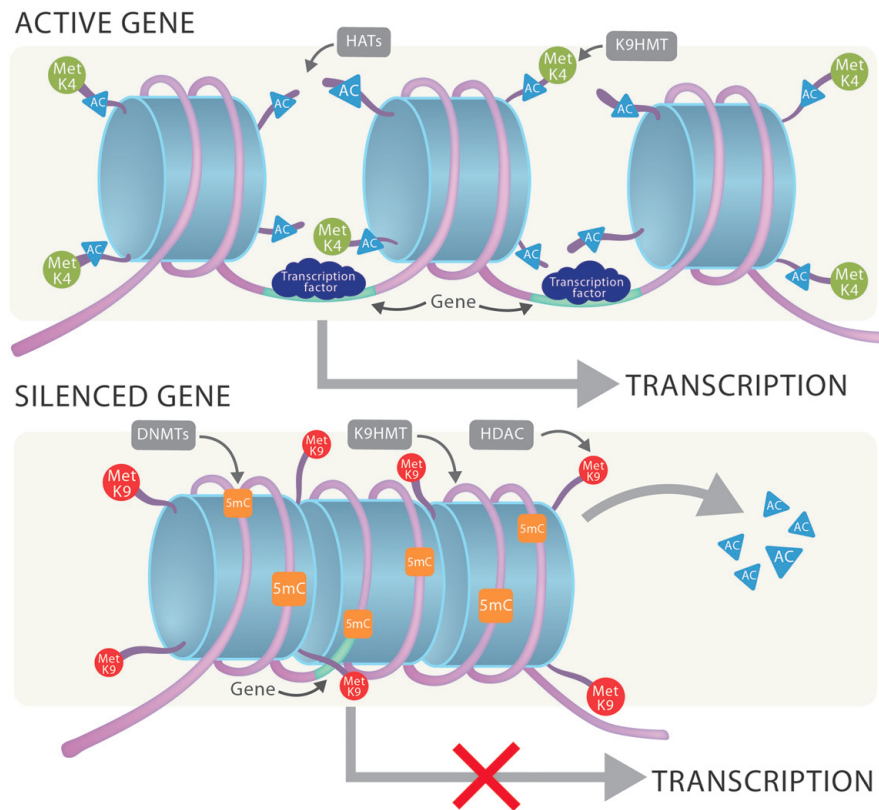


Figura 3. Influencia de la acetilación de las histonas en la transcripción de genes: Histonas acetiltransferasas (HATs) colocan grupos acetilos a la molécula de DNA activando el gen y las Histona desacetilasas (HDAC) retiran grupos acetilos de la molécula de DNA silenciando el gen. (imagen tomada de: Larsson L. 2015).

1.3.3 Micro RNAs

Los microRNAs (miRNAs) se descubrieron originalmente en *Caenorhabditis elegans* y posteriormente se encontraron en otras células eucariotas, incluyendo las humanas. Son RNAs monocadena de 22 nucleótidos de longitud en promedio, generados por enzimas RNAsas tipo III (Perron MP. 2008). Sin embargo, su biogénesis está mediada por la RNA polimerasa II (Pol II) (Houbaviy HB. 2005).

Las modificaciones epigenéticas por miRNAs están asociadas con la represión transcripcional. Los miRNAs se han considerado como los principales reguladores de familias génicas en células eucariotas. Los miRNAs incluyen a los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) que están implicados en procesos nucleares tales como la regulación de transposones, la formación de heterocromatina, la regulación génica y la estabilidad del genoma. (Stephane E. 2013).

Los miRNAs actúan como predictores de la actividad de aproximadamente el 30% de los genes que codifican para proteína y también en la regulación de procesos celulares, y sus funciones se encuentran conservadas a lo largo de la evolución (Filipowicz W. 2008).

Además de la influencia de los miRNAs en la evolución y en la estabilidad de muchos RNAs mensajeros de genes que codifican para proteínas, también estos miRNAs tienen un impacto sobre el proteoma, regulando cargas que afectan la producción de la traducción (Figura 4) (Daehyun B. 2008).

En seres humanos se han encontrado 326 genes que codifican para miRNAs, de los cuales se sabe que podrían estar implicados en el control de la expresión de entre el 20-30% de los genes. Así mismo, se ha reportado que un solo miRNA puede unirse y regular a diversos mRNAs. En estudios con células Hela se ha observado que cientos de miRNAs se modulan en los tumores y podrían estar directamente implicados en este tipo de patología así como en algunas otras (Bartel DP. 2009).

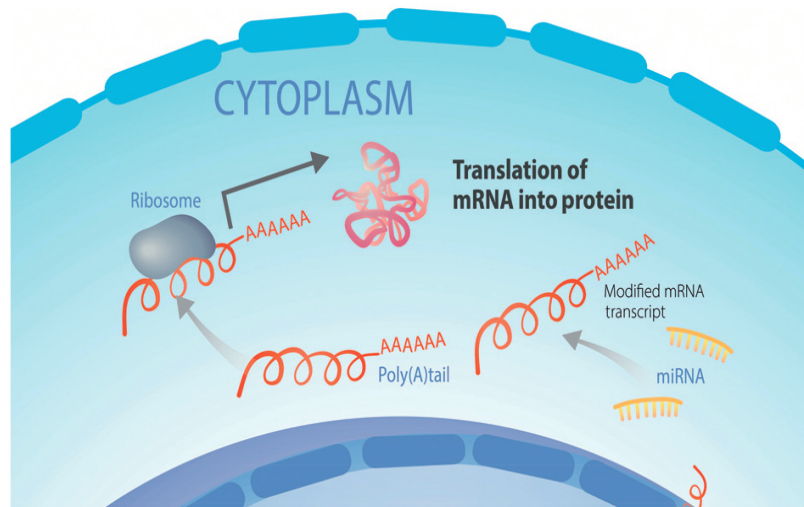


Figura 4. Modificación de RNA mensajero (mRNA) por miRNA inhibiendo la producción de la traducción (imagen tomada de: Larsson L. 2015).

2. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS POR ACETILACIÓN DE HISTONAS

Las distintas modificaciones de las histonas actúan de forma combinada para formar la estructura de las histonas. Las histonas son los efectores que inician respuestas biológicas como activación o represión de la transcripción y condensación cromosómica (Taverna SD. 2007).

2.1 Histonas acetiltransferasas

La acetilación de histonas a cargo de las histonas acetiltransferasas (HATs) está dada por la transferencia del grupo acetilo desde la acetil coenzima A al grupo amino de la lisina en las histonas. Las HATs se clasifican en dos grupos de acuerdo a su localización celular. Las HATs tipo A son nucleares, mientras que las HATs tipo B se localizan en el citoplasma para acetilar histonas recién sintetizadas. La diferencia entre las tipo A y las tipo B, radica en que las tipo B no tienen influencia directa sobre la transcripción (Kepple BR. 2008).

Las HATs se agrupan en distintas familias como GNAT, MYST y CBP/p300 (Allis CD. 2007). Los miembros de la familia GNAT (Gcn5/PCAF) funcionan como coactivadores de distintos activadores de la transcripción, contienen un dominio acetil-transferasa y un bromo-dominio, por el que se unen a los residuos de lisina de las histonas. Este fue el primer dominio de unión a histonas caracterizado estructuralmente (Taverna SD. 2007). La familia MYST es la más grande, diversa y menos caracterizada, no obstante, ha sido relacionada con el silenciamiento transcripcional. La familia CBP/p300 también se ha estudiado extensamente e incluye reguladores globales de la transcripción. Las HATs, a través de su bromo-dominio y otras regiones, median las interacciones proteína-proteína. Varios miembros de esta familia se ha reportado que son alterados por translocaciones cromosómicas en diversos procesos malignos (Beverley M. 2015).

2.1.1 Histonas acetiltransferasas tipo A

Las HATs tipo A son enzimas que se localizan en el núcleo, tienen influencia directa con la transcripción, y pueden agruparse en 5 familias diferentes: GNAT

(GCN5, control nuclear general -5; PCAF, relacionada con la PI transferasas N-acetilo); MYST (MOZ humana (proteína dedo de zinc de leucemia monocítica), Ybf2 de levadura y TIP60 de mamíferos); p300/CBP (proteína de unión a p300/proteína de unión a CREB); coactivadores de receptor nuclear y factor de transcripción general (Tabla 1)(Kepple BR. 2008).

Tabla 1. Familia de histonas acetiltransferasas (HAT) y sustratos específicos.

Familias de Histonas acetiltransferasas (HAT) y sustratos específicos	
HAT's	Sustrato específico de la histona
<i>Familia GNAT</i>	
GNC5	H2B; H3-K9, -K14, -K18, -K23, -K27; H4-K8, -K16
PCAF	H3-K14; H4-K8
<i>Familia MYST</i>	
TIP60	H2A-K5; H3-K14; H4-K5, -K8, -K12
MOZ	H3; H4
<i>Familia p300/CBP</i>	
p300	H2A-K5; H2B-K12, -K15, -K20; H3-K14, -K18, -K23; H4-K5, -K8, -K12
CBP	H2A-K5; H2B-K12, -K15, -K20; H3-K14,

	-K18, -K23; H4-K5, -K8
<i>Coactivadores de Receptor Nuclear</i>	
AIB1	H3; H4
<i>Factor de Transcripción General</i>	
TAFII250	H3; H4

(Tabla tomada de: Kepple BR. 2008)

Se ha reportado que los genes que codifican para HATs se encuentran mutados y/o los niveles de expresión de sus proteínas codificadas se alteran en muchas enfermedades, especialmente en diversos tipos de cánceres. Algunas HATs, tales como p300 y CBP, se ha mostrado que actúan como supresores de tumores y como cofactores transcripcionales de una variedad de oncoproteínas (p53, pRB, Myb, Jun, Fos).

2.1.2 Inhibidores de histonas acetiltransferasas

En diversos procesos patológicos se ha observado la existencia de inhibidores de HAT (iHAT). Los primeros inhibidores se obtuvieron de conjugados de la poliamida-CoA reductasa los cuales inhibieron la actividad de transferasa de acetilos en extractos de células (Lau OD. 2000).

Las HATs también contribuyen con los niveles globales de modificación de las histonas mediante la acetilación de proteínas no histonas. Se ha demostrado que p300 y PCAF acetilan a reguladores transcripcionales, supresores tumorales, reguladores de ciclo celular y a proteínas tales como p53, 073, E2F1, c-Jun, MyoD, Rb y Tat del VIH, entre otras. Al igual que la modificación

sobre las colas amino-terminales de las histonas, la acetilación de proteínas no histonas, podría predecir estados de enfermedad (Roth SY. 2001).

2.2 Histonas deacetilasas

Las histonas deacetilasas (HDAC) son enzimas que remueven los grupos acetilo de las moléculas de lisina, de las histonas. El resultado de retirar los grupos acetilos de las histonas es la descompactación de la estructura de la cromatina, provocando la represión de los genes. Existen varias familias de histonas deacetilasas (HDAC): Clase I (HDAC 1,2,3 y 8), clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10), clase III NAD-dependiente de la familia SIRT (sir-tuinas) y clases IV (HDAC11) (Martínez-Iglesias, O. 2008).

Las HDAC de clase I son las histona-deacetilasas más conocidas, las cuales son ubicuas y presentan localización nuclear. Tienen una elevada homología estructural y contienen zinc en el sitio activo, esencial para su actividad. Están presentes en numerosos complejos de represión junto con co-represores como NcoR, SMRT, MEF, MeCP2, Sin3A, etc., que son atraídos a regiones específicas de la cromatina para reprimir la expresión génica. Los niveles relativos de acetilación de histonas están determinados por las actividades enzimáticas contrapuestas de las HATs y las HDACs, y el equilibrio controlado de ambas actividades es esencial para la proliferación celular normal (Zhou Y. 2014).

2.2.1 Inhibidor de histonas deacetiltransferasas

Los inhibidores de las HDAC (iHDAC) se ha probado interrumpen el crecimiento del ciclo celular (G1 o G2 / M), en la diferenciación y la apoptosis. Por ejemplo en el gen P21, que regula positivamente de manera independiente p53 en respuesta a los inhibidores de HDAC, dicha regulación positiva es parcialmente el resultado del aumento de la acetilación de las histonas H3 y H4, cerca del promotor de p21, algunos de estos inhibidores de HDAC son Butirato y tricostatina A, los cuales pueden causar activación o represión transcripcional.

3.- EPIGENÉTICA Y PERIODONTITIS

Las bases moleculares que modifican el epigenoma son importantes para la comprensión de los riesgos que se sabe modifican la respuesta inflamatoria, tales como obesidad, diabetes, tabaquismo y envejecimiento, considerados todos factores de riesgo de la enfermedad periodontal (Wilson AG. 2008) (Figura 5).

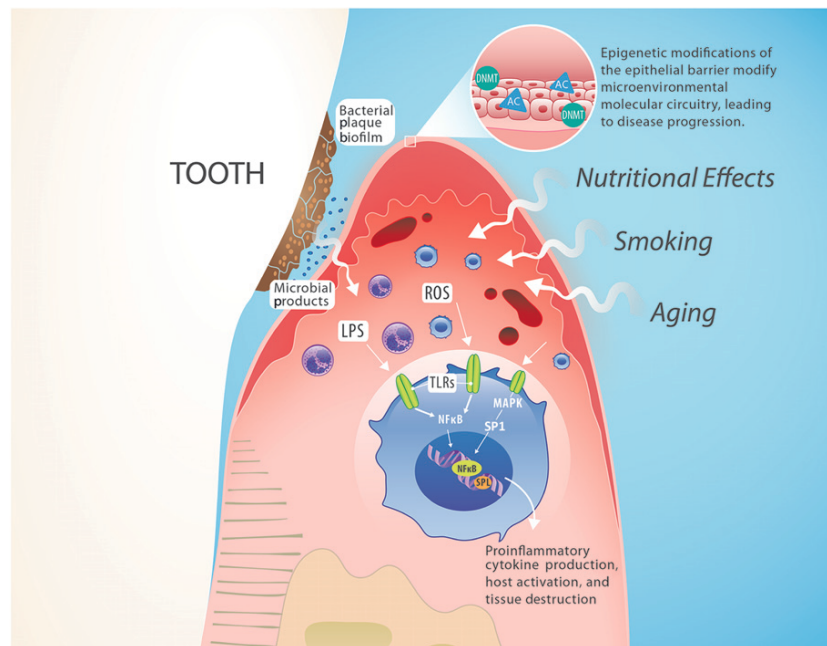


Figura 5. Eventos epigenéticos en una lesión periodontal debido a la modificación del microambiente por bacterias y activación de citocinas proinflamatorias. ROS = especies reactivas del oxígeno; AC = acetilasa; SP1 = factor de transcripción; LPS = lipolisacaridos; TLRs = receptores tipo Toll; MAPK = proteínas quinasas activadas por mitógenos; DNMT = DNA metiltransferasa. (imagen tomada de: Larsson L. 2015).

3.1 Periodontitis

La periodontitis es un trastorno patológico desencadenado por la respuesta del huésped contra las bacterias patógenas presentes en la biopelícula dental, la cual se considera como una infección local que provoca una respuesta inflamatoria sistémica leve e inflamación crónica que afecta el periodonto. En su forma crónica, la periodontitis se caracteriza por la pérdida de la fijación de

tejidos blandos y consecuentemente por una pérdida ósea alveolar que ocasiona la pérdida prematura de órganos dentales (Lindhe J. 2009). La pérdida ósea alveolar que se presenta se debe a la persistencia de la periodontitis, enfermedad condicionada y mediada por la infección crónica modulada y por distintos factores genéticos y ambientales. Su patogenia polimicrobiana inicia el proceso inflamatorio donde una red de citocinas secretadas conducen a la activación de linfocitos y al desarrollo de las lesiones periodontales causado por la desregulación de moléculas liberadas por células específicas como la interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF), citocinas proinflamatorias que estimulan la inducción de moléculas de adhesión y otros mediadores que facilitan y amplifican la respuesta inflamatoria, estimulando las metaloproteinasas de la matriz y pérdida ósea. Esta pérdida ósea se evidencia por la exagerada respuesta del huésped a patógenos periodontales ocasionada por la producción excesiva de IL-1 y TNF (Esteller M. 2008). Finalmente, los factores secretados son los involucrados en la regulación y mantenimiento del equilibrio del tejido óseo, provocando una alteración en la remodelación del hueso alveolar. Así mismo, se ha mostrado que una mayor actividad de osteoclastos sin un aumento en la formación de hueso alveolar consecuentemente produce la pérdida del mismo (Di Benedetto A. 2013).

El hueso alveolar es uno de los tejidos de soporte del diente que corresponde a la porción de los maxilares que contienen alvéolos donde se alojan las raíces de los órganos dentales dándoles rigidez y estabilidad. Los procesos alveolares adquieren su arquitectura cuando los dientes emergen y adoptan una estructura odonto-dependiente. El tejido óseo que los conforma y les da las características de rigidez, dureza (60% sustancias minerales), elasticidad y resistencia a fracturas (20% agua y 20% componentes orgánicos), la sensibilidad a las presiones y las fuerzas tensionadas, actúa como estímulo para su formación (90% matriz orgánica colágeno tipo I, III y V y 10% no colágenas). Las células que coordinan la formación, mantenimiento y remodelado el tejido óseo son las osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. El desequilibrio del contenido celular en dichas células provoca el deterioro en su

arquitectura y densidad ósea provocando la pérdida ósea alveolar. La existencia de pérdida ósea alveolar es una de los principales elementos para el diagnóstico de periodontitis (Lindhe J. 2009).

3.2 Clasificación de la periodontitis, workshop 1999.

El diagnóstico de la enfermedad periodontal se hace de acuerdo a la clasificación realizada por científicos y odontólogos de las áreas de periodoncia y relacionadas y aceptada por la Asociación Americana de Periodoncia (Kassebaum NJ. 2014). De acuerdo al sistema de clasificación de enfermedades periodontales la periodontitis se puede clasificar como periodontitis crónica o agresiva y localizada (\leq del 30% de sitio afectados) o generalizada ($>$ del 30% de sitios afectados) de acuerdo al número de sitios afectados. La periodontitis se considera tradicionalmente como leve cuando la pérdida de hueso está en el tercio coronal de la raíz; moderada, cuando la pérdida de hueso está en el tercio medio de la raíz y severa cuando está en el tercio apical de la longitud de la raíz. La gravedad de la periodontitis también se basa en la pérdida clínica de fijación (CAL): Leve= 1-2 mm; Moderada= 3-4 mm y Severa= 5mm CAL (Armitage AC. 2004).

3.2.1 Periodontitis crónica

La periodontitis crónica es una de las formas más frecuentes de periodontitis. Se caracteriza por la inflamación interna de las estructuras de soporte de los dientes, su unión progresiva y la pérdida ósea, además de la formación de bolsas y/o recesión gingival. La prevalencia y la gravedad de la enfermedad aumenta con la edad afectando un número variable de dientes y la progresión de la misma (Highfield J. 2009).

La periodontitis crónica es frecuente en adultos a partir de los 35 años, pero puede ocurrir en adolescentes e incluso en niños. La cantidad de destrucción

ósea es debido a la presencia de factores locales como el cálculo subgingival o iatrogenias, factores sistémicos (diabetes, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y factores ambientales como el tabaquismo y el estrés emocional (Highfield J. 2009).

3.2.2 Periodontitis agresiva

La periodontitis agresiva, en sus formas tanto localizada como generalizada, se caracteriza por su rápida progresión, su ocurrencia en pacientes clínicamente sanos, por la identificación de una pérdida de inserción rápida, por destrucción ósea y por una predisposición genética. Las características secundarias, consideradas generales pero no universales, son: la cantidad de depósito microbiana incompatible con la gravedad de la destrucción del tejido periodontal; proporciones elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; elevadas poblaciones de *Porphyromonas gingivalis*; anomalías en fagocitos; hiper-respuesta de macrófagos incluyendo niveles elevados de prostaglandina E2 (PGE2) e Interleucina 1 β (IL-1 β); progresión de la pérdida de inserción; afectación mayoritaria de personas menores de 30 años de edad; una pobre respuesta de anticuerpos séricos a agentes infecciosos; pronunciada naturaleza episódica de la destrucción de la inserción y del hueso alveolar; pérdida generaliza de inserción interproximal; y afectación de por lo menos tres dientes permanentes excluyendo a los primeros molares e incisivos. Los factores que intensifican el riesgo de todos los tipos periodontales son: tabaquismo, estrés, fármacos y/u hormonas sexuales (Highfield J. 2009).

3.2.3 Enfermedades sistémicas asociadas a periodontitis

Existen enfermedades sistémicas en las cuales la enfermedad periodontal es una manifestación del proceso de la enfermedad o del aumento en el progreso de la misma. Entre estas enfermedades se encuentran trastornos hematológicos tales como neutropenia adquirida y leucemia; diversos trastornos genéticos como neutropenia familiar y cíclica, síndrome de Down, síndrome de

deficiencia de adhesión leucocitaria, síndrome de Papillon-Lefèvre, síndrome de Chediak-Higashi, síndromes de histiocitosis, hipofosfatasa, VIH y diabetes (Highfield J. 2009).

3.3 Epidemiología de la periodontitis

De acuerdo con el Global Burden of Disease Study (2010) la periodontitis severa (PS) es la 6ª condición más frecuente en el mundo con un 10,8% o 743 millones de personas. En el 2010 la prevalencia de PS era del 11,2%, sin embargo, en países como Chile, Brasil, Kenia, Indonesia, Australia y Grecia la prevalencia de PS fue significativamente más alta en comparación con la media mundial. Por otra parte, la prevalencia de la enfermedad aumenta progresivamente con la edad, mostrando un aumento significativo entre la tercera y cuarta década de la vida con una mayor incidencia alrededor de los 38 años de edad. Aunado a lo anterior, no existen diferencias significativas en la prevalencia e incidencia mundial de PS entre hombres y mujeres (Kassebaum NJ. 2014).

3.4 Metilación de DNA en periodontitis

En la periodontitis, las modificaciones epigenéticas durante la inflamación se producen localmente en el área de interacción de la placa bacteriana con el periodonto de los dientes. A nivel epigenómico, se han mostrado diferencias entre sitios periodontales inflamados y no inflamados (Barros SP. 2014). Se han observado diferentes patrones de metilación asociados con las vías de regulación de la diferenciación celular, con apoptosis, con la señalización mediada por lipopolisacáridos (LPS), y con oncogénesis y adhesión celular (Andia DC. 2010).

Estudios sobre el proceso de metilación de DNA hechos en células inflamatorias de periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA), han mostrado que particularmente en PA ocurre una hipometilación del promotor de IL-8 en las células epiteliales orales en comparación con pacientes sanos (Andia 2010). Por otra parte, en PC se ha observado una hipermetilación en el

gen oxígeno (COX-2), que produce prostaglandinas que promueven la inflamación y el dolor (Zhang S. 2010). Igualmente en PC se observó una hipometilación y aumento de expresión de IFN- γ , sin embargo, no es claro si se vincula a la etiología de la periodontitis o solo indica la consecuencia de la activación de metiltransferasas (DNMTs) por la inflamación crónica persistente (Zhang S. 2010). También se observó una hipermetilación en el estudio de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en pacientes con PC (Zhang S. 2013) y una hipermetilación en el promotor de IL-6, tanto en pacientes con PC y pacientes sanos, pero sin embargo, los resultados mostraron que la expresión es más evidente en pacientes con PC (Stefani FA. 2013).

3.5 Modificación de histonas en la periodontitis

La modificación de histonas descompacta el estado de la cromatina y a su vez repercute en la transcripción de genes, es por ello que la modificación de histonas ha resultado ser de gran interés en el estudio de la periodontitis. Existen escasos estudios en la literatura, sin embargo, algunos estudios que se han realizado en sujetos con periodontitis han mostrado la importancia de mantener la acetilación de histonas para la expresión de genes relacionados con la osteoclastogénesis que participan en la prevención de pérdida ósea (Cantley MD. 2011). Por otro lado, se ha demostrado que las modificaciones en histonas también influyen en la respuesta inmune, ya que se ha detectado una disminución en la expresión de una citosina pro-inflamatoria IL-10 (Larsson L. 2012).

3.5.1 Influencia de los patógenos periodontales en la modificación de la cromatina

Estudios realizados en *Treponema denticola*, que es una bacteria periodontopatógena mostraron que son capaces de inducir una disminución en el promotor de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) en el ligamento periodontal (Miao D. 2014). *Porphyromonas gingivalis* es capaz de producir niveles de ácido butírico, que tiene la capacidad de inhibir las HDAC, lo que resulta en un aumento de la acetilación de histonas (Imai K. 2009); igualmente

la estimulación con *P. gingivalis* que estimulan ligamento periodontal provoca una disminución en la expresión de HDAC1, HDAC2 y DNMT1. Estos resultados indican que la infección bacteriana oral se asocia con cambios en los niveles de metilación y particularmente de la lisina 4 de la histona H3A (H3K4) (de Camargo Pereira G. 2013).

La señalización a través de los receptores tipo Toll (TLRs) en fibroblastos gingivales en respuesta a los LPS de bacterias periodontopatógenas han mostrado una correlación positiva entre la metilación de TLRs y la profundidad del sondeo obtenido (de Faria Amormino SA. 2013).

3.6 miRNAs en la periodontitis

Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA que se unen en la 3'UTR (región 3' no traducida de los genes) de sus mRNA diana para inducir el silenciamiento de genes. Este mecanismo de silenciamiento se ha observado en rutas biológicas implicadas en procesos patológicos, de desarrollo y fisiológicos. En el metabolismo óseo se ha observado la interacción de miRNAs especialmente con el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL), el cual es importante en la osteoclastogénesis inducida. La expresión de RANKL se ha relacionado con varios mediadores de la inflamación, y por tanto, algunos miRNA podrían estar implicados en el mecanismo de regulación de la expresión inflamatoria inducida por RANKL en fibroblastos gingivales o células del ligamento periodontal (Irwandi RA 2016)

3.7 Inhibidores de histonas deacetilasas en periodontitis

Los HDAC se han sugerido como una herramienta potencial en la ingeniería de tejidos debido a que inducen la regeneración ósea (Valinluck V. 2007). La viabilidad de utilizar los iHDACs como butirato de sodio (NaB) para la regeneración periodontal ha sido examinada mediante la evaluación de su efecto en la diferenciación osteogénica de fibroblastos humano y en la respuesta inflamatoria en lipopolisacáridos (LPS) (Kim TI. 2013).

3. 8 Futuro de la epigenética en periodontitis

El conocimiento sobre el papel de la epigenética en el desarrollo de enfermedades periodontales todavía es muy limitado. Algunos estudios destacan la participación de la metilación del DNA y la modificación de histonas en mucosa oral en respuesta a bacterias y procesos inflamatorios. Sin embargo, estos estudios sugieren que la identificación de los factores genéticos y de las variaciones epigenéticas en la periodontitis serán útiles en el desarrollo de intervenciones terapéuticas innovadoras (Gita Ari. 2016).

Los estudios sobre la participación de miRNAs orientados a determinar la inflamación de tejidos y pérdida ósea alveolar son escasos; se requiere estudiar con mayor detalle y profundidad a los miRNAs para determinar su función en los complejos procesos de homeostasis del tejido periodontal, de patogénesis y en la relación con otras enfermedades. Los conocimientos generados serán útiles para el desarrollo de enfoques terapéuticos alternativos, especialmente para aquellos que utilicen sistemas de administración de miRNAs como tratamiento de la enfermedad periodontal (Irwnadi RA. 2016). Actualmente, el estudio de la periodontitis como factor de riesgo de la DM2 se ha enfocado en obtener más conocimientos sobre el sinergismo de las enfermedades por medio de las modificaciones epigenéticas, las cuales se ha observado son impulsadas por estímulos infecciosos, y por la respuesta celular y molecular, la cual se ha corroborado que está dictada tanto por el genoma como por las modificaciones epigenéticas (Barros SP. 2014).

4. EPIGENÉTICA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

El reconocimiento de la importancia de la epigenética ha llevado a los especialistas a estudiar los cambios epigenéticos que determinan la expresión de genes asociados con diferentes enfermedades tales como la diabetes, en la cual la regulación de la expresión de genes mediante cambios epigenéticos podrían jugar un importante papel en el desarrollo de la cronicidad y complicaciones de la enfermedad (Portela A. 2010). Se ha mostrado que la hiperglucemia altera la modificación de histonas y la actividad de las DNA metiltransferasas, así como los niveles de miRNAs en células endoteliales, células de músculo liso, cardiomiocitos, retina y células renales. Estas anomalías epigenéticas hacen que existan cambios en la expresión de numerosos genes que contribuyen en el desarrollo de la inflamación crónica o daño mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción de células endoteliales, disfunción y/o la acumulación de matriz extracelular en el riñón, causando el desarrollo de retinopatía, nefropatía o cardiopatía. (Wegner M. 2014).

4.1 Diabetes Mellitus tipo 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es un conjunto de trastornos metabólicos de carácter crónico caracterizados por un elemento en común, la hiperglucemia, que contribuye al desarrollo de complicaciones microvasculares, macrovasculares y nefropatías (Retzepi M. 2010). La complejidad de la enfermedad está dada por la interacción de factores genéticos y ambientales, tales como la dieta, el estilo de vida, la edad, obesidad y genética, lo cuales se ha demostrado que influyen en el daño de las células β y en el déficit de secreción de la insulina o su resistencia periférica (Brunetti A. 2014).

La DM2 se considera un factor de riesgo para la periodontitis y se ha demostrado que la gravedad de la enfermedad periodontal es más evidente en pacientes con DM2, que se relacionan con posibles factores sistémicos o relacionados con el tiempo como son la edad y la duración de la enfermedad, se considera que el nivel de placa bacteriana es el principal factor de la

progresión de la periodontitis (Wang T-F. 2014). Aunado a lo anterior, se ha mostrado que la relación entre ambos trastornos debida a la respuesta inflamatoria sistémica es bidireccional (Lindroth AM. 2013).

4.2 Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 2

La Federación Internacional de Diabetes (FID) ha considerado a la diabetes como una de las mayores emergencias sanitarias globales del siglo XXI, debido a que año con año más personas viven con esta condición. Existen 415 millones de adultos que padecen diabetes y se estima que para el año 2040 la Diabetes Mellitus (DM) incrementará su prevalencia a 642 millones de personas con este padecimiento. Además, la FID reporta que 1 de cada 11 adultos tiene DM, que el 46,5% de los adultos con diabetes están sin diagnosticar, que el 12% del gasto mundial en salud se destina a la diabetes (\$ 673 billones) y que 3/4 partes de estos individuos con diabetes viven en países de mediano y bajo ingreso (IDF 2015).

La diabetes, junto con sus complicaciones, son consideradas en muchos países como unas de las principales causas de muerte, teniendo que muere una persona cada 6 segundos por este padecimiento, y específicamente el 91% de estos casos padecen DM2 (Taylor GW. 2001). La prevalencia por sexo es mayor en hombres que en mujeres y así mismo se tiene una mayor proporción de personas con este padecimiento en áreas urbanizadas. Actualmente a nivel mundial, China ocupa el primer lugar con un mayor número de personas que padecen esta condición, seguido de la India, USA, Brasil, Rusia y México en el 6° lugar (IDF 2015).

4.3 Metilación de DNA en Diabetes Mellitus tipo 2

La metilación del DNA ha sido el proceso epigenético más estudiado por ser uno de los principales mecanismos reguladores involucrados en la expresión de genes relacionados, en este caso, con el metabolismo de la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, disfunción de células β entre otras condiciones relacionadas con la patogénesis de la DM2 (Alam F. 2016).

La interacción entre la metilación de genes involucrados con DM2 y factores ambientales, se ha observado en múltiples tejidos tanto de animales modelo como de humano. Estudios realizados por Karachaganak et al, 2015 mostraron que el incremento de la expresión de la proteína 2 con dominio de unión a metil-CpG (MBD2) está asociado a la presencia de la enfermedad DM2. Así mismo, la elevada metilación de los genes *Prdx2* y *SCARA 3* sugiere una alteración en la protección contra el estrés oxidativo en estos pacientes. (Karachaganak - Yankova S. 2015).

Por otra parte, se ha mostrado que los patrones epigenéticos cambian durante el transcurso de la vida, afectando genes clave en la cadena respiratoria (Ling C. 2007). El polipéptido 7A1 citocromo c oxidasa (COX7A1), el cual es parte del complejo 4 de la cadena respiratoria, se ha asociado con el incremento tanto de la glucosa *in vivo* como del volumen de oxígeno máximo, observando una disminución de su expresión en músculos diabéticos como consecuencia del tiempo transcurrido de exposición del DNA a la metilación (Rönn T. 2008).

Estudios orientados a determinar la metilación del DNA ha demostrado que se encuentra asociado con la edad, el metabolismo del individuo y en efecto con la diferente expresión de genes relacionados con la resistencia a la insulina, como lo es NADH deshidrogenasa subunidad 6 (NDUB6), que se le ha visto asociado en el incremento de la metilación sobre el promotor del gen, lo que resulta en una menor expresión de NDUB6 y consecuentemente en un bajo rendimiento metabólico asociado al incremento de la edad (Ling C. 2007).

Estudios relacionados en un modelo murino para determinar la metilación del DNA en el promotor de la hormona leptina, hormona secretada por los adipocitos, que regula el apetito y la homeostasis energética, que se expresa predominantemente en adipocitos maduros. Estudios han mostrado que una dieta alta en grasas, aumenta la metilación de DNA en los sitios CpG del promotor de la leptina en los adipocitos (Milagro FI. 2009).

Por otra parte, estudios sobre el activador transcripcional PPARG coactivador

1 α (PPARGC1A), el cual coordina la expresión de genes que estimulan el metabolismo oxidativo mitocondrial en múltiples tejidos, ha mostrado que la metilación del promotor PPARGC1A se encuentra elevada en los islotes pancreáticos de pacientes con DM2, y que su expresión se reduce en los islotes diabéticos y se correlaciona inversamente con el grado de metilación del DNA. Así mismo, se encontró una correlación positiva entre la metilación del DNA y la secreción de insulina estimulada por la glucosa en los islotes pancreáticos (Ling C. 2008).

4.4 Modificación de histonas en Diabetes Mellitus tipo 2

Se ha demostrado que las HDAC son reguladores cruciales de la determinación del destino de las células pancreáticas (Haumaitre C. 2008).

Tomando en cuenta que la prevalencia de DM2 incrementa rápidamente en todo el mundo, debida parcialmente a una epidemia de obesidad en la mayoría de los grupos étnicos. La obesidad, en particular, se ha relacionado con la pérdida de la función de la proteína Jhdm2a, una histona desacetilasa vinculada con la activación transcripcional de hormonas (Tateishi K. 2009).

Otras enzimas involucradas en el control epigenético del metabolismo es la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), que depende de sirtuina (clase III HDAC's), blanco tanto de histonas como de proteínas no histonas (Schwer B. 2008). SIRT1 conocida como "sirtuina-1 deacetilasa dependiente de NAD⁺", es una proteína codificada por el gen SIRT1 que regula diversas vías metabólicas incluyendo la adipogénesis, la biogénesis mitocondrial, la secreción de la insulina y el metabolismo de glucosa y ácidos grasos. Por otra parte, la ATP citrato liasa es una enzima que regula la conversión de citrato a acetil CoA, metabolito requerido para la acetilación de histonas por las HATs. Con base en lo anterior se ha sugerido que la disponibilidad de la glucosa puede afectar la acetilación de histonas de una manera dependiente de la ATP-citrato liasa, lo cual asocia el metabolismo energético de las células con la regulación epigenética (Wellen KE. 2009).

Se ha observado que, la regulación epigenética de la expresión del gen de la insulina en células β del páncreas, presenta está mediada por una hiperacetilación de la histona H4 y una hipermetilación de la histona H3 en la lisina 4, hallazgo que se observa en genes activos (Chakrabarti SK. 2003)

En conjunto, los estudios mencionados sugieren que la hiperglucemia podría inducir modificaciones epigenéticas que afecten la expresión de genes proinflamatorios y, por lo tanto, el desarrollo de la inflamación vascular. En el caso del factor nuclear kappa B (NF-kappa B), factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en enfermedades inflamatorias, incluyendo aterosclerosis y complicaciones de la diabetes (Miao F. 2004)

Estudios realizados en células de músculo liso vascular de ratones diabéticos han mostraron una disminución en los niveles de la histona H3 lisina 9 trimetilada (H3K9me3) y un aumento en los niveles de la histona H3 lisina 4 dimetilada (H3K4me2) en los promotores de genes inflamatorios como interleucina IL-6, citocina con actividad inflamatoria y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), relacionada con el tránsito de células del sistema inmune, ya han mostrado una disminución en los niveles los niveles de la H3K9me3 metiltransferasa Sv39h1 y la desmetilasa específica de lisina 1 (LSD1) (Villeneuve LM. 2008).

La expresión de la insulina en las células β del páncreas regulada por glucosa requiere de la interacción entre los genes Pdx1 y p300 así como de la hiperacetilación de la histona H4 localizada en el promotor del gen de la insulina (Qiu Y. 2002). Por lo tanto, se sugiere que los niveles bajos de glucosa disminuyen la expresión del gen de la insulina debido al requerimiento de HDAC1 y HDAC2 por Pdx1 (Mosley AL. 2004). La transcripción del gen de la insulina también requiere de la metilación de la histona H3 localizada en su promotor, posiblemente por Pdx1 en el reclutamiento de metiltransferasas SET9 (Francis J. 2005).

Los estudios realizados sugieren que los mecanismos epigenéticos son

capaces de modificar la estructura de la cromatina y en consecuencia influenciar el riesgo de padecer diabetes, lo cual abre nuevas posibilidades en el campo de la terapia con el objetivo de preservar la función de las células β .

4.5 miRNAs en Diabetes Mellitus tipo 2

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, como es el caso de la DM2, se encuentra la inflamación crónica de bajo grado debida al envejecimiento fisiológico (Vel Szic KS. 2015). Se ha mostrado que los ácidos grasos libres y los derivados de lípidos en adipocitos y músculo esquelético activan la vía de los TLRs induciendo la activación de NF- κ B, promoviendo así la inflamación mediada por la resistencia a la insulina y la inflamación mediada por la disfunción endotelial (Prajapati B. 2014). En el caso de los genes de la ruta TLR estos son regulados por diferentes mecanismos epigenéticos, entre los que se incluyen a los miRNAs. Recientemente se ha mostrado que diversos miRNAs están implicados en la modulación de las vías TLR a los cuales se ha llamado “inflammamiRs”. MiR-146a es el inflammamiR mejor caracterizado, el cual se ha mostrado que está implicado en la reducción de la inflamación y en la desconexión de la inflamación aguda después de la eliminación del estímulo nocivo. Durante una baja estimulación crónica, MiR-146a se sobreexpresa en diferentes tipos de células, incluyendo células endoteliales y células blancas (Olivieri F. 2013). Se ha reportado un aumento de los niveles circulantes de MiR-146a en pacientes con DM2 no tratados previamente con diagnóstico reciente. La expresión de MiR-146a también se ha evaluado en modelos animales de diabetes como son ratones diabéticos y se ha encontrado una correlación positiva en los niveles de MiR-146a, que inducen la activación de NF- κ B, y los niveles de mediadores inflamatorios (Yousefzadeh N. 2015).

El MiR-126 es el miRNA más estudiado en DM2. Sin embargo, otros miRNAs han sido implicados en la regulación de la vía inflamatoria asociada a diabetes. En un meta-análisis reciente se encontraron 40 miRNAs circulantes desregulados significativamente en DM2 entre los que se encuentran miR-126,

miR-375, miR-29a, miR-24a, miR-103, miR-107, miR-132, miR-142-3p, y miR-144 (Zhu H. 2015).

La identificación de un grupo de “epimarcadores”, entre ellos los miRNAs circulantes, podría revolucionar el tratamiento de pacientes diabéticos, la identificación de aquellos con un mayor riesgo de complicaciones y que por tanto requerirían de una terapia más amplia o más agresiva en la circulación. Hasta el momento se han identificado varios miRNAs candidatos, sin embargo, se necesitan más estudios para su validación en cohortes de pacientes con DM2 con diferentes complicaciones (Francesco P. 2015).

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente las enfermedades crónicas como la periodontitis y DM2 son relevantes por una alta prevalencia y los elevados costos que generan en el sector salud (IDF 2015). Por ello, se ha considerado el estudio molecular, específicamente, en los cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas responsables de modificaciones epigenéticas en pacientes con periodontitis y DM2 (Wang LL. 2012)..

Se ha demostrado una importante exacerbación de la periodontitis en sujetos que presentan DM2. Por lo que se puede sugerir que con la identificación de los genes que participan en el aumento y disminución de la acetilación y desacetilación de histonas, de las cuales han reportado que dichas modificaciones en las histonas son importantes en la formación de osteoclastos y el mecanismos de regulación post-traduccionales, inducidos por bacterias en células madre de tejido periodontal (Bei Li. 2016).

Por ello, se considera que dichas modificaciones puedan regular la expresión de otros genes y con base en esto será factible generar conocimiento con el objetivo de crear nuevas estrategias preventivas y terapéuticas para pacientes que presenten estas características.

Con lo antes expuesto nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:
¿Existen diferencias en la expresión de genes responsables de modificaciones epigenéticas en pacientes con periodontitis y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con periodontitis?

6 JUSTIFICACIÓN

En México existe una alta prevalencia de DM2, que se le ha considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de periodontitis considerada como la 6ª complicación de la DM2 (Wang T-F. 2014). Por lo que se planteó la identificación de nuevos biomarcadores relacionados con la expresión génica, en función de cambios epigenéticos, con la finalidad de responder a la pregunta, si existe relación entre DM2 y la periodontitis. Si existe esta relación se podría sugerir futuros enfoques preventivos y diferente manejo clínico.

7 HIPÓTESIS

La expresión de los genes KAT2A, KAT2B, KAT5 que participan en la acetilación de histonas se modifica en pacientes con periodontitis debido a que se ven afectados clínicamente por la presencia de la DM2.

8 OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de genes que participan en modificaciones epigenéticas en pacientes con periodontitis y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con periodontitis.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar en bases de datos del genoma humano las secuencias nucleotídicas de los genes **KAT5**, **KAT2A**, **KAT2B** los cuales participan en la acetilación de histonas.
2. Diseñar oligonucleótidos específicos para los genes **KAT5**, **KAT2A**, **KAT2B** mediante el software RealTimeDesign.
3. Obtener mRNA de tejido de granulación obtenido durante el tratamiento de raspado y alisado en pacientes con periodontitis, diabéticos con periodontitis y sujetos sanos de las muestras obtenidas de la extracción de terceros molares.
4. Determinar los niveles de expresión de los genes: **KAT5**, **KAT2A** y **KAT2B** en los tres grupos de pacientes: con DM2 y periodontitis (grupo 1), con periodontitis sin DM2 (grupo 2) y sanos (grupo control sin periodontitis y sin DM2), mediante la técnica de qPCR en tiempo real.
5. Analizar y relacionar los diferentes niveles de expresión de los genes **KAT5**, **KAT2A** y **KAT2B** entre los tres grupos de pacientes.

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos fueron analizados con EXCEL y software SPSS:

- Se realizó una prueba estadística *t*-Student para analizar los datos de las tres réplicas obtenidas considerando solo las dos más cercanas en su expresión hecho por el análisis del software del termociclador considerando un nivel de confianza del 95%.
- Los datos se expresaron en porcentajes, media y desviación estándar. La significancia estadística se determinó analizando los datos con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

10 MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Características del estudio

El tipo de estudio que se llevó a cabo fue transversal. El universo fue constituido por pacientes mexicanos con diagnóstico de periodontitis en las clínicas de odontología de la ENES-UNAM León; los pacientes sanos fueron captados en la clínica de cirugía y los pacientes con DM2 y periodontitis en la clínica de periodoncia.

10.2 Selección y obtención de muestra

La selección del tamaño de muestra fue no probabilística (conveniencia).

10.2.1 Recolección de la información

- 1) Se invitó a participar en el estudio a los pacientes candidatos de acuerdo a los criterios de selección correspondientes para cada grupo.
- 2) Una vez seleccionados se informó del estudio y después de verificar que fue comprensible la explicación se les proporcionó la hoja de consentimiento informado para su firma (ANEXO 1).
- 3) Se solicitó los estudios de laboratorio en el caso de pacientes con DM2 para anexarlos a su expediente.
- 4) Después de haber realizado una historia periodontal y de haber diagnosticado el tipo de periodontitis, el doctor a cargo del paciente inició su tratamiento de raspado y alisado donde se retiró tejido de granulación como parte del procedimiento.
- 5) El tejido de granulación que se recolectó durante la cita de raspado y alisado se conservó en tampón fosfato salino (PBS) para su posterior criopreservación con nitrógeno líquido y almacenamiento a -80°C hasta su uso.
- 6) En el caso de sujetos sanos (grupo control), las muestras de tejido se obtuvieron de aquellos con indicación de extracción de terceros molares,

los cuales se conservaron en PBS para retirar tejido periodontal y posteriormente se criopreservaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

10.2.2 Criterios de Inclusión

Tabla 2. Criterios de Inclusión para los tres grupos.

Grupo 1	<ul style="list-style-type: none"> 1.- Pacientes de género indistinto, mayores de 30 años. 2.- Pacientes con diagnóstico de DM2 por un máximo de 15 años. 3.- Pacientes con periodontitis crónica.
Grupo 2	<ul style="list-style-type: none"> 1.- Pacientes de género indistinto, mayores de 30 años. 2.- Pacientes con periodontitis crónica.
Grupo control	<ul style="list-style-type: none"> 1.- Pacientes de género indistinto, mayores de 30 años. 2.- Pacientes saludables de acuerdo a su historia clínica. 3.- Pacientes sin periodontitis ni DM2.

Se formaron tres grupos: Grupo 1: Pacientes con periodontitis crónica y DM2; Grupo 2: Pacientes con periodontitis crónica y Grupo control: Pacientes sanos.

10.2.3 Criterios de Exclusión

Tabla 3. Criterios de exclusión para los tres grupos.

Grupos 1, 2 y control	<ul style="list-style-type: none"> 1.- Pacientes con enfermedades endocrinas que modifiquen el metabolismo óseo. 2.- Pacientes con consumo de estrógenos. 3.- Pacientes con enfermedades de tejido conectivo. 4.- Pacientes fumadores. 5.- Pacientes con cáncer.
-----------------------	---

10.2.4 Criterios de Eliminación

Tabla 4. Criterios de eliminación para los tres grupos.

Grupo 1, 2 y control	Muestras mal procesadas (calidad de RNA deficiente y degradado).
----------------------	--

10.2.5 Variables dependientes e independientes

Tabla 5. Variables dependientes e independientes

	<i>Variable</i>	<i>Definición Conceptual</i>	<i>Definición Operacional</i>	<i>Escala de medición</i>
Variables Independientes	<i>Género</i>	<i>Conjunto de seres que tienen uno o varios caracteres comunes.</i> RAE	<i>Se considerara el sexo que este capturado en su expediente.</i>	<i>Cualitativa Nominal Dicotómica</i>
	<i>Edad</i>	<i>Tiempo que ha vivido una persona.</i> RAE	<i>Mediante la pregunta: ¿Qué edad tiene?</i>	<i>Cuantitativa Discreta de Razón</i>
	<i>Tiempo diagnóstico</i>	<i>Tiempo transcurrido desde que se diagnosticó DM2.</i> ADA	<i>Mediante la pregunta: ¿Cuántos años tiene de haberse detectado el padecimiento de la DM2?</i>	<i>Cuantitativa Discreta de Razón</i>
	<i>Control de DM2</i>	<i>Uso de medicamentos, dieta y actividad física para mantener los niveles de glucosa en sangre. ADA</i>	<i>Mediante la pregunta: ¿Controla su DM2? SI/NO</i>	<i>Cualitativa Nominal Dicotómica</i>
	<i>Índice de masa corporal (IMC)</i>	<i>Indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos.</i> OMS	<i>Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (Kg/m²)</i>	<i>Cuantitativa Discreta de Razón</i>

	<i>Presión arterial</i>	<i>Tensión arterial. OMS</i>	Normal = 120/80 mm Hg Alta= igual o superior a 140/90 mm Hg	<i>Cuantitativa Discreta de Razón</i>
	<i>Niveles de glucosa</i>	<i>Glucosa en sangre. ADA</i>	Glucosa plasmática preprandial (antes de comer): 80-130 mg/dl Glucosa plasmática posprandial (1-2 horas después del inicio de la comida): Menos de 180 mg/dl.	<i>Cuantitativa Discreta de Razón</i>
	<i>Hemoglobina glicosilada (HbA1c)</i>	<i>Determina cómo ha sido el control glucémico de una persona con diabetes en los últimos tres meses. ADA</i>	HbA1c: < 7% <i>Indica control adecuado de la glicemia en paciente diabético.</i>	<i>Cuantitativa Discreta de Razón</i>
Variables Dependientes	<i>Niveles de expresión génica</i>	<i>Actividad transcripcional de ciertos genes en tipos celulares específicos. NATURE</i>	<i>Valores dados por la qPCR a partir de la amplificación de cada uno de los genes en los diferentes grupos de pacientes.</i>	<i>Cuantitativa Continua de Razón</i>

10.3 Obtención del perfil de expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B en los diferentes grupos de pacientes.

Para llevar a cabo el estudio de expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B se recolectaron 39 muestras totales de tejido periodontal (13 del Grupo 1, 13 del Grupo 2 y 13 del grupo control) a partir de las cuales se hizo extracción de RNA total para después realizar RT-PCR y PCR en tiempo real. Se consideraron 4 genes (incluido el gen endógeno), 3 condiciones, 3 réplicas y 1 control negativo por cada gen (Fig.6).

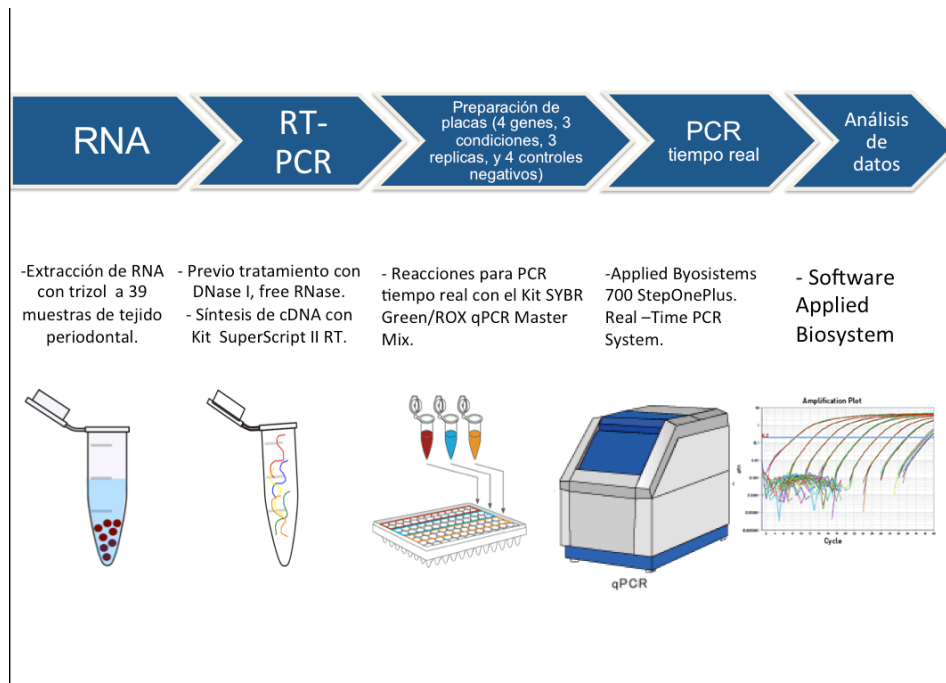


Figura 6. Procedimiento general para el estudio de los niveles de expresión de los genes.

10.3.1 Extracción de RNA total

Las extracciones de RNA total de tejido periodontal proveniente de 39 pacientes (13 pacientes por grupo) se realizaron mediante la técnica de Trizol:

- 1) Se utilizó 1 ml de TRizol™ Reagent por muestra, no obstante la variación en la cantidad de tejido entre ellas, para obtener RNAs totales de buena calidad (no degradados) y con cantidad suficiente para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción que convierte a los mRNAs en cDNAs.
- 2) El tejido periodontal junto con el reactivo Trizol añadido se maceró en nitrógeno líquido con la ayuda de mortero y pistilo.
- 3) La muestra homogeneizada se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (eppendorf) para posteriormente llevar a cabo la separación de fases y aislamiento del RNA siguiendo el protocolo de TRizol™ Reagent descrito por el fabricante (Tabla 6 y Anexo 2).

- 4) El RNA obtenido se resuspendió en agua libre de RNasa (20-50 ul).
- 5) Se incubó por 15 min. a una temperatura de 55-60 °C para posteriormente cuantificarlo en un espectrofotómetro.

Tabla 6. Reactivos para la extracción de RNA con TRizol™ Reagent Invitrogen.

Extracción de RNA	Reactivos	Volumen por muestra (ul)
Lisis de muestra	TRizol™ Reagent	1000
Separación de fases	Cloroformo	200
Precipitación de RNA	Isopropanol	500
Lavado de RNA	Etanol, 75%	1000
Resuspensión de RNA	RNase-free water of 0.5% SDS	20-50
ANEXO 2		

10.3.2 Integridad y pureza del RNA

La pureza de las moléculas son los factores determinantes de la calidad del RNA (Fig. 7).

- Se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 cuantificar y evaluar cualitativamente la posible contaminación de las muestras de RNA con proteínas, DNA y/o restos celulares provenientes del proceso de extracción y purificación con Trizol. Las impurezas pueden disminuir la eficiencia de la RT y subsecuentemente reducir los niveles de amplificación. La pureza de RNA se mide mediante la relación de los

valores de absorbancia a 260 y 280 nm, ésta debe estar en el rango de 1.7-2.1. Nosotros pudimos obtener valores de concentraciones de mRNA desde 150 ng/ul hasta 1ug/ul con una pureza de 1.70 a 2.0 (260/280).

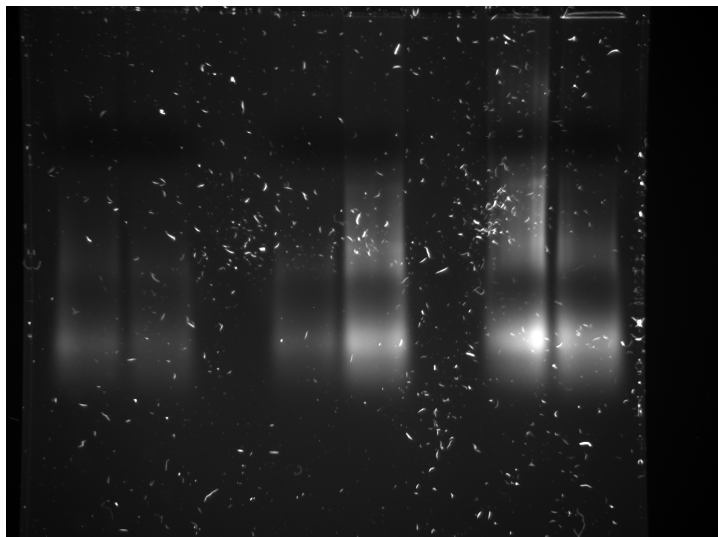


Figura 7. Integridad RNA.

Después de la prueba de integridad se hicieron diversas alícuotas para ser almacenadas a -80 °C para su posterior tratamiento de purificación y DNase I.

10.3.3 Purificación de RNA con tratamiento con DNase I

- Los especímenes fueron tratados con DNase I para eliminar restos de DNA de la muestra de RNA con el protocolo de DNase I (Tabla 7 y ANEXO 3).

Tabla 7. Reactivos para purificación de RNA con DNase libre de RNasas.

DNase I	Reactivos	Volumen por muestra (ul)
Remover DNA Genómico	10X reaction buffer with MgCl ₂	1
	DNase I, RNase-free	1 (1U)

	DEPC- agua	Aforar a 10 ul
	RNA total	1ug
Inactivación de la DNase I	EDTA a 50 mM	1
ANEXO 3		

10.3.4 Síntesis de cDNA

- 1) Se realizó la síntesis de cDNA a partir de 200 ng de RNA total con el seguimiento de instrucciones del fabricante SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Tabla 8 y ANEXO 4).
- 2) Se añadió a 200 ng (1ul) de RNA total, 1 ul de oligo (dt), 1 ul dNTP mix (10mM) y ddH₂O estéril para aforar a 12 ul, se mezclaron y se incubaron a 65 °C por 5 min.
- 3) Se añadió 4 ul de 5x First – strand buffer y 2 ul de 0.1 MDTT, mezclando suave para posteriormente incubar a 42 °C por 2 min.
- 4) Finalmente se añadió 1 ul de super script II RT, se aforó a 20 ul con ddH₂O estéril e incubó a 42 °C por 50 min. Y 70°C por 15 min.

Tabla 8. Reactivos para la síntesis de cDNA con SuperScript™ II Reverse Transcriptase.

SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Reactivos	Volumen por muestra (ul)
	Oligo(dT)	1
	1 ng to 5 µg total RNA	x 1
	1 µL dNTP Mix (10 mM)	1

	each)	
	Agua estéril	a 12
	5X First-Strand Buffer	4
Síntesis de cDNA	0.1 M DTT	2
	SuperScript™ II RT	1
ANEXO 4		

10.3.5 Diseño de primers

En el transcurso de recolección de muestra y extracción de RNA se diseñaron los primers u oligonucleótidos bajo las siguientes indicaciones:

- Deben tener longitudes de entre 19 y 25 nucleótidos.
- Tener valor de GC alrededor del 50%.
- Ser complementarios a las regiones deseadas.
- La temperatura de fusión de los primers usados en la misma reacción deben ser en $T_m > 58$.
- Las secuencias no deben formar estructuras secundarias (Rose, T. 2003).

10.3.5.1 Diseño de primers mediante el software RealTime Design™

- Se utilizó el software Real Time Design para obtener los pares de primers (forward y reverse) a partir de la secuencia nucleotídica codificante de cada gen obtenida en pubmed gen (Fig.8).

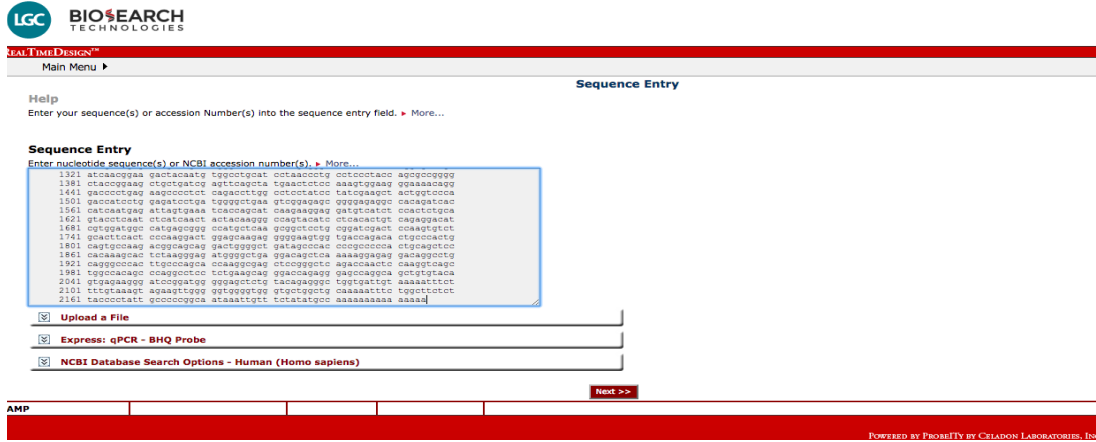


Figura 8. Software RealTime Design™

10.3.5.2 Evaluación de primers mediante el programa OligoEvaluator™

- Se evaluó el diseño de primers con el software OligoEvaluator colocando únicamente las secuencias de los primer forward y reverse obtenidas (Fig. 9).

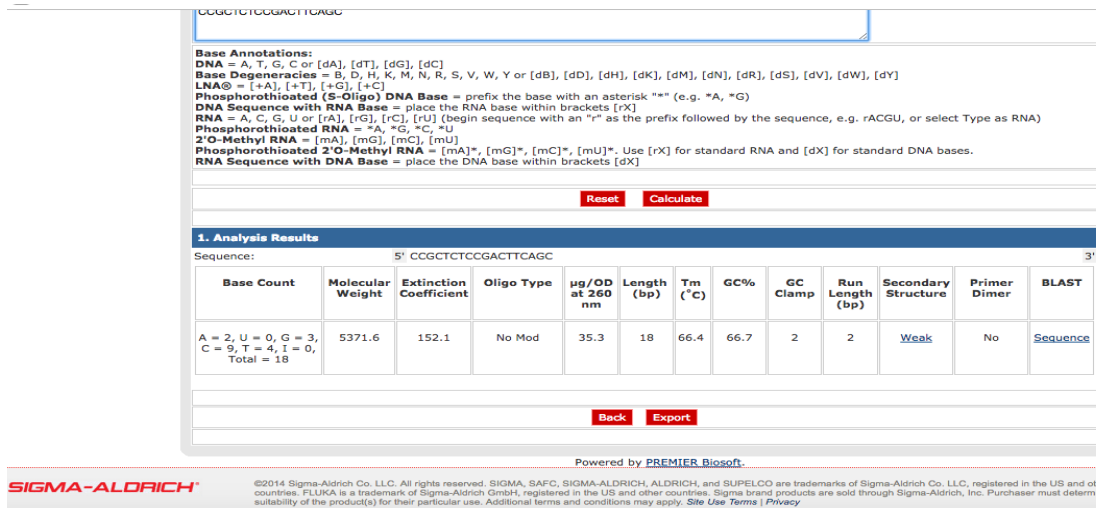


Figura 9. Software OligoEvaluator™

10.3.5.3 Especificidad de los primers diseñados

- Los productos de PCR obtenidos con los primers diseñados se analizaron con el software PCR productos para determinar su especificidad (Fig. 10).

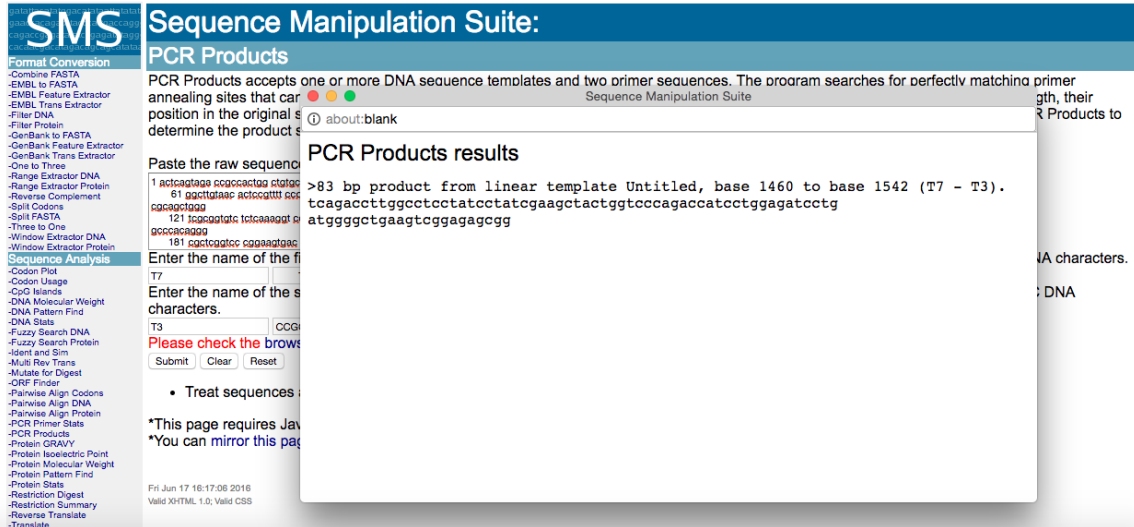


Figura 10. Software PCR Products

10.3.5.4 Diseño de primers específicos para los genes KAT2A, KAT2B Y KAT5

- El empleo de parejas de primer u oligonucleótidos sirven de punto de arranque de la actividad de la polimerasa en cualquier PCR. En concreto, la extensión de estos primers se da en el extremo 3'. Por estas razones se elaboró el diseño previo en base a los supuestos mencionados en la metodología, todos calculados desde la secuencia del gen de estudio.

Tabla 9. Diseño de primer específicos.

Gen	Secuencia sentido de 5' a 3'	Secuencia anti sentido de 5' a 3'	Productos
KAT5	TCAGACCTTGGCCTCCTATC	CCGCTCTCCGACTTCAGC	83 pb
KAT2A	TGCTGGCCCAAATCAAGTC	GAAGCGGATGACCTCGTAGTAG	95 pb
KAT2B	CACCAGGGTTTGCTGTCAGTA	GAGTTGGGAATGGCAGATGTC	176 pb
Control: GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCTTAG	TGAGTCCTTCCACGATACCAA	72 pb

10.3.5.5 Prueba de primers

- 1) Se diluyeron los primers a una concentración de 0.5 M.
- 2) Se probaron los primers mediante PCR punto final utilizando como templado DNA genómico.
- 3) Se prepararon reacciones con el kit Taq DNA polymerase de 500U como se estipula en el protocolo (Tabla 9 y ANEXO 5).
- 4) Los productos de PCR amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2%, para lo cual se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Fig. 10).

Tabla 10. Reactivos del Kit Taq DNA polymerase de 500 U.

Reactivos	Volumen por muestra (ul)
Taq DNA polymerase de 500U	
10X Taq Buffer 5 µL	5 µL
dNTP Mix, 2 mM each	5 µL (0.2 mM of each)
Forward primer	0.1-1.0 µM
Reverse primer	0.1-1.0 µM
25 mM MgCl ₂ *	1-4 mM
Template DNA	10 pg - 1 µg
Taq DNA Polymerase 1.25 U	1.25 U

Water, nuclease-free	to 50 μ L
ANEXO 5	

Tabla 11. Condiciones de amplificación de DNA con Taq polymerase 500 U.

	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Inicial Desnaturalización	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	25-40
Alineación	TM -5	30 seg	
Extensión	72	1min/kb	
Final extensión	72	5-15 min.	1
ANEXO 5			

10.3.5.6 PCR tiempo real

A diferencia de la PCR de punto final en la PCR en tiempo real se adiciona SYBR Green como fluoróforo para la detección del producto de PCR. Para esto, se utiliza un termociclador que tenga sensores para medir fluorescencia tras la excitación del fluoróforo, a partir de la cual se determina la cantidad de producto de PCR de forma cuantitativa en cada uno de los ciclos de amplificación (Watson JD. 2004).

- 1) Inicialmente se hicieron alícuotas de cDNA considerando agregar solo 2 μ l por reacción con una concentración de 500 ng final. Igualmente se

hicieron alícuotas de primer forward y reverse para agregar 2 ul de cada uno con concentraciones de 2 uM.

- 2) Se preparó un master mix para 40 reacciones con ambos primer, agua libre de nucleasas y Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, posteriormente en cada tubo para PCR se añadió una cantidad de 18 ul de la mix para finalmente añadir el templado (cDNA) de 2 ul (Tabla 11 y ANEXO 6).
- 3) En la placa para PCR tiempo real se acomodan los tubos de forma estratégica de acuerdo al diseño previo del programa del equipo Applied Biosystems StepOnePlus tiempo real PCR dado en función de nuestras muestra a comparar y nuestro gen endógeno. Por placa se evaluaron: 3 grupos de pacientes incluido el grupo control, 3 genes de estudio y un gen control, 3 réplicas y un negativo por gen, sumando 40 pocillos totales por placa.
- 4) Finalmente la cuantificación de expresión de los genes en sus diferentes condiciones es obtenida por los valores de cuantificación relativa de Log2 (Log2 RQ) dicho valor se obtiene de la variación de expresión de un gen entre dos muestras (muestra de estudio y muestra control).

Tabla 12. Reactivos para reacciones con maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.

Reactivos	Volumen por muestra (ul)	Concentración final
Maxima SYBR Green/ROX Master Mix (2X)	10	
Forward primer (2 µM)	2	0.3 uM

Reverse primer (2 μM)	2	0.3 μ M
Water, nucleasa-free	Aforar a 20	
Templado (cDNA)	2	\leq 500 ng
ANEXO 6		

Tabla 13. Condiciones de amplificación de cDNAs con SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.

	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Inicial Desnaturalización	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	40
Alineación/Extensión	60	1 min	
ANEXO 6			

11 RESULTADOS

11.1 Selección y obtención de muestra

Se recolectaron en total 70 muestras de tejido periodontal en tubos con 1 ml de

PBS de todos los grupos de estudio en un periodo de un año. Para este proyecto de investigación se consideraron 13 especímenes por cada grupo de estudio cumpliendo con todos los criterios y calidad de RNA estipulados. Las muestras que no cumplieron con los criterios de inclusión y/o de calidad de las muestras no se incluyeron en este estudio.

Las características sociodemográficas de los pacientes del grupo de estudio 1 (DM2 con periodontitis) fueron las siguientes: el 38.46 % mayor de 60 años, el 30.77 % estaba en el rango de 50-59 años y el otro 30.77 % estaba en el rango de 40-49 años; la edad promedio fue de 55.30 años con una desviación estándar de ± 7.28 años; en cuanto al género, el 38.46% de los pacientes fue de sexo femenino.

Los análisis antropométricos realizados mostraron que en el grupo 1 el promedio del IMC (Índice de Masa Corporal) fue de 26.15, con una desviación estándar de ± 0.82 . De acuerdo con este indicador, el 84.92% de los diabéticos tenía sobrepeso (IMC entre 25 y 29.5) mientras que el resto (15.38 %) tenía un índice normal (IMC < 24.9).

En relación con la diabetes, el promedio de años de diagnóstico de la misma fue de 7.8 años con una desviación de ± 3.8 años. Así mismo, el 53.45% de los pacientes del grupo 1 mostraron presión alta en el estudio de sus signos vitales. El valor promedio de hemoglobina glicosilada (HBA1C) encontrado en este grupo fue de 8.1 mg/dl con una desviación estándar de ± 0.79 mg/dl, mientras que el valor promedio de glucosa fue de 100.23 mg/dl con una desviación estándar de ± 13.94 mg/dl.

Las características sociodemográficas de los pacientes del grupo de estudio 2 (periodontitis) fueron las siguientes: el 30.77% era mayor de 60 años, el 30.77% tenía entre 50 y 59 años, el 23.08 % tenía entre 40 y 49 años, y el 15.38 % tenía entre 30 y 39 años; la edad promedio fue de 53.76 años con una desviación estándar de ± 10.41 años. Así mismo, el 61.54% de los pacientes en este grupo de estudio fue de sexo femenino.

El análisis de antropometría del grupo de estudio 2 mostró que el promedio del IMC fue de 24.91, con una desviación estándar de ± 0.80 . De acuerdo con este indicador, el 38.46 % de los pacientes con periodontitis tenía sobrepeso (IMC entre 25 y 29.5) mientras que el 61.54 % tenía un índice normal (IMC < 24.9).

Por otra parte, las características sociodemográficas de los sujetos del grupo de estudio control (sanos) fueron las siguientes: el 7.69 % era mayor de 60 años, el 23.08 % tenía entre 40 y 49 años, el 30.77 % tenía entre 30 y 39 años, y el 38.46 % tenía entre 20 y 29 años; la edad promedio fue de 34.84 años, con una desviación estándar de ± 12.52 años, y en cuanto al género, el 46.15% de los pacientes era de sexo femenino.

El análisis antropométrico del grupo control mostró que el promedio del IMC para los pacientes de dicho grupo fue de 24.49, con una desviación estándar de: ± 1.50 . Así mismo, de acuerdo con dicho indicador, el 38.46 % de los pacientes sanos tenía sobrepeso (IMC entre 25 y 29.5) mientras que el 61.54 % restante tenía un índice normal (IMC < 24.9).

Tabla 14. Características de cada grupo de pacientes.

Grupos de estudio			
VARIABLES	1 (DM2 y P) n=13	2 (P) n=13	Control (S) n=13
Género			
Hombres	61.54 %	38.46 %	53.85 %
Mujeres	38.46 %	61.54 %	46.15 %
Total	100 %	100 %	100 %
Edad (años)			
20 – 29	0 %	0 %	38.46 %
30 – 39	0 %	15.38 %	30.77 %
40 – 49	30.77 %	23.08 %	23.08 %

50 – 59	30.77 %	30.77 %	0 %
60 – 69	38.46 %	30.77 %	7.69 %
Total	100 %	100 %	100 %
X: S ±	X: 55.30 ± 7.28	X: 53.76 ± 10.41	X: 34.84 ± 12.52
IMC			
< 24.9	15.38 %	61.54 %	61.54 %
25 – 29.5	84.62 %	38.46 %	38.46 %
> 30	0 %	0 %	0 %
Total	100 %	100 %	100 %
X: S ±	X: 26.15 ± 0.82	X: 24.91 ± 0.80	X: 24.49 ± 1.50
Presión Arterial			
Normal	46.15 %	69.23 %	76.93 %
Alta	53.45 %	30.77 %	23.07 %
Total	100 %	100 %	100 %
Glucosa			
X: S ±	X: 100.23 mg/dl S ± 13.94	82 mg/dl -110 mg/dl	82 mg/dl -110 mg/dl
Hemoglobina Glicosilada (HBA1C)			
X: S ±	X: 8.1 % S ± 0.79	4.0 – 5.6 %	4.0 – 5.6 %
Tiempo Diagnóstico			
X: S ±	X: 7.84 S ± 3.89	_____	_____

11.2 Prueba de especificidad de primers

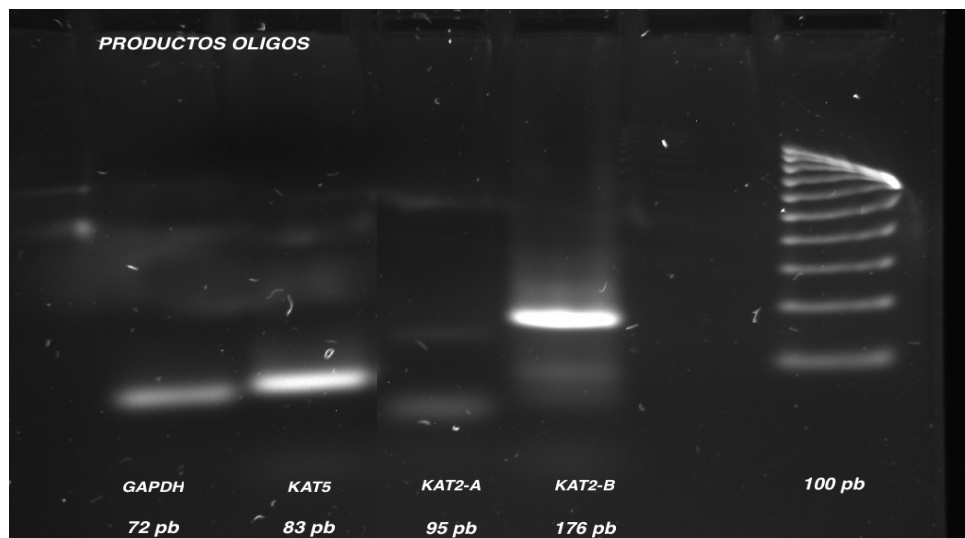


Figura 11. Prueba de especificidad de primers. La especificidad de los primers utilizados se comprobó mediante PCR punto final a partir de DNA genómico. Como se muestra en la figura 10, los oligonucleótidos utilizados amplificaron en el PCR con el tamaño esperado para cada uno de los genes analizados (KAT5, KAT2A, KAT2B y el gen endógeno GAPDH).

11.3 Nivel de expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B de los diferentes grupos de pacientes.

El análisis de la expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B en los pacientes de los tres grupos de estudio se realizó cuantitativamente mediante PCR en tiempo real, con la cual se amplifica y se cuantifica el producto de PCR de manera simultánea.

En el presente estudio se analizaron 14 placas en total de PCR tiempo real en las cuales se incluyeron a los 3 genes de estudio y al gen endógeno por triplicado para los 3 grupos de pacientes de estudio así como a un negativo por cada gen.

- **Análisis estadístico**

Mediante el previo análisis estadístico *t*-Student se realizó para sacar la media de los valores de 2 réplicas de 3 que fueron más cercanas en sus valores de expresión de la qPCR. Posteriormente se hizo el análisis descriptivo para los niveles de expresión de los cuales se consideró el valor de la cuantificación relativa logaritmo 2 RQ (Log2 RQ) de cada gen por cada grupo de estudio (n=13) dicho valor se obtiene de la variación de expresión de un gen entre dos muestras (muestra de estudio y muestra control).

Se realizó un ANOVA de Kruskal-Wallis y una prueba Tukey post hoc con los datos provenientes de los valores de Log2RQ. Derivados de estas pruebas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores Log2RQ para el gen KAT2A la cual se ve disminuida la expresión en el grupo DyP comparado con el grupo control ($p < .05$) (Gráfica 1); para el gen KAT2B también se observó disminuida la expresión en el grupo DyP comparado con el grupo control ($p < .05$) y el grupo DyP se observa disminuida su expresión comparado con grupo que solo tiene periodontitis ($p < .05$) (Gráfica 2); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre dichos valores para el gen KAT5 entre los grupos de estudio (Gráficas 3).

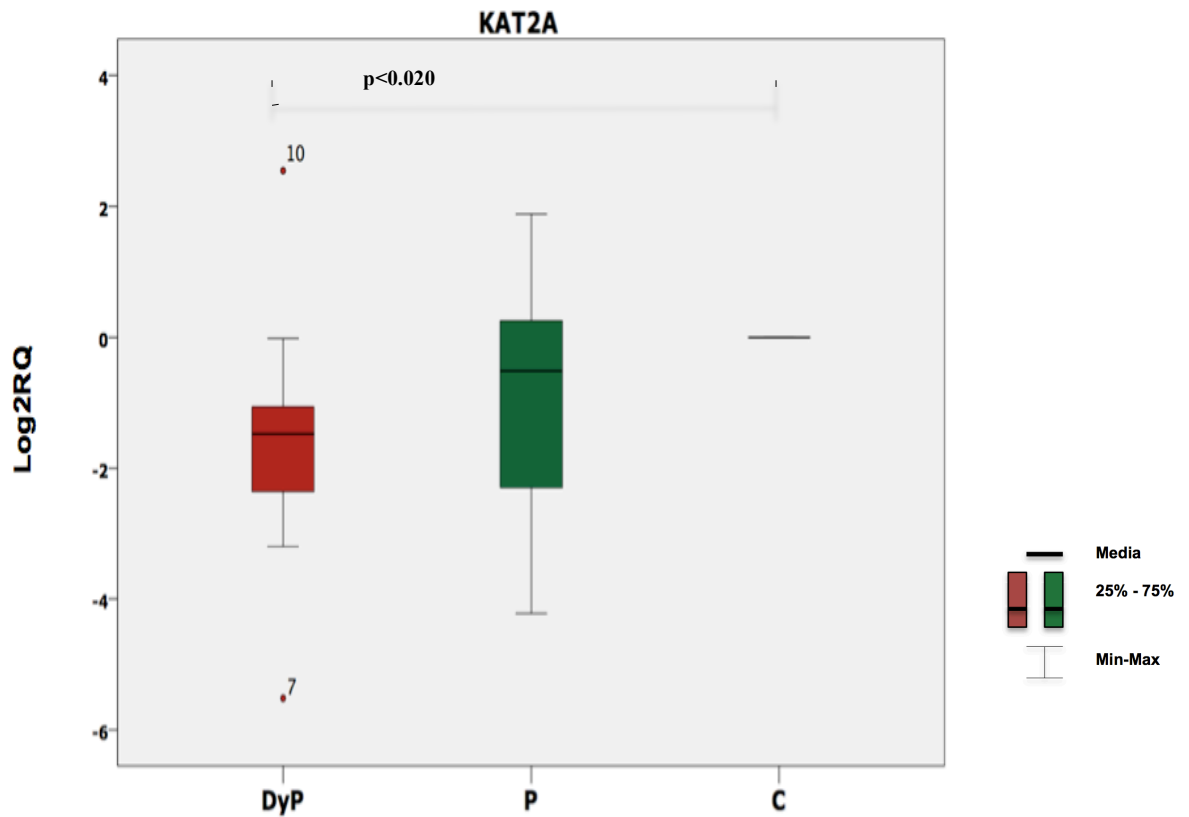


Gráfico 1. Niveles de expresión de KAT2A. Los niveles de expresión del gen KAT2A con el valor Log2 RQ de cada grupo de pacientes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores Log2RQ para el gen KAT2A entre los grupos DyP y grupo control ($p < .05$)

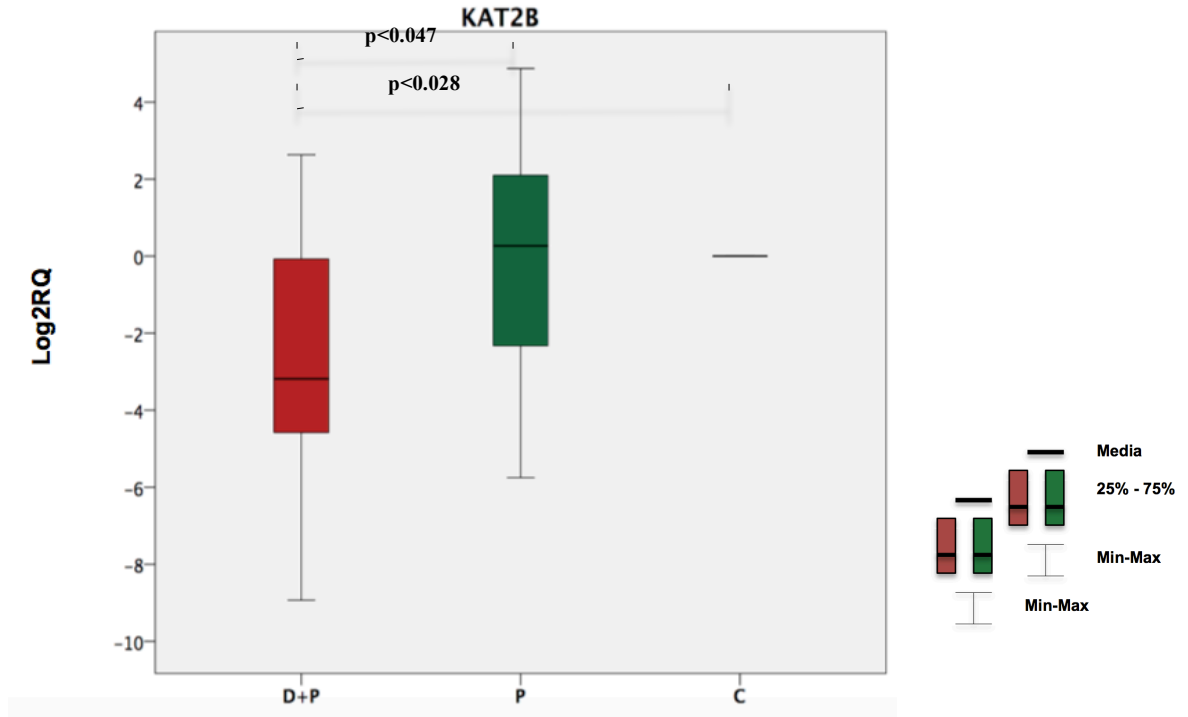


Gráfico 2. Niveles de expresión de KAT2B. Los niveles de expresión del gen KAT2B con el valor Log2 RQ de cada grupo de pacientes. Se observaron diferencias significativas entre el grupo de DyP con el grupo control ($p < .05$) y el grupo DyP con periodontitis ($p < .05$)

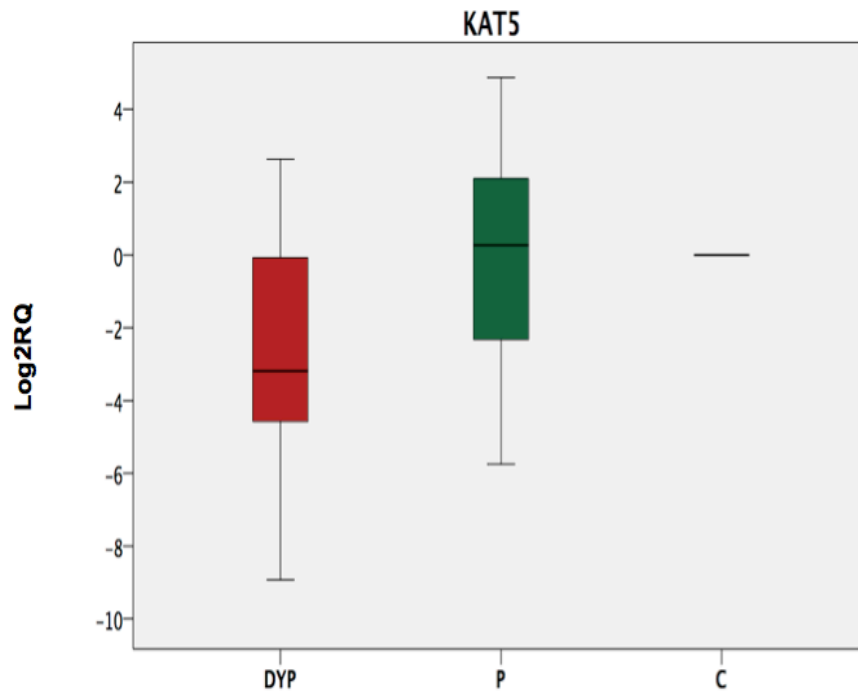


Gráfico 3. Niveles de expresión de KAT5. Los niveles de expresión del gen KAT5 con el valor Log2 RQ de cada grupo de pacientes. No se observaron diferencias significativas por ser muy similares los valores entre muestras.

11.4 PCR punto final

Se realizó PCR punto final para corroborar la expresión de los genes de estudio y llevar a cabo un análisis de expresión semicuantitativa entre los tres grupos de estudio basado en la intensidad de las bandas de los productos de PCR observada en geles de agarosa al 2% (Fig. 12)

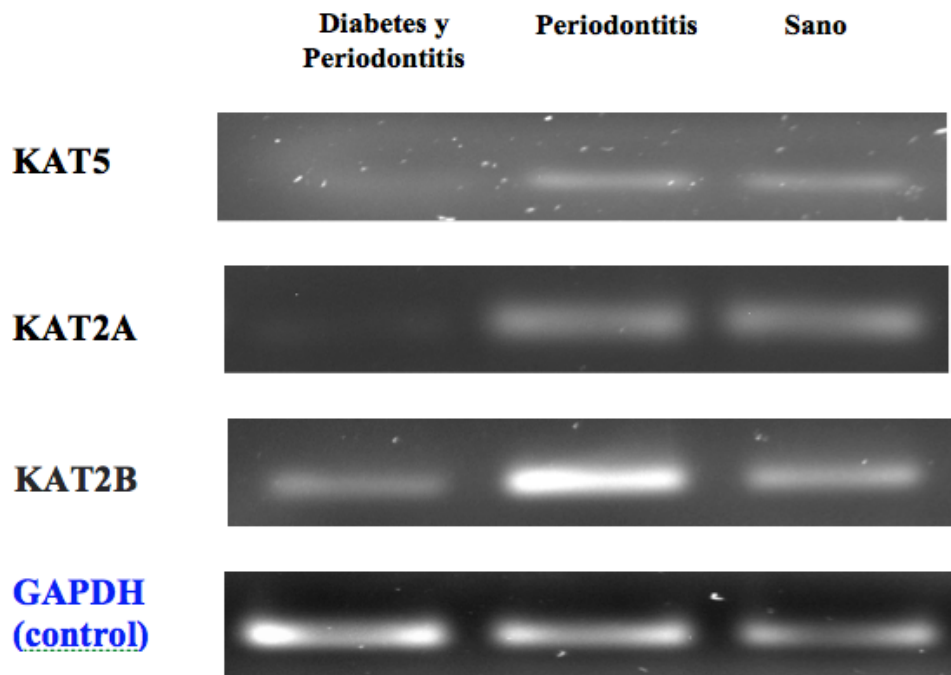


Figura 12. PCR punto final de los genes KAT5, KAT2A, KAT2B y del gen control GAPDH en los diferentes grupos de estudio. Como se muestra en la figura, en los pacientes del grupo 1 (DM2 y P) no se observó expresión de los genes KAT5 y KAT2, y la expresión del gen KAT2B fue menor en comparación con los otros dos grupos de estudio (P y control). Estos resultados sugieren una disminución en la acetilación de histonas en los pacientes que padecen DM2 y periodontitis, en comparación con los pacientes que sólo padecen periodontitis o que están sanos, debido a que dichos genes están involucrados en la acetilación de histonas.

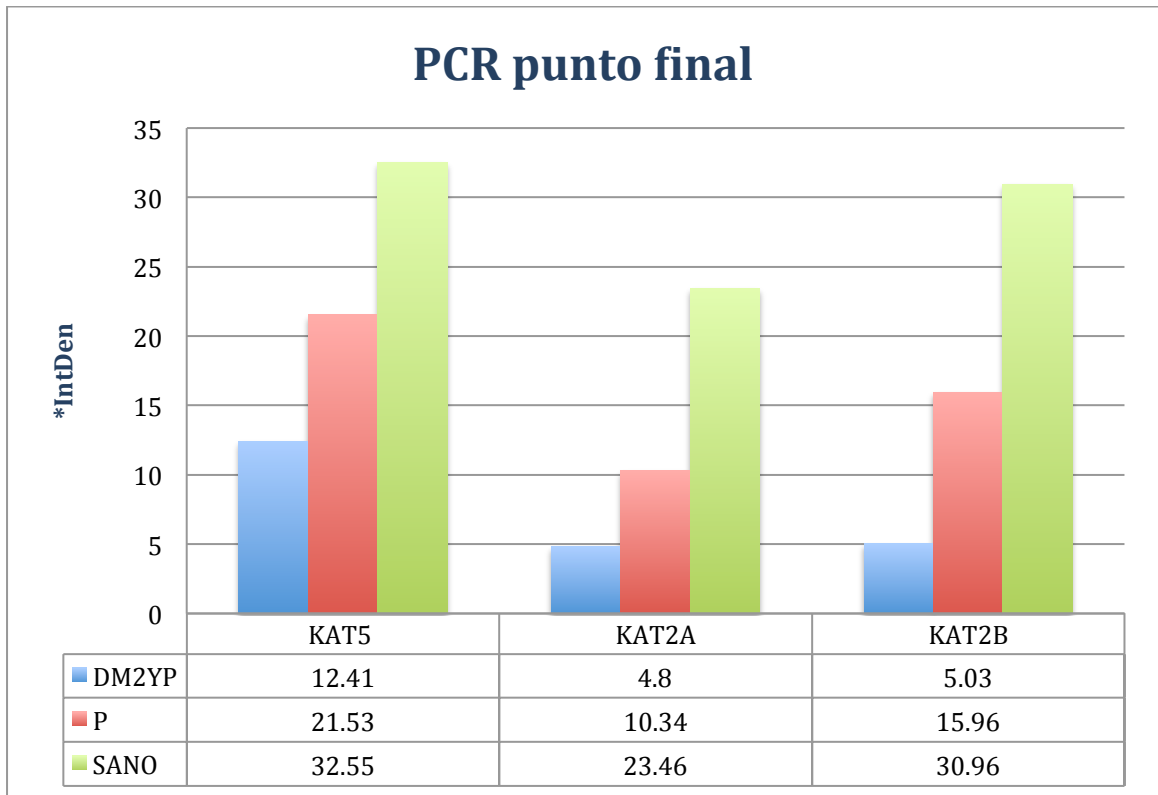


Grafico 4. PCR Punto final. La representación gráfica de la expresión de los genes **KAT5**, **KAT2A** y **KAT2B** se observa disminuidas tanto en el grupo de pacientes con DM2 y periodontitis y el grupo de pacientes con periodontitis en comparación con el grupo control. Se utilizó el gen endógeno GAPDH para el control de la expresión y del experimento. ***IntDen**= Densidad integrada relativa a la escala de la imagen (micron al cuadrado μ^2).

12 Consideraciones Éticas

- Este estudio, así como el consentimiento informado utilizado para obtener la firma del paciente participante en la investigación fueron revisados por el Comité de Ética de la ENES Unidad León, UNAM.

13 DISCUSIÓN

Actualmente, a la fecha no se ha extendido, en el campo biomédico, los genes que realizan modificaciones epigenéticas. Sin embargo, los estudios realizados muestran la relevancia que tienen las modificaciones epigenéticas en la biomedicina contribuyendo con la generación de mayor conocimiento para sentar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento en pro de la calidad de vida del ser humano que padezca enfermedades crónicas tales como la DM2, la cual se encuentra en sinergia muchas veces con enfermedades odontológicas infecciosas como es el caso de la periodontitis, lo cual puede llevar al paciente a un estado de exacerbación e incluso la muerte. Se ha demostrado que las modificaciones epigenéticas están involucradas en la transcripción positiva (estimulación de la expresión) o negativa (inhibición de la expresión) de genes a nivel nuclear o citoplasmática (Portela A. 2010), lo cual muestra la relevancia del estudio de dichos genes y de su relación con diversas enfermedades, con la dieta y con los hábitos, entre otras cuestiones ambientales (Razzouk S. 2013). En este estudio se incluyeron pacientes con periodontitis y pacientes con DM2 con periodontitis, para analizar la carga genética que presentan durante la enfermedad crónico degenerativa como la DM2 en pacientes con periodontitis. Se observaron cambios en los niveles de expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B, los cuales participan en modificaciones epigenéticas y específicamente en la acetilación de histonas (Kepler B. 2008), en función de la presencia o ausencia de DM2, por lo cual, se puede sugerir que la presencia de DM2 podría tener una participación directa en la modificación de la expresión de los genes estudiados. Por otro lado, se ha descrito la acetilación de histonas es un proceso altamente dinámico que juega un papel crucial en la regulación de la proliferación celular y de la supervivencia. El aumento en los niveles de acetilación de las histonas se ha correlacionado con la regulación transcripcional en eucromatina y heterocromatina. Este estado de regulación transcripcional se ha visto que en ocasiones desencadena diferentes tipos de enfermedades (Marmorstein R. 2009). En el presente estudio la modificación de

la expresión de los genes KAT5, KAT2A y KAT2B, los cuales participan en la acetilación de histonas, mostró una relación directa con la presencia o ausencia de DM2, por lo que se puede sugerir que la DM2 pueda influir en que haya una mayor o menor acetilación de histonas.

Se ha reportado que el equilibrio entre la acetilación y la desacetilación de histonas es importante en la formación de osteoclastos. Estudios previos han mostrado que células madre aisladas de tejido periodontal (PDLSCs) que se encuentran en el microambiente inflamatorio (característica de la enfermedad periodontal), se genera defectos en la diferenciación osteogénica que se relaciona con una baja expresión de la histona acetiltransferasa GCN5 o KAT2A.

La ausencia de expresión del gen KAT2A también ocasiona una disminución en la diferenciación osteogénica y en la expresión DKK1, inhibidor de la vía Wnt/ β -catenina, que se encuentra activo en PDLSCs. Con estas observaciones los autores concluyen que la regulación de la expresión KAT2A juega un importante papel protector en periodontitis a través de la regulación de histona H3 en lisina 9 (H3K9) e histona H3 en lisina 14 (H3K14) (Bei Li. 2016). En nuestro estudio observamos que la expresión de la histona acetiltransferasa KAT2 se inhibe en pacientes que padecen DM2 y periodontitis, en comparación con aquellos que solo tiene periodontitis, lo cual sugiere una relación entre la inhibición de KAT2 y la aceleración de la pérdida ósea que se observa clínicamente durante la periodontitis a resultando de una regulación negativa en la diferenciación osteogénica en pacientes con ambas enfermedades.

Por otra parte Wang LL, realizó estudios en personas con nefropatía diabética (DN), que se considera una complicación importante de la diabetes, mostraron que se encuentra relacionado con el aumento de la acetilación de las histonas H3K9, H3K18 y H3K23, por lo que, se determinaron los niveles de dos histonas desacetilasas HDAC (HDAC1 y HDAC2) y dos histonas acetiltransferasas HAT (PCAF y GCN5) y se observó una disminución significativa de HDAC1 mientras que PCAF aumentó y la expresión de HDAC2 y GCN5 no sufrió

cambios (Wang LL. 2012). En nuestro estudio también se observó esta disminución en los niveles de expresión de KAT2A (GCN5) y KAT2B (PCAF) en pacientes con DM2 y periodontitis comparada con la expresión de los pacientes que solo presentaban periodontitis. Con los resultados obtenidos podemos sugerir que en DM2 la expresión de KAT2A y KAT2B disminuye, lo cual podrá impactar en la transcripción de genes y la síntesis de proteínas.

Sin embargo, estudios del gen KAT2B en periodontitis lo han asociado a la enfermedad con mecanismos de regulación post-traducionales inducidos por bacterias y por la degradación de tejido. Martins *et al.* 2016 reportaron que la estimulación de células epiteliales orales con lipopolisacáridos de bacterias, eran capaces de inducir modificaciones epigenéticas en las células epiteliales orales por modificaciones de histonas, además de activar coactivadores de la transcripción como p300/CBP y la acumulación del factor nuclear-kB (NF-kB). Con base en lo anterior, los autores sugieren que la modificación de las histonas tiene un papel en el desarrollo de periodontitis (Martins MD. 2016). En nuestro estudio, además de la periodontitis, se estudió la carga epigenética de la presencia de DM2 en pacientes con periodontitis en los cuales se observó la disminución de la expresión del gen KAT2B, siendo la hipótesis satisfactoria para este caso, mostrando una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de expresión entre los grupos, por lo que se requeriría de más estudios para conocer las vías y moléculas que se modifican al disminuir la expresión de éste gen en presencia de estas dos enfermedades.

Por otra parte, las funciones de KAT5 o TIP60 son orientados a regular al muerte celular programada (apoptosis), KAT5 o TIP60 acetila p53 en la lisina 120, seguido de la acetilación transcripcional dependiente de genes pro-apoptóticos que es en cierto determinante del diseño celular en respuesta al daño del DNA (Jingjie Y. 2014). Debido a la importancia que tiene esta histona acetiltransferasa en la apoptosis, se decidió estudiar la expresión de KAT5 bajo condiciones de DM2 y periodontitis. Los resultados del análisis de KAT5 mostraron que su expresión se modifica en pacientes con periodontitis.

Respecto a nuestro estudio, es importante destacar que a pesar de las limitaciones por la falta de pacientes con las características requeridas por el estudio durante el tiempo establecido, logramos adquirir información específica de los genes KAT2A, KAT2B y KAT5, los cuales codifican para histonas acetiltransferasas que participan en la acetilación de histonas, lo cual afecta directamente la expresión de dichos genes en los pacientes con DM2 y periodontitis. Con base en lo anterior, se sugiere realizar estudios posteriores en los cuales se aumente el número tanto de pacientes como de genes involucrados en éstos y en otros tipos de modificaciones epigenéticas.

14 CONCLUSIONES

Existen escasos estudios en la literatura de la participación de genes que involucran modificaciones epigenéticas en el campo de la odontología, nuestro estudio mostro resultados en la expresión de los genes expresados en ambientes crónico inflamatorios. El conocimiento de estos genes podrían contraer e implementar nuevas estrategias para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades crónicas como la periodontitis y la DM2.

El resultado del comportamiento en la expresión de genes KAT5, KAT2A y KAT2B, especialmente KAT2A y KAT2B en la DM2, mostró que esta patología modifica la expresión de genes en pacientes con periodontitis y que esta modificación se encuentra relacionada con la transcripción de genes en forma negativa o positiva.

REFERENCIAS

Alam F. et al. DNA Methylation: An Epigenetic Insight into Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Pharm Des* 2016;22(28): p.4398-419.

Aljehani YA. et al. Risk factors of periodontal disease: Review of the literature. *Int J Dent* 2014;2014: 182513.

Allfrey VG. et al. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1964;51: p.786-794.

Allis CD. et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 2007;131: p. 633-636.

Ambros V. et al. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. Elegans*. *Curr Biol* 2003;13: p.807–818.

American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:S8–16.

Andia DC. et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(9): p.1336-1341.

Ari G. et al. Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review. *J Clin Diagn Res* 2016;10(11): p.07-09.

Armitage GC. et al. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2014;34(1): p. 9-21.

Azura V. et al. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 2006;8(5): p.532-8.

Balasubramanyam K. et al. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem* 2003;278(21):19134-40.

Balasubramanyam K. et al. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a

natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem* 2004;279(32): p.33716–26.

Balasubramanyam K. et al. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 2004;279(49):51163–71.

Bartel DP. et al. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.

Bartel DP. et al. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): p. 215-33.

Barros SP. et al. Modifiable risk factors in periodontal disease: epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. *Periodontol 2000* 2014;64(1):p. 95–110.

Barros SP. et al. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res* 2009;88(5): p 400-8.

Bascones-Martínez A. et al. [Diabetes and periodontitis: A bidirectional relationship] *Med Clin (Barc)* 2015;145(1): p. 31–5.

Bannister AJ. et al. Reversing histone methylation. *Nature* 2005;439(7054): p.1103-6.

Bernstein BE. et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 2005;120(2): 169-81.

Beverley M. et al. Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chem Rev* 2015;115(6): p.2419-52.

Brian R. et al. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 1. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12(10): p.1301-21.

Brown CE. et al. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 2000;25: p.15-19.

Borrow J. et al. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 1996;14(1): p. 33-41.

Bobetsis YA. et al. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res* 2007;86:169-174.

Brunetti A. et al. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2014;5(2): p.128-40.

Cantley MD. et al. Histone deacetylase inhibitors and periodontal bone loss. *J Periodontal Res* 2011;46:p.697-703.

Chakrabarti SK. et al. Covalent histone modifications underlie the developmental regulation of insulin gene transcription in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2003; p. 278: 23617–23.

Christopher P. et al. An Epigen clue to diabetic vascular disease. *Circ Res* 2008; 103(6): p. 568-70.

Cullis PM. et al. Inhibition of histone acetylation by N-[2-(S-coenzyme A)acetyl] spermidine amide, a multisubstrate analog. *J Biol Chem* 1982;257(20): p. 12165-9.

Daehyun B. et al. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455(7209): p.64-71.

de Camargo Pereira G, et al. *Porphyromonas gingivalis* LPS stimulation downregulates DNMT1, DNMT3a, and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT keratinocytes. *Clin Oral Investig* 2013;17: p.1279-1285.

de Faria Amormino SA. et al. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Hum Immunol* 2013;74(9): p.1231–6.

Di Benedetto A. et al. Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol* 2013;Vol. 2013: p. 503754.

Diehl P. et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 2012;93: p.633–44.

Esteller M. et al. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8(4):286-98.

Esteller M. et al. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007;16(1): p. 50-9.

Esteller M. et al. Epigenetics in evolution and disease. *Lancet* 2008;372(December 2008):p. S90–6.

Estéve PO. et al. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(13): p.5076-81.

Fermín I. et al. Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones. *Rev Chil endocrinol diabetes* 2013;6(3): p. 108 –14.

Filipowicz W. et al. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet* 2008;9(2):102-14.

Francesco P. et al. Epigenetic mechanism of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Clin Epigenetics* 2015;7(1): p.56.

Francis J et al. Pdx-1 links histone H3-Lys-4 methylation to RNA polymerase II elongation during activation of insulin transcription. *J Biol Chem* 2005;280: p. 36244– 36253.

Georgakopoulos T. et al. Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J* 1992;11: p.4145-4152.

Graves DT. et al. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74(3): p.391–401.

Haumaitre C. et al. Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol* 2008;28: p.6373-83.

Hebbes TR. et al. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 1988;7: p.1395-1402.

Hegarty SV. et al. A small molecule activator of p300/CBP histone acetyltransferase promotes survival and neurite growth in a cellular model of parkinson's disease. *Neurotox Res* 2016; 30(3): p.510-520.

Highfield J. et al. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009;54: p.11-26.

Houbaviy HB. et al. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA* 2005;11: p.1245–1257.

Huili G., Nicholas T. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835-840.

Igari K. et al. Association between periodontitis and the development of systemic diseases. *Oral Biol Dent* 2014;2: p.4.

International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 7th edition. [idf.org](http://www.diabetesatlas.org/). 2015;<http://www.diabetesatlas.org/>

Imai K. et al. Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. *J Immunol* 2009;182: p.3688-95.

Imai K. et al. Role of histone modification on transcriptional regulation and HIV-1 gene expression: possible mechanisms of periodontal diseases in

AIDS progression. *J Oral Sci* 2011;53(1): p. 1–13.

Izzo A., et al. The role of linker histone H1 modifications in the regulation of gene expression and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 2016;1859(3): p.486–95.

Jingjie Yi. et al. Regulation of histone acetyltransferase TIP60 function by histone deacetylase 3. *J Biol Chem* 2014;289(49): 33878-86.

Kassebaum NJ. et al. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 2014;93(11): p.1045-53.

Kacem S. et al. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome* 2009;20(9-10): p.544-56.

Karachanak-Yankova S. et al. Epigenetic alterations in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Genet* 2015;18(2): p.15-24.

Kepler BR., et al. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 1. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12(10): p. 1301-02.

Kim J. et al. Periodontal disease and systemic conditions: A bidirectional relationship. *Odontology* 2006;94(1): p. 10–21.

Kim TI. et al. Analysis of histone deacetylase inhibitor-induced responses in human periodontal ligament fibroblasts. *Biotechnol Lett* 2013;35(1): p.129-133.

Kim VN. et al. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes Dev* 2006;20(15): p.1993-7.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128(4):p. 693-705.

Kuroda A. et al. Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left–right asymmetry pathway in snails. *Nature* 2009;462: p.790-794.

Lagos-Quintana M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294: p.853–858.

Larsson L. Epigenetics and its role in periodontal diseases: a state-of-the-art review. *J Periodontol* 2015;86(4): p.556-68.

Larsson L. et al. Influence of epigenetic modifications of the interleukin-10 promoter on IL10 gene expression. *Eur J Oral Sci* 2012;120: p.14-20.

Lau OD. et al. HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* 2000;5(3): p.589–95.

Lee KK. et al. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(4): p.284–95.

Lee Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23: p.4051–4060.

Li B. et al. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007;128(4): p. 07-719.

Li B. et al. GCN5 modulates osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through DKK1 acetylation in inflammatory microenvironment. *Sci Rep* 2016;6: 26542.

Lindhe J. et al. Periodontología clínica e implantología odontológica. *Editorial Médica Panamericana* 2009. p. 590

Lindroth AM. and Park YJ. Epigenetic biomarkers: A step forward for understanding periodontitis. *J Periodontal Implant Sci* 2013;43(3): p.111-20.

Ling C. and Groop L. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 2009;58(12): p.2718-25.

Ling C. et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin

secretion. *Diabetologia* 2008;51: p.615– 622.

Ling C. et al. Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUFB6 in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 2007;117: p.3427– 3435.

Li Y. et al. Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB- dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J Biol Chem* 2008;283(39): p. 26771-81.

Martinez-Iglesias O. et al. Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clin Transl Oncol* 2008;10: p.395-398.

Martins MD. et al. Epigenetic modifications of histones in periodontal disease. *J Dent Res* 2016;95(2): 215-222.

Marmorstein R. Structure of histone acetyltransferases. *J Mol Biol* 2001;311(3): p. 433–44.

Melzner I. et al. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem* 2002;277: p.45420–27.

Miao F. et al. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J Biol Chem* 2004;279(17): p.1809-7.

Miao D. et al. *Treponema denticola* upregulates MMP-2 activation in periodontal ligament cells: interplay between epigenetics and periodontal infection. *Arch Oral Biol* 2014;59(10): p.1056-64.

Milagro FI. et al. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009;65: p.1– 9.

Mosley AL., Ozcan S. The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-

1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem* 2004;279(52): p. 54241-7.

Marmorstein R. Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta* 2009;p. 58-68.

Olivieri F. et al. Anti-inflammatory effect of ubiquinol-10 on young and senescent endothelial cells via miR-146a modulation. *Free Radic Biol Med* 2013;63: p.410–20.

Olivieri F. et al. Circulating inflamma-miRs in aging and age-related diseases. *Front Genet* 2013;4: p.121.

Patti ME. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(14): p.8466-71.

Perron MP. and Provost P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci* 2008;1(13): p.2537-47.

Pfeffer S. et al. Identification of microRNAs of the herpesviridae family. *Nat Methods* 2005;2: p.269–276.

Prajapati B. et al. Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) crosstalk in type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(3): p.190–200.

Pranckeviciene A. et al. Severity of periodontal disease in adult patients with diabetes mellitus in relation to the type of diabetes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014;158(1): p.117–23.

Portela A. et al. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28(10): p.1057–68.

Puigserver P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and

metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003;24: p.78– 90.

Puri PL. et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell*. 1997;1(1): p.35–45.

Qiu Y. et al. Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol* 2002;22: p.412– 420.

Razzouk S. and Sarkis R. Smoking and diabetes. Epigenetics involvement in osseointegration. *N Y State Dent J* 2013;79(2):p. 27–30.

Retzepi M. & Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(7): p.673-81.

Rizky Aditya Irwandi and Anjalee Vacharaksa. The role of microRNA in periodontal tissue: *A review of the literature* 2016;72: p.66-74.

Robles RG., Ayala Ramírez PA. and Perdomo Velásquez SP. Epigenética: Definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud* 2012;(10): p. 59 – 71.

Rodríguez A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14: p.1902–1910.

Rönn T. et al. Age influence DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2008;51(7): p. 1159-68.

Roth SY. et al. Histone acetyltransferases. *Ann Rev Biochem* 2001;70: p.81–120.

Rouaux C. et al. Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochem Pharmacol* 2004;68(6): p.1157–64.

Sarma K. et al. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*

2005;6: p.139-149.

Santos-Rosa H. et al. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 2005;41: p.2381-2402.

Straussman R. et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(5): p.564-71.

Schwer B. et al. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab* 2008;7: p.104– 112.

Shanmugam N. et al. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 2003;52(2):1256-64.

Shilatifard A. et al. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 2006;75: p. 243-269.

Stephane E. et al. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet* 2013; 14: p.100-112.

Stefani FA. et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology* 2013;218(7): p. 1012-7.

Strowig T. et al. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012;481(7381):278-86.

Spazzafumo L. et al. Remodelling of biological parameters during human ageing: evidence for complex regulation in longevity and in type 2 diabetes. *Age (Dordr)* 2013;35(2):419–29.

Taverna SD. et al. How chromatin-binding modules interpret histone

modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14: p.1025-1040.

Tateishi K. et al. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* 2009;458: p.757– 761.

Taylor JJ. et al. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol* 2013;40(14): p. 113-34.

Taylor GW. et al. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6(1):99 –112.

Thompson JP. et al. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 2010;464(7291): p.1082-6.

Yang XJ. et al. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* 2008;31(4):449-61.

Yang XJ. et al. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3): p.959–76.

Yousefzadeh N. et al. Deregulation of NF- κ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Physiol Biochem* 2015;71(1): p.51–8.

Valinluck V. et al. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007;67(3): p.946-50.

Villeneuve LM. et al. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(26):9047-52.

Vel Szic KS. et al. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin Epigenetics* 2015;7(1): p.33.

Wang LL. et al. Elevant histone acetylations in muller cell contribute to inflammation: A novel inhibitory effect of minocycline. *GLIA* 2012;60(12): 1896-1905.

Wang T-F. et al. Effects of periodontal therapy on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus and periodontal disease: a meta-analysis. *Medicine* 2014;93(28): p. 292.

Watson J.D. et al. *Molecular Biology of the Gene* 2004. 5^o Edición.

Wellen KE. et al. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 2009;324(5930):1076-80.

Wegner M. et al. Role of epigenetic mechanisms in the development of chronic complications of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;105(2): p.164-75.

Wilson AG. et al. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol* 2008;79(8):p. 1514–9.

Yang XJ. et al. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* 2008;31(4): p. 449-461.

Yang CJ. et al. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 2004;26(10):1076-87.

Zampetaki A. et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010;107(6):810–7.

Zilberman D. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns.

Development 2007;134(22): p.3959-65.

Zhang S. et al. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. *J Dent Res* 2010;89(2):133–7.

Zhang S. et al. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37(11):953–61.

Zhang S. et al. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. *J Periodontol* 2013;84(11): p.1606-16.

Zhang Y et al. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;15(18): p.2343-60.

Zhou X. et al. Epigenetic modifications are associated with inter-species gene expression variation in primates. *Nucleic Acid Res* 2014;42(11): p. 91.

Zhu H. et al. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetologia* 2015;58(5): p.900–11.

ANEXOS

ANEXO 1

Consentimiento Informado	
Título	"Estudio de la expresión de genes que participan en modificaciones epigenéticas en pacientes con pérdida ósea alveolar con y sin diabetes mellitus tipo 2"
Número de Protocolo	
Patrocinador	
Investigador Principal	C.D. Christian Alejandra Manríquez Pérez Bosques del Valle 208 Edif. I int. 12 Bosques de la Presa C.P. 37179 León, Guanajuato Tel: 477 521 33 46
Co-Investigador	Dr. Julio César Vega Arreguín
Lugar	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36969, León Guanajuato.
Contacto para Información/Preguntas del Estudio	Christian Alejandra Manríquez Pérez Cel: 477 521 33 46
Introducción	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda siguiente explicación sobre el estudio de investigación propuesto. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio. Éste también describe los procedimientos alternativos que están disponibles para usted y su derecho de retirarse del estudio.

	en cualquier momento. No hay garantías o aseguramientos que podrán hacerse como resultados del estudio.
--	---

Propósito	El propósito de esta investigación es determinar los niveles de expresión de genes que participan en modificaciones epigenéticas en pacientes con pérdida ósea alveolar con y sin Diabetes Mellitus tipo 2.
-----------	---

Población de los participantes	Para participar en esta investigación usted tendrá que:	
	Paciente diabético	<ul style="list-style-type: none"> - Tener al menos 18 años de edad. - Tener diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 de 10 años máximo. - No tener un control adecuado de la Diabetes Mellitus tipo 2. - Tener Periodontitis. - Estar registrado para asistir a las visitas dentales. - Firmar este Informe de Consentimiento.
	Paciente con periodontitis	<ul style="list-style-type: none"> - Tener al menos 18 años de edad. - Tener Periodontitis. - Firmar este Informe de Consentimiento.
	Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener al menos 18 años de edad. - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento.
<p>No será permitido su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Considera estar en etapa de menopausia (mujeres). - Tiene alguna enfermedad endocrinas diagnosticada. - Consumir estrógenos. - Tiene alguna enfermedad de tejido conectivo diagnosticada. - Si fuma. 		

	<p>- Tiene cáncer.</p> <p>- Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada.</p> <p>- Si tiene alguna enfermedad sistémica diagnosticada (excepto si es paciente diabético).</p> <p>- Tiene infección urinaria</p> <p>- Está embarazada o se encuentra bajo lactancia.</p> <p>Si usted califica, usted será uno de los 80 participantes que participarán en este estudio.</p>
<p>Procedimientos (Aproximadamente 15 minutos)</p>	<p>A usted se le pedirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leer y firmar este formulario de Informe de Consentimiento. • Preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio. • Preguntas acerca de su estado actual de salud. • Cuando usted se cepilló los dientes por última vez. • Participar en la toma de muestra de tejido de granulación durante el tratamiento de raspado y alisado realizado por su doctor encargado del mismo, se administra anestesia local al paciente enfermo periodontal, se realizará tratamiento del raspado y alisado donde se retirará el tejido de granulación como parte del procedimiento y se conservará en Phosphate-buffered saline (PBS). En el caso de los pacientes sanos (grupo control), la muestra de tejido periodontal se obtendrá de los pacientes que tengan indicación de extracción de terceros molares de los cuales se retirará el tejido periodontal en el laboratorio.
Riesgos e Inconformidades	<p>Se le informa que la toma de muestra de tejido de granulación que se retira durante el tratamiento de raspado y alisado es considerada una técnica invasiva con riesgo mínimo al igual que la extracción de terceros molares.</p>
Beneficios	<p>No hay beneficios por participar en este estudio.</p>
Costos	<p>No hay costo por la cual usted participe en este estudio, otro que su tiempo.</p>
Pagos por su participación	<p>No hay ningún pago por la participación en este estudio.</p>
Procedimientos Alternativos.	<p>Los que el odontólogo indique para conservar o mejorar su cuidado bucal. Al igual que se le ofrece información sobre lugares donde puedan recibir atención médica para el control de la DM2.</p>
Confidencialidad	<p>El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basadas en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1999. Donde solo se accede al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética, las autoridades sanitarias o los inspectores de auditoría encaminados a validar la fiabilidad de los datos, se protegerá su intimidad y será imposible su identificación.</p>

	comunicaciones o publicaciones científicas.		
Compensación por lesiones	Usted no será compensado por cualquier lesión que ocurra como resultado de su participación en el estudio y/o procedimientos; compensaciones financieras por el tratamiento médico, pérdida de salario u otras pérdidas no están disponibles.		
Participación Voluntario y Retiro	Su decisión de participar en este estudio es voluntaria. Usted puede elegir de no participar o retirarse del estudio por cualquier razón sin penalización o pérdida de los beneficios a los cuales usted tiene derecho ningún efecto sobre su atención médica futura.		
Preocupaciones acerca de sus derechos	Si usted tiene cualquier pregunta acerca de sus derechos como participante de investigación, preocupaciones o quejas acerca de este estudio de investigación, usted debería escribir (nombre de la compañía, dirección y número de teléfono y horas de trabajo), no firme este formulario de consentimiento menos que usted no tenga tiempo de hacer preguntas y haber obtenido respuestas satisfactorias.		
Consentimiento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. He tenido oportunidad de hacer preguntas y todas las mismas han sido respondidas satisfactoriamente voluntariamente acepto participar en este estudio hasta que decida lo contrario. Yo no renuncio cualquiera de mis derechos legales al firmar este documento de consentimiento. Yo recibiré una copia de este documento de consentimiento firmado.</i> 		
Firma del Participante			
	Nombre	Firma	Fecha
Firma del Testigo			
	Nombre	Firma	Fecha

ANEXO 2

TRIzol™ Reagent Invitrogen

Preparing Samples

Homogenizing samples

1. Determine your sample type, and perform homogenization at room temperature according to the table below. **A ratio of 3:1 should always be maintained between the volume TRIzol® LS Reagent and the volume of the sample.** Be sure to use the indicated amount of TRIzol® LS Reagent, because an insufficient volume can result in DNA contamination of isolated RNA.

Note: To facilitate isolation of RNA from small quantities of samples (<10⁶ cells or <10 mg tissue) or for sample volumes <0.25 mL, adjust the sample volume to 0.25 mL by adding RNase-free water.

Tissues	<ol style="list-style-type: none">1. Add 0.75 mL of TRIzol® LS Reagent per 50–100 mg of tissue sample, or per 0.25 mL of tissue suspension.2. Homogenize sample using a glass-Teflon® or power homogenizer. Note: Process or freeze tissue samples <i>immediately</i> after collection. Do not process undiluted solid samples.
---------	---

Phase separation

1. Incubate the homogenized sample (see **Homogenizing samples**) for 5 minutes at room temperature to permit complete dissociation of the nucleoprotein complex.
2. Add 0.2 mL of chloroform per 0.75 mL of TRIzol[®] LS Reagent used for homogenization. Cap the tube securely.
3. Shake tube vigorously by hand for 15 seconds.
4. Incubate for 2–15 minutes at room temperature.
5. Centrifuge the sample at 12,000 × *g* for 15 minutes at 4°C.
Note: The mixture separates into a lower red phenol-chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. *RNA remains exclusively in the aqueous phase.* The upper aqueous phase is ~70% of the initial volume of TRIzol[®] LS Reagent used for homogenization.
6. Remove the aqueous phase of the sample by angling the tube at 45° and pipetting the solution out. Avoid drawing any of the interphase or organic layer into the pipette when removing the aqueous phase.
7. Place the aqueous phase into a **new** tube and proceed to the **RNA Isolation Procedure**.
8. Save the interphase and organic phenol-chloroform phase if isolation of DNA or protein is desired. See **DNA Isolation Procedure** and **Protein Isolation Procedure** for details. The organic phase can be stored at 4°C overnight.

RNA Isolation Procedure

Always use the appropriate precautions to avoid RNase contamination when preparing and handling RNA.

RNA precipitation

1. (*Optional*) When precipitating RNA from small sample quantities ($<10^6$ cells or <10 mg tissue), add 5–10 μg of RNase-free glycogen as a carrier to the aqueous phase.
Note: Glycogen is co-precipitated with the RNA, but does not inhibit first-strand synthesis at concentrations ≤ 4 mg/mL, and does not inhibit PCR.
2. Add 0.5 mL of 100% isopropanol to the aqueous phase, per 0.75 mL TRIzol[®] LS Reagent used for homogenization.
3. Incubate at room temperature for 10 minutes.
4. Centrifuge at $12,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C .
Note: The RNA is often invisible prior to centrifugation, and forms a gel-like pellet on the side and bottom of the tube.
5. Proceed to **RNA wash and resuspension**.

RNA wash and resuspension

1. Remove the supernatant from the tube, leaving only the RNA pellet.
2. Wash the RNA pellet, with 1 mL of 75% ethanol per 0.75 mL of TRIzol[®] LS Reagent used for the initial homogenization. Vortex the sample to mix.
3. Centrifuge the sample at $7500 \times g$ for 5 minutes at 4°C , and discard the supernatant.
4. Vacuum or air dry the RNA pellet for 5–10 minutes. Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.
Note: Do not allow the RNA to dry completely, because the pellet can lose solubility. Partially dissolved RNA samples have an $A_{260/280}$ ratio <1.6 .
5. Resuspend the RNA pellet in RNase-free water or 0.5% SDS solution (20–50 μL) by passing the solution up and down several times through a pipette tip.
Note: Do not dissolve the RNA in 0.5% SDS if it is to be used in subsequent enzymatic reactions.
6. Incubate in a water bath or heat block set at $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$ for 10–15 minutes.
7. Proceed to downstream application, or store at -70°C .

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596018>

ANEXO 3

Purificación de RNA con tratamiento DNasa I

Removal of genomic DNA from RNA preparations

1. Add to an RNase-free tube:

RNA	1 μ g
10X reaction buffer with MgCl ₂	1 μ L
DNase I, RNase-free (#EN0521)	1 μ L (1 U)
DEPC-treated Water (#R0601)	to 10 μ L

2. Incubate at 37 °C for 30 min.
3. Add 1 μ L 50 mM EDTA and incubate at 65 °C for 10 min. RNA hydrolyzes during heating with divalent cations in the absence of a chelating agent (5). Alternatively, use phenol/chloroform extraction.
4. Use the prepared RNA as a template for reverse transcriptase.

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0525>

ANEXO 4

SuperScript™ II Reverse Transcriptase

First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT

A 20- μ L reaction volume can be used for 1 ng–5 μ g of total RNA or 1–500 ng of mRNA.

1. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:

Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL) <i>or</i>	1 μ L
50–250 ng random primers <i>or</i>	
2 pmole gene-specific primer (GSP)	
1 ng to 5 μ g total RNA <i>or</i>	x μ L
1–500 ng of mRNA	
1 μ L dNTP Mix (10 mM each)	1 μ L
Sterile, distilled water	to 12 μ L
2. Heat mixture to 65°C for 5 min and quick chill on ice. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and add:

5X First-Strand Buffer	4 μ L
0.1 M DTT	2 μ L
RNaseOUT™ (40 units/ μ L) (optional)*	1 μ L

*RNaseOUT™ (Cat. No. 10777-019) is required if using <50 ng starting RNA.
3. Mix contents of the tube gently. If you are using oligo(dT)₁₂₋₁₈ or GSP, incubate at 42°C for 2 min. If you are using random primers, incubate at 25°C for 2 min.
4. Add 1 μ L (200 units) of SuperScript™ II RT and mix by pipetting gently up and down.
If you are using less than 1 ng of RNA, reduce the amount of SuperScript™ II RT to 0.25 μ L (50 units) and add sterile, distilled water to a 20 μ L final volume.
If you are using random primers, incubate tube at 25°C for 10 min.
5. Incubate at 42°C for 50 min.
6. Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 min.

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18064014>

ANEXO 5

Prueba de primers con Taq DNA polymerase de 500 U.

PROTOCOL

To prepare several parallel reactions and to minimize the possibility of pipetting errors, prepare a PCR master mix by mixing water, buffer, dNTPs, primers and Taq DNA Polymerase. Prepare sufficient master mix for the number of reactions plus one extra. Aliquot the master mix into individual PCR tubes and then add template DNA.

1. Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing.
2. Place a thin-walled PCR tube on ice and add the following components for each 50 μ L reaction:

10X Taq Buffer	5 μ L
dNTP Mix, 2 mM each (#R0241)	5 μ L (0.2 mM of each)
Forward primer	0.1-1.0 μ M
Reverse primer	0.1-1.0 μ M
25 mM MgCl ₂ *	1-4 mM
Template DNA	10 pg - 1 μ g
Taq DNA Polymerase	1.25 U
Water, nuclease-free (#R0581)	to 50 μ L
Total volume	50 μL

*Volumes of 25 mM MgCl₂, required for specific final MgCl₂ concentration:

Final concentration of MgCl ₂ , mM	1	1.5	2	2.5	3	4
Volume of 25 mM MgCl ₂ to be added for 50 μ L reaction, μ L	2	3	4	5	6	8

3. Gently vortex the samples and spin down.
4. If using a thermal cycler that does not use a heated lid, overlay the reaction mixture with 25 μL of mineral oil.
5. Perform PCR using recommended thermal cycling conditions:

Step	Temperature, $^{\circ}\text{C}$	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	1-3 min	1
Denaturation	95	30 s	25-40
Annealing	T_m-5	30 s	
Extension	72	1 min/kb	
Final Extension	72	5-15 min	1

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EP0402>

ANEXO 6

PCR tiempo real

PROTOCOL

Reaction set-up

1. Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing.
2. Prepare a reaction master mix by adding the following components (except template DNA) for each 25 μ l reaction to a tube at room temperature:

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)*	12.5 μ l
Forward Primer	0.3 μ M**
Reverse Primer	0.3 μ M**
Template DNA	\leq 500 ng
Water, nuclease-free	to 25 μ l
Total volume	25 μ l***

* Provides a final concentration of 2.5 mM MgCl₂.

** A final primer concentration of 0.3 μ M is optimal in most cases, but may be individually optimized in a range of 0.05 μ M to 0.9 μ M.

*** Other reaction volumes can be used if recommended for a specific instrument.

3. Mix the master mix thoroughly and dispense appropriate volumes into PCR tubes or plates.
4. Add template DNA (\leq 500 ng/reaction) to the individual PCR tubes or wells containing the master mix.

Note. For two-step RT-qPCR, the volume of the cDNA added from the RT reaction should not exceed 10% of the final PCR volume.

5. Gently mix the reactions without creating bubbles (do not vortex). Centrifuge briefly if needed. Bubbles will interfere with fluorescence detection.
6. Program the thermal cycler according to the recommendations below, place the samples in the cycler and start the program.

Two-step cycling protocol

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
<i>Optional:</i> UDG pre-treatment	50	2 min	1
Initial denaturation	95	10 min	1
Denaturation	95	15 s	40
Annealing/Extension	60	60 s	

Data acquisition should be performed during the annealing/extension step.

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0221>

