



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación**

Laboratorio de Genética Molecular

**Distribución de variaciones genéticas en los genes
de la familia de interleucina 1 (IL-1) en sujetos
mexicanos con periodontitis crónica, periodontitis
agresiva y salud periodontal**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Odontológicas

PRESENTA

C.D. Nadia Edna Páez Galeana

TUTORA

Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie



México D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	3
Antecedentes.....	3
Generalidades de las enfermedades periodontales.....	3
Clasificación de las enfermedades periodontales.....	4
Patogenia de las enfermedades periodontales.....	9
Papel de la interleucina 1 (IL-1).....	10
Factores de riesgo.....	13
Influencia de las variaciones genéticas.....	15
Diagnóstico genético de las enfermedades periodontales.....	18
Planteamiento del problema y justificación.....	20
Objetivos.....	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	23
Diseño experimental.....	23
Población de estudio.....	23
Criterios de selección.....	24
Evaluación clínica.....	24
Evaluación genética.....	25
Recolección y procesamiento de muestras.....	25
Muestras de sangre.....	25
Muestras de células epiteliales de mejilla.....	26
Detección de variaciones genéticas.....	26
Análisis estadístico de datos.....	27
Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas individuales.....	28
Comparación de alelos y genotipos individuales.....	30
Generación de variables con alelos y genotipos combinados (haplotipos).....	31
Comparación de haplotipos entre grupos de estudio.....	32

Selección de haplotipos	33
Fase 1. En base a los análisis estadísticos	33
Fase 2. En base a redundancias.....	33
Propuesta de marcadores genéticos	33
Evaluación del genotipo PST™	34
III. RESULTADOS.....	35
Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas individuales.....	35
Comparación de alelos y genotipos individuales.....	38
Generación de variables con alelos y genotipos combinados (haplotipos)	41
Comparación de haplotipos entre grupos de estudio	42
Selección de haplotipos	43
Fase 1. En base a los análisis estadísticos.....	43
Fase 2. En base a redundancias	43
Propuesta de marcadores genéticos	45
Evaluación del genotipo PST™	46
IV. DISCUSIÓN.....	48
V. CONCLUSIONES.....	62
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
VII. TABLAS	77
VIII. FIGURAS	85
IX. ANEXOS.....	108
Anexo 1. Formato de consentimiento informado	108
Anexo 2. Índice de tablas	113
Anexo 3. Índice de figuras	114



AGRADECIMIENTOS

No encontraría realmente las palabras suficientes para describir el agradecimiento y la gratitud que tengo que externar hacia cada uno de ustedes, porque sin duda sin su participación, apoyo y sus palabras de aliento fueron los mejores alicientes para levantarme y seguir adelante en la culminación de este proyecto. Gracias a todos ustedes quienes directa o indirectamente son partícipes en otro logro más en mi vida, cada parte de este proyecto es un pequeño gran fragmento que deseo compartir con ustedes.

A mis padres.....Los amo, a mi manera pero los amo
A mi abuelita.....Maty te adoro
Cynthia y Roberto.....Gracias por ser mis mejores amigos

Por que llegaste a mi vida de una forma tan inesperada, dándole un nuevo aire a mi existencia, pero sobretodo porque les das un nuevo significado al amor. Gracias Jorge por tu gran apoyo y porque estoy segura de que juntos damos inicio a una nueva y buena etapa en nuestras vidas Te amoooo!!!

Quien constituyo parte fundamental de mi formación académica y que es ejemplo de una gran mujer:

Dra. Laurie Ann gracias por su apoyo, pero sobretodo por su amistad.

Durante este trayecto tuve la fortuna de poder conocer a alguien que se robo mi corazón y se ha colocado en un lugar importante en mi vida, gracias Dra. Anita porque sin usted toda mi esperanza se hubiera perdido, pero hizo que nuevamente pudiera recuperarla y creer en mí.

A todos y cada uno de los integrantes de este laboratorio Adri, Paty y Arge gracias por su ayuda, paciencia y su amistad.

Sandy y Alice mi más grande agradecimiento por trabajar conmigo hombro a hombro pero sobretodo por su paciencia y perseverancia.

Todos aquellos que se volvieron, son, y serán parte de mi familia“mis amigos” sin su apoyo tampoco hubiese sido posible: Viri, Gaby, Dolores, Ana, Dany, Irene, Blanca, Dalia, Carmen, Aldo y Arturo.

Porque seguimos y seguiremos juntos celebrando nuestros logros: Mel, Efrain, Jose Luis, César, Ger, Christian, Neyra, Marissa y Nasheli.

RESUMEN

Las variaciones genéticas en la familia de genes de la interleucina-1 (IL-1) tienen influencia sobre los mecanismos de producción de proteínas, y por lo tanto sobre la susceptibilidad y riesgo de los individuos a presentar enfermedad periodontal. En la actualidad existe una prueba patentada (PST™) para determinar la susceptibilidad a la periodontitis crónica que fue validada en poblaciones caucásicas. **Objetivos:** 1. Describir la distribución de las variaciones genéticas 1L1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C e IL1RN:c.215-516(86)[2_6] en sujetos mexicanos con periodontitis crónica generalizada (PCG), periodontitis agresiva generalizada (PAG) y salud periodontal (SP); 2. Evaluar las asociaciones de alelos y genotipos individuales, así como de haplotipos de dichas variaciones con la PCG y PAG; y 3. Determinar la eficacia de la prueba PST™ como marcador de la periodontitis en la población mexicana. **Métodos:** Se analizaron muestras de DNA de 127 sujetos (58 PCG, 27 PAG, 42 SP) mediante secuenciación y RFLP; los resultados se analizaron mediante la utilización de un modelo matemático-estadístico diseñado para este proyecto. **Resultados:** Cuando los alelos y genotipos fueron analizados de forma individual mostraron poca relevancia para marcar a los grupos experimentales con enfermedad. Se determinó que 2 haplotipos fueron buenos estimadores de riesgo para marcar específicamente al grupo PAG y separarlo de los grupos PCG y SP. La prueba PST™ no fue un buen marcador de riesgo de la periodontitis en la población mexicana. **Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que los haplotipos identificados podrían ser considerados como marcadores efectivos de susceptibilidad y riesgo a la PAG en la población mexicana.

I. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Generalidades de las enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son infecciones endógenas mixtas; es decir, infecciones en las que intervienen varias especies bacterianas que forman parte de la flora comensal o endógena de la placa dentobacteriana. Dichas infecciones causan inflamación de los tejidos de soporte del diente que puede llevar a la pérdida progresiva del hueso y del tejido conectivo (**Irfan *et al.* 2001**, **Ishikawa *et al.* 1997**), y representan la principal causa de pérdida dental en la población adulta a nivel mundial.

Los dos cuadros patológicos que distinguen a las enfermedades periodontales son la gingivitis y la periodontitis (**Armitage 1999**). La gingivitis se caracteriza por lesiones inflamatorias de los tejidos blandos que rodean al diente y se presenta como una consecuencia de la acumulación local de microorganismos específicos en la placa dentobacteriana (**Page & Schroeder 1976**). Este tipo de enfermedad periodontal puede persistir durante años sin destrucción del ligamento periodontal o pérdida ósea (**Amano *et al.* 2001**). A diferencia de la gingivitis, la respuesta inmune que se da en la periodontitis debido a la presencia crónica de grupos específicos de bacterias en la placa dentobacteriana, da lugar a la destrucción de los componentes estructurales del periodonto, misma que se caracteriza por destrucción tisular y pérdida ósea en grados variables dependiendo del progreso de la enfermedad (**Preshaw *et al.* 2004**).

Desde el nacimiento hasta la muerte, la cavidad bucal es colonizada por aproximadamente 400 a 500 especies bacterianas diferentes (**Socransky & Haffajee 1994**). A pesar de que varias de estas especies son comunes entre individuos, cada persona posee una microbiota característica. A

la fecha, se estima que de las especies bacterianas capaces de colonizar la placa dentobacteriana, alrededor de 150 forman parte de la flora comensal o endógena. Sin embargo, aún no está claro si las diferencias individuales en la composición de la placa dentobacteriana y los efectos de algunas especies en particular sobre el periodonto, están controlados por factores ambientales, genéticos, inmunológicos, microbianos o por una combinación de éstos **(Moore et al. 1993)**.

Lo cierto es que existe un equilibrio dinámico entre los microorganismos de la placa dentobacteriana y el sistema inmunológico del hospedero. Por una parte, las bacterias de la placa dentobacteriana han adquirido estrategias de supervivencia que favorecen su crecimiento en este ambiente, mientras que el sistema inmunológico procura limitar su crecimiento por medio de una combinación de respuestas innatas y adquiridas **(Haffajee et al. 1988)**. Esto no es normalmente un proceso dañino, sino que representa una interacción altamente evolucionada entre la flora endógena y el hospedero. Las bacterias liberan antígenos que el hospedero reconoce como extraños y bajo condiciones de salud, el sistema inmunológico mantiene una defensa efectiva limitando su proliferación. Sin embargo, bajo determinadas condiciones, incluyendo la adquisición de especies nuevas, el sobre-crecimiento de especies endógenas, la deficiencia del sistema de defensa, y la susceptibilidad del hospedero, las bacterias pueden iniciar un proceso de inflamación destructiva del periodonto **(Socransky & Haffajee 1992)**.

Clasificación de las enfermedades periodontales

La clasificación y descripción de las enfermedades periodontales han evolucionado de acuerdo a la aparición de nueva información relacionada con su etiología, patogenia y presentación clínica. Este proceso, sin duda continuará a medida que nuestros conocimientos acerca de dichas enfermedades se profundicen. En la década de los años 1960, las enfermedades periodontales se clasificaban en gingivitis y "periodontosis", ésta última fue posteriormente

renombrada como periodontitis. En esa época, se pensaba que la periodontitis era un estadio avanzado de la gingivitis (**Greene 1963**). Años más tarde, se introdujo el concepto de que existía una diversidad de enfermedades periodontales con etiologías bacterianas e interacciones hospedero-microorganismo específicas capaces de conducir a distintas manifestaciones clínicas. Así mismo, se demostró que la gingivitis no siempre conducía a la periodontitis, y comenzaron a considerarse como entidades patológicas independientes (**Lindhe et al. 1973**).

En el taller mundial de periodoncia clínica de 1977, la Academia Americana de Periodoncia (American Academy of Periodontology, AAP), reconoció sólo dos formas de periodontitis; la periodontitis juvenil y la periodontitis marginal crónica. Sin embargo, a mediados de la década de 1980, surgió el concepto de que la periodontitis comprendía una gama de enfermedades relacionadas pero distintas entre sí, las cuales diferían en su etiología, historia natural, progreso y respuesta al tratamiento. En reconocimiento a ello, la AAP adoptó la siguiente clasificación en Noviembre de 1986:

- Periodontitis juvenil.
 - Periodontitis prepuberal.
 - Periodontitis juvenil localizada.
 - Periodontitis juvenil generalizada.
- Periodontitis del adulto.
- Gíngivo-periodontitis ulceronecrosante.
- Periodontitis refractaria.

Pocos años más tarde en 1989, la AAP propuso las siguientes variaciones a la clasificación de 1986 (**Caton 1989, Nevins et al. 1989**):

- Periodontitis del adulto.
- Periodontitis de inicio temprano.
 - Periodontitis prepuberal (generalizada y localizada).
 - Periodontitis juvenil (generalizada y localizada).
 - Periodontitis de rápido progreso.
- Periodontitis asociada a enfermedades sistémicas.
- Periodontitis ulceronecrosante.
- Periodontitis refractaria.

En la actualidad, las enfermedades periodontales cuentan con un nuevo sistema de clasificación, desarrollado con el objetivo de corregir algunas características que se consideraron como errores en la clasificación de 1989. Las primeras propuestas para una nueva clasificación se presentaron en 1993, pero no fue hasta 1999 cuando se aceptó la reclasificación de las enfermedades periodontales (**Armitage 1999**). La clasificación vigente incluye un apartado sobre las enfermedades gingivales y reconstituye el apartado de enfermedades periodontales de la siguiente manera:

- Enfermedades gingivales.
 - Inducidas por la placa dentobacteriana. Incluye las gingivitis asociadas a la placa dentobacteriana, a factores sistémicos, a medicamentos y a malnutrición.
 - No inducidas por la placa dentobacteriana. Incluye las gingivitis de etiología bacteriana, viral y fúngica, así como las de origen genético, aquellas que se presentan como manifestación de condiciones sistémicas, de traumatismos, de reacciones a cuerpos extraños y otras gingivitis no especificadas.

- Enfermedades periodontales.

Periodontitis crónica (por extensión: generalizada o localizada, por severidad: leve, moderada o severa).

Periodontitis agresiva (por extensión: generalizada o localizada, por severidad: leve, moderada o severa).

Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.

Asociada a desordenes hematológicos.

Asociada a desordenes genéticos.

Otros no especificados.

Enfermedades periodontales necrotizantes.

Abscesos periodontales.

Periodontitis asociada a lesiones endodónticas.

Deformidades y condiciones desarrolladas o adquiridas.

Bajo el esquema actual de clasificación, se pretenden excluir a la edad y al ritmo de progresión de la enfermedad como factores para el diagnóstico de la periodontitis. Así mismo, se reemplazaron los términos “periodontitis del adulto” y “periodontitis de inicio temprano” por “periodontitis crónica” y “periodontitis agresiva”, respectivamente. Otro término que se reemplazó fue el de “periodontitis ulceronecrosante” por “enfermedades periodontales necrosantes”, y se adicionaron las categorías de “abscesos periodontales”, “periodontitis asociadas a lesiones endodónticas” y “deformidades o condiciones desarrolladas o adquiridas” **(Armitage 1999)**.

En la clasificación vigente, se establece que las características clínicas principales de la periodontitis crónica son:

- Mayor prevalencia en adultos, pero puede presentarse en niños y adolescentes.
- La destrucción es constante en presencia de factores locales.
- Se encuentra cálculo subgingival con frecuencia.
- Se presenta generalmente con periodos relativamente prolongados de progresión lenta o moderada, y pueden darse periodos de rápida progresión.
- Puede estar asociada a factores de predisposición locales.
- Puede ser modificada por o estar asociada a enfermedades sistémicas.
- Puede modificarse su presentación de acuerdo con factores exógenos como el tabaquismo, estrés emocional, drogas, etc.

Por otra parte, se establece que las características clínicas principales de la periodontitis agresiva son:

- Excepto por la presencia de periodontitis, los pacientes son clínicamente sanos.
- Pérdida de inserción y destrucción ósea.
- Predisposición familiar.
- Cantidades de depósitos microbianos inconsistentes con la severidad de la destrucción de tejido periodontal.
- Proporciones elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y en algunas poblaciones también de *Porphyromonas gingivalis*.
- La progresión de la pérdida de inserción y de hueso puede ser auto limitada.

A pesar de que la clasificación vigente de las enfermedades periodontales procura establecer las bases para separar a los dos tipos principales de enfermedad periodontal (periodontitis crónica y agresiva), el traslape de estos dos grupos en la práctica clínica, sigue siendo un problema importante. Esto es debido a que al evaluar a un adulto, es imposible

determinar si la destrucción observada es el resultado de un cuadro agresivo o de un cuadro crónico. Es necesario enfatizar que este tipo de clasificación sólo funcionaría si se pudiera evaluar a un individuo en edades tempranas y darle seguimiento minucioso durante un periodo relativamente prolongado de tiempo; sin embargo, en la mayoría de los casos esto no sucede, por ello, no se puede tener la certeza de que la destrucción periodontal que se evalúa en un adulto sea resultado de una destrucción rápida o de lenta progresión, ni tampoco si la misma sucedió en la juventud o en la etapa adulta del individuo.

Patogenia de las enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales destructivas se consideran como patologías multifactoriales (**Haffajee et al. 1988**). Los procesos que llevan a la destrucción de los tejidos de soporte del diente, son iniciados por la colonización subgingival de microorganismos específicos tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (**Haffajee et al. 2004, Haffajee et al. 1998, Socransky & Haffajee 2005, Socransky et al. 1998, Ximenez-Fyvie et al. 2006a, Ximenez-Fyvie et al. 2006b, Ximenez-Fyvie et al. 2000**).

La acumulación local de productos bacterianos, tales como lipopolisacáridos (LPS) y ácidos teicoicos en los tejidos periodontales, estimula a las células del sistema inmunológico innato a producir una gama de citocinas inflamatorias y otros factores humorales para proteger los tejidos del hospedero de la invasión microbiológica (**Hart & Kornman 1997, Kornman & di Giovine 1998, Page 1991**). La producción de dichas citocinas proinflamatorias induce a otras líneas celulares como células endoteliales y fibroblastos a producir metaloproteasas de la matriz, prostaglandinas y otras citocinas, lo cual lleva en última instancia a la destrucción de tejido conectivo y hueso por acción directa de dichas proteínas o bien por la activación de osteoclastos, pudiendo este proceso

culminar en evidencias clínicas de enfermedad periodontal tales como la profundidad de bolsa y la pérdida de la inserción.

El proceso de destrucción tisular requiere de un espacio dentro del periodonto; conforme las capas epiteliales se degradan, el epitelio se regenera en una posición más apical, formando una bolsa cada vez más profunda. El infiltrado continúa extendiéndose hasta que se requiere la destrucción del hueso para dar el espacio necesario, en este espacio se forma tejido de granulación en el que se acumulan mediadores de la inflamación que, directa o indirectamente influyen en la degradación del hueso y del tejido conectivo. Cuando esta situación persiste sin tratamiento, el hospedero sigue presentando una respuesta inflamatoria que resulta en mayor destrucción de tejidos, hasta poder llegar a perder por completo la inserción del diente.

Papel de la interleucina 1(IL-1)

Al conjunto de pequeñas proteínas solubles secretadas por una célula que pueden modificar el comportamiento o las propiedades de la célula misma y/o de otras células se les conoce como citocinas. Las citocinas pueden actuar sobre las células que las producen (acción autócrina), sobre otras células inmediatas (acción parócrina) o sobre células a distancia (acción endócrina) después de haber sido transportadas en la sangre u otros líquidos tisulares. Estas proteínas son liberadas por diversas células además de las células del sistema inmune (**Hart & Kornman 1997, Kornman et al. 1997a, Kornman et al. 1997b**) y cada una actúa sobre receptores celulares específicos. Las citocinas producidas por linfocitos frecuentemente son llamadas linfocinas pero ésta nomenclatura puede ser confusa debido a que existen linfocinas que también son secretadas por células no-linfoides; además de que a la mayoría de las citocinas producidas por células T se les conoce como interleucinas (IL). Las IL son mediadoras de la inflamación y pueden también regular los componentes de la matriz extracelular y del hueso (**Hart & Kornman 1997**).

Algunas de las citocinas involucradas en los procesos inflamatorios y de metabolismo óseo durante la enfermedad periodontal, incluyen al factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), $TNF\beta$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-10$, $IL-12$ y al antagonista del receptor de la $IL-1$ ($IL-1ra$) (**Dinarello 2006, Galbraith et al. 1997, Gonzales et al. 2001, Honig et al. 1989, Kjeldsen et al. 1995, McFarlane et al. 1990, Page 1991, Silva et al. 2007, Stashenko et al. 1991a, Stashenko et al. 1991b, Wilson 1995**).

La familia de citocinas de $IL-1$, consiste de al menos tres polipéptidos relacionados estructuralmente conocidos como $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-1ra$. Originalmente en los años cuarenta se describió a $IL-1$ como una proteína termolábil presente en el fluido de exudados granulocíticos en animales y humanos con fiebre, por tal motivo fue considerada como un endógeno pirógeno con un peso molecular entre 10 y 20 Kd y un punto isoeléctrico de 7.1 (**Dinarello 1991**). Por una parte, $IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$ son dos citocinas pleiotrópicas que presentan un 26% de homología y poseen un amplio espectro de actividades inflamatorias, metabólicas, hematopoyéticas e inmunológicas. Estas dos formas de $IL-1$ son bioquímicamente distintas y se codifican por distintos genes localizados en el cromosoma humano 2 (chr2q14) cada uno con 7 exones (**Hart & Kornman 1997, Lafage et al. 1989**).

Por otro lado, $IL-1ra$ es un antagonista natural de las actividades tanto de $IL-1\alpha$ como de $IL-1\beta$ (**Guasch et al. 1996, Lennard 1995**). Dicha citocina está codificada por un gen de 16.124 Kb que cuenta con 7 exones y se localiza en el cromosoma 2 (chr2q14.2). Esta citocina fue aislada por primera vez de la orina de pacientes con leucemia monocítica, y se determinó que bloqueaba las acciones de $IL-1$ sin afectar la función del TNF . Ésta molécula posee una similitud de 19% en su composición de aminoácidos con $IL-1\alpha$ y de 26% con $IL-1\beta$ (**Brett et al. 2005, Buchs et al. 2001,**

Chen et al. 2006, D'Aiuto et al. 2004, Dinarello 1984, Dinarello 1991, Duff 2006, Galbraith et al. 1997, Lopez et al. 2005, Silva et al. 2007).

Se han descrito dos tipos de receptores para IL-1. La proteína p80 llamada IL-1RI (receptor tipo I) y la proteína p68 llamada IL-1RII (receptor tipo II). Ambos receptores se localizan en las superficies de células. Las diferencias entre estos dos receptores, no sólo radican en que son productos de genes distintos, sino también en que varía su afinidad con IL-1, el tipo de señal que transducen y su capacidad de ser internalizados (**Dinarello 2002, Kornman 2006, Silva et al. 2007**).

IL-1 pertenece a un grupo de citocinas que tienen efectos que se superponen con aquellos de otras citocinas como TNF e IL-6. Los tres tipos de IL-1 muestran habilidad para estimular a los linfocitos T y B, aumentar la proliferación celular, e inducir o suprimir la expresión de diferentes genes (**Dinarello 1991, Dinarello 2002**). Los niveles circulantes de IL-1 se elevan bajo una variedad de situaciones clínicas, y junto con la elevación de los niveles de TNF e IL-6 se correlacionan con la severidad de diferentes patologías. IL-1 se considera como el prototipo de las citocinas inflamatorias, y es capaz de inducir la síntesis de varias proteínas que producen cambios en la inflamación aguda y crónica (**Dinarello 2002, Kornman 2006**). Se ha demostrado la capacidad de síntesis de esta molécula por parte de células como los monocitos, macrófagos tisulares, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, linfocitos T, linfocitos B y células "natural-killer" (NK), entre otras. Su producción puede ser inducida por una variedad de antígenos y posee un efecto tanto local como sistémico sobre células inmunocompetentes que participan en reacciones inflamatorias (**Kornman 2006, Silva et al. 2007**).

Actualmente se sabe que el desarrollo de la periodontitis está fuertemente asociado a la progresión del infiltrado celular inflamatorio dentro de los tejidos periodontales. Por lo tanto, las

citocinas que se localizan tanto en el tejido gingival como en el fluido crevicular tienen un papel importante en la patogenia de la enfermedad periodontal. La presencia de concentraciones elevadas de citocinas inflamatorias como la IL-1, estimula la migración de células leucocíticas hacia tejidos específicos y su activación para desencadenar cascadas bioquímicas y eventos celulares. Una vez que los leucocitos alcanzan el sitio local, las citocinas permiten la comunicación entre células y la orquestación de una serie de eventos que tienen como finalidad la erradicación de antígenos y la reparación de los tejidos (**Dinarello 2002, Kornman 2006, Silva et al. 2007**).

Cuando existe respuesta ante la estimulación por IL-1, los fibroblastos gingivales proliferan, liberando prostaglandina E₂ (PGE₂), aumentando la síntesis de colágena y la actividad de la hialuronidato-sintetasa, y en última instancia estimulando la resorción del hueso alveolar (**Kamma et al. 2004, Silva et al. 2007, Tsai et al. 1995**). Estos mecanismos llevan a la destrucción de tejido conectivo y hueso tanto por acción directa de las citocinas como por la activación de células. Se ha reportado que en pacientes con enfermedad periodontal, es posible detectar niveles elevados de factor de activación de osteoclastos en sitios positivos para IL-1 α (56%) e IL-1 β (87%) (**Kamma et al. 2004, Masada et al. 1990, Silva et al. 2007**).

Factores de riesgo

La presentación clínica de las enfermedades periodontales, incluyendo su extensión, severidad y ritmo de progresión, es variable entre individuos. Diversos estudios han demostrado que las diferencias microbiológicas son sólo discretas entre individuos que presentan distintos tipos de enfermedad periodontal (**Haffajee et al. 1998, Ximenez-Fyvie et al. 2006a, Ximenez-Fyvie et al. 2006b**). Por lo tanto, en la actualidad se considera que las diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad periodontal se deben a factores de riesgo predominantemente no-microbiológicos (no-etiológicos) que determinan la susceptibilidad particular de individuos así

como su respuesta a la terapia periodontal. En este sentido, se reconocen como principales determinantes de riesgo aquellos factores exógenos (modificables) y endógenos (no-modificables) del hospedero, capaces de acentuar la respuesta inmunológica y la producción de citocinas inflamatorias **(Albandar 2002, Cullinan *et al.* 2001, Haber 1994, Hassell & Harris 1995, Kamma *et al.* 2004, Kornman & di Giovine 1998, Laine *et al.* 2001, Meisel *et al.* 2002, Meisel *et al.* 2003).**

Los principales factores exógenos de riesgo a las enfermedades periodontales son el tabaquismo, la nutrición, el consumo de alcohol, el estado socioeconómico y los niveles de estrés **(Genco 1996, Meisel *et al.* 2003)**. La diabetes mellitus tipo 2 se considera también como un factor modificable de riesgo debido a que se ha observado una relación entre el control deficiente de la glicemia y los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal **(Albandar 2002, Genco 1996, Miller *et al.* 1992, Van Dyke & Sheilesh 2005)**. Así mismo, se ha demostrado que los individuos sometidos a niveles altos de estrés durante periodos relativamente prolongados, son más susceptibles a desarrollar enfermedad periodontal y tienen mayor riesgo de presentar pérdida de hueso alveolar **(Kinane & Hart 2003, Van Dyke & Sheilesh 2005)**.

Dentro de los factores endógenos de riesgo a las enfermedades periodontales, se incluyen la respuesta inmune del hospedero, la osteoporosis y la presencia de variaciones (polimorfismos) en los genes que codifican para citocinas inflamatorias **(Albandar 2002, Haber 1994, Meisel *et al.* 2003, Van Dyke & Sheilesh 2005)**. Algunos estudios han sugerido que más del 50% de las diferencias observadas entre individuos en la presentación clínica de las enfermedades periodontales se deben a la presencia de tales variaciones genéticas **(Michalowicz 1993, Michalowicz 1994)**.

Influencia de las variaciones genéticas

El genoma humano está conformado por aproximadamente 3,150 millones de nucleótidos, dentro de los cuales se calcula que existen alrededor de 30,000 genes. La secuencia de cerca del 99.9% de los nucleótidos que constituyen el genoma, es idéntica en todos los seres humanos. Sin embargo, la presencia de variaciones genéticas (antes denominadas polimorfismos), se considera como un evento común. De las variaciones actualmente identificadas, las de tipo SNP (single nucleotide polymorphism), o de un solo nucleótido parecen ser las más frecuentes, habiéndose descrito a la fecha entre 7 y 10 millones de variaciones de este tipo en el genoma humano (**Hinds et al. 2005**).

Aunque algunas variaciones genéticas tienen consecuencias en la función, estructura o composición de la proteína sintetizada, no todas las variaciones dan como resultado cambios funcionales. En realidad, la relación entre la secuencia de las bases y el fenotipo, para la mayoría de estas variaciones, es poco clara o se desconoce. Se ha calculado que el 1% de los genes que codifican para proteínas en el genoma humano, comprende genes polimórficos (variantes), sin embargo, se cree que muy pocas variaciones se traducen en alteraciones en las proteínas sintetizadas (**Terwilliger & Goring 2000**). Es importante señalar, sin embargo, que las secuencias específicas de nucleótidos de los diferentes genes, determinan no sólo la composición de los aminoácidos en la proteína, sino que también determinan su patrón de expresión; es decir, el ritmo y frecuencia de su producción o síntesis. De ahí que, se cree que la mayoría de las variaciones genéticas, a pesar de no influir sobre la composición o estructura de la proteína, afectan sus patrones de expresión.

El genotipo de un individuo incluye todas las instrucciones que heredó de cada uno de sus padres, las cuales se cargan conjuntamente en el genoma. Sin embargo, el término genotipo se

aplica no sólo a la información contenida en el genoma completo de un individuo sino que también a aquella de cada gen en particular. Los diferentes arreglos de nucleótidos para un mismo gen, dentro de un determinado locus cromosómico, se denominan "alelos" y en el ser humano, cada gen está conformado por 2 alelos. Dichos alelos pueden ser idénticos o diferir el uno del otro, de ahí que el genotipo de cada gen puede ser A/A (homocigoto, ambos alelos que conforman el gen son del tipo "A"), A/a (heterocigoto, un alelo del gen es del tipo "A" y el otro del tipo "a") o a/a (homocigoto, ambos alelos del gen son del tipo "a"). En el contexto de las variaciones genéticas, los alelos de tipo "A" y "a" de la explicación anterior, representarían respectivamente, al alelo sin variación (ancestral, "normal", de referencia) y al alelo que presenta una variación determinada. De ahí que, los organismos de una misma especie pueden presentar distintos genotipos para genes específicos por lo que, los organismos fenotípicamente iguales pueden presentar habilidades, susceptibilidades o comportamientos diferentes (**Griffiths & Wessler 2000**).

Los desórdenes poligénicos y/o multifactoriales son aquellos que resultan de la acción combinada de los alelos de más de un gen. Aunque este tipo de padecimientos son hereditarios, dependen de la presencia simultánea de alelos específicos en múltiples genes, además estos patrones usualmente son más complejos que los que involucran a un solo gen. Cuando la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades está basada en la herencia de un solo gen en particular, se refiere a herencia mendeliana (autosómica). Dichas enfermedades se presentan generalmente en la infancia y se presentan independientemente de otros factores ambientales o exógenos. En contraste, las enfermedades complejas y multifactoriales, como la periodontitis o la enfermedad cardiovascular, se consideran como el resultado de la acción de una gama de genes

con alteraciones sutiles en combinación con la forma en la que interactúan durante periodos prolongados con determinados factores ambientales **(Greenstein & Hart 2002)**.

Los variaciones genéticas en el grupo de genes de la IL-1 han sido propuestos como marcadores genéticos de diversas enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide **(Buchs et al. 2001, Crusius et al. 1995, Jouvenne et al. 1999)**, esquizofrenia **(Katila et al. 1999)**, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn **(Bioque et al. 1996, Bioque et al. 1995, Hacker et al. 1998, Heresbach et al. 1997, Nemetz et al. 1999, Stokkers et al. 1998)**, psoriasis **(Cork et al. 1993)**, enfermedad de Graves **(Blakemore et al. 1995)** y lupus eritematoso **(Blakemore et al. 1994)**. Algunas variaciones en este grupo de genes han sido también propuestas como potenciales marcadores genéticos de la susceptibilidad y riesgo de individuos a padecer enfermedades periodontales **(Huynh-Ba et al. 2007, Kornman et al. 1997a, Kornman & di Giovine 1998, Lopez et al. 2005, McDevitt et al. 2000, Taba et al. 2005, Wilson 1995)**.

En la actualidad, existen evidencias científicas crecientes de que la presencia de variaciones en diversos genes que codifican para citocinas inflamatorias, principalmente IL-1, IL-6 y TNF α , determinan la susceptibilidad de los individuos a padecer enfermedad periodontal. Las evidencias sugieren que dichas variaciones pueden determinar no sólo el riesgo, sino que también la severidad, extensión, tipo de enfermedad y respuesta al tratamiento **(Kornman 2006, Lin et al. 2003, Lopez et al. 2005, Moreira et al. 2007b, Nibali et al. 2009, Schulz et al. 2008, Silva et al. 2007, Trevilatto et al. 2003)**. Algunos estudios han reportado que en pacientes con enfermedad periodontal severa, los incrementos en los niveles de IL-1 están asociados con la presencia de alelos específicos de las variaciones IL1A:c.-949C>T (rs1800587), TNF: c.-488G>A (rs1800629) e IL-6:c.-237C>G (rs1800795). Así mismo, el aumento de proteína C reactiva ha sido asociado con la

presencia las variaciones IL1A:c.-949C>T e IL-6:c.-237C>G, después de considerar otros factores como la edad, índice de masa corporal, género, etnia y hábito de tabaquismo (**D'Aiuto et al. 2004**).

Diagnóstico genético de las enfermedades periodontales

El concepto de que los análisis genéticos pueden ser de utilidad como herramientas de uso clínico para efectuar valoraciones del riesgo y susceptibilidad individual de pacientes a presentar determinadas enfermedades no es nuevo. Sin embargo, el uso de diagnósticos genéticos en el campo de la odontología clínica continúa representando una idea relativamente novedosa.

Comercialmente, existe una sola prueba genética patentada, llamada PST™ (Periodontal Susceptibility Test, Interleukin Genetics Inc.), promocionada como auxiliar en el diagnóstico de las enfermedades periodontales. Dicha prueba se basa en la detección de alelos combinados de las variaciones genéticas IL1A:c.-949C>T e IL1B:c.315C>T (rs1143634) (**Kornman et al. 1997a**). Los diseñadores de dicha prueba sugieren que los individuos no-fumadores portadores tanto del alelo IL1A:c.[-949T] como del alelo IL1B:c.[315T], a los que se les refiere como portadores del “genotipo-compuesto de susceptibilidad a la enfermedad periodontal”, tienen más de 6 veces el riesgo de padecer formas severas de enfermedad periodontal y de rechazar implantes dentales, que los no-portadores (**Kornman et al. 1997a**). En términos generales, la prueba PST™ es considerada como un marcador genético predictivo del riesgo a padecer formas severas de periodontitis, así como de la respuesta de individuos al tratamiento periodontal. Sin embargo, la validación de dicha prueba fue realizada en una población caucásica del norte de Europa, y a la fecha, existen evidencias científicas de que la utilidad de dicha prueba es limitada o nula para otras poblaciones y grupos étnicos en el mundo (**Armitage et al. 2000, Arregui et al. 2000, Caffesse et al. 2002a, Perez-Soria et al. 2006, Walker et al. 2000**).

En el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM, se realizó un estudio en el que fueron evaluados genéticamente un total de 118 sujetos mexicanos: 66 con periodontitis crónica generalizada (PCG), 22 con periodontitis agresiva generalizada (PAG) y 30 con salud periodontal (SP), para determinar la frecuencia de portadores del llamado “genotipo-compuesto de susceptibilidad a la enfermedad periodontal”, así como su asociación con diferentes estados de salud periodontal (**Perez-Soria et al. 2006**). En resumen, se detectaron portadores tanto homocigóticos como heterocigóticos de los dos alelos de ambas variaciones genéticas en los 3 grupos de estudios. El 75.8%, 86.4% y 66.7% (variación IL1B:c.315C>T) y el 50%, 86.4% y 73.3% (variación IL1A:c.-949C>T) de los sujetos con PCG, PAG y SP, respectivamente, fueron portadores homocigóticos de los alelos IL1B:c.[315C] y IL1A:c.[-949C]. La frecuencia de portadores del “genotipo-compuesto de susceptibilidad a la enfermedad periodontal” fue de 18.2%, 9.1% y 20% para PCG, PAG y SP, respectivamente. Las asociaciones entre dicho genotipo y los diferentes grupos de estudio no fueron estadísticamente significativas mediante la prueba exacta de Fisher y el marcador careció de habilidad para separar a los grupos con enfermedad periodontal entre sí o del grupo control (SP). Por lo tanto, se concluyó que la presencia de los alelos IL1A:c.[-949T] e IL1B:c.[315T], no pudo ser considerada como un marcador genético predictivo útil de la susceptibilidad a la periodontitis en la población mexicana.

En otro estudio similar se reportó que únicamente el 8% de una población de sujetos afroamericanos con periodontitis severa eran portadores del “genotipo-compuesto de susceptibilidad a la enfermedad periodontal”, y que en dicha población no existía una asociación con la enfermedad periodontal (**Walker et al. 2000**). Hallazgos similares fueron reportados en otro estudio en el que se estudió una población de 300 sujetos chinos y se encontró que únicamente el 2.3% de los individuos con periodontitis severa eran portadores del genotipo mencionado

(Armitage et al. 2000). En dicho estudio, tampoco se encontraron asociaciones con la enfermedad periodontal severa. Dos estudios realizados en poblaciones “hispánicas” reportaron que el porcentaje de sujetos con periodontitis severa portadores del “genotipo-PST” fue del 23% y 43% **(Arregui et al. 2000, Caffesse et al. 2002b)**. Mientras que uno de los estudios no reportó asociación significativa con la enfermedad periodontal severa, el otro determinó que existía una asociación en individuos no-fumadores. Las diferencias en los resultados de estos dos estudios pudieron deberse, por lo menos en parte, a la ambigua definición de las poblaciones de estudio como “hispanicas”.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, nos encontramos en la era de la medicina genómica donde uno de los mayores logros ha sido la determinación de la secuencia del genoma humano. Gracias a ello y al desarrollo de métodos eficientes y de bajo costo para la genotipificación de variaciones genéticas de tipo SNP, en años recientes, se ha identificado un número elevado de dichas variaciones en el genoma humano. Lo anterior ha conducido al vertiginoso desarrollo y publicación de numerosos estudios para determinar las asociaciones de dichas variaciones con enfermedades específicas **(Boyles et al. 2008, Frazer et al. 2009, Grimm et al. 2009, Johnsen et al. 2008, Kim et al. 2008, Marcos et al. 2008, Nibali et al. 2009, Saenz-Lopez et al. 2008, Sanchez et al. 2008, Schulz et al. 2008, Steinbrugger et al. 2009, Unur et al. 2008, Vairaktaris et al. 2008, Wong et al. 2008, Yang et al. 2009)**.

En el estudio de las enfermedades periodontales, numerosos grupos de investigación se encuentran procurando establecer las bases genéticas de este padecimiento para poder entender los factores que determinan la susceptibilidad y predisposición de individuos a los diferentes tipos de periodontitis. Es claro que la identificación de los factores genéticos que influyen sobre las

enfermedades periodontales, podría proporcionar las bases no sólo para establecer mecanismos para la adecuada clasificación y diagnóstico de este grupo de padecimientos; sino también para el desarrollo y aplicación de pruebas de susceptibilidad y el establecimiento nuevas estrategias individualizadas de prevención y tratamiento **(Kinane & Hart 2003)**.

Estudios previos han reportado la distribución de frecuencias alélicas y/o genotípicas de diversas variaciones genéticas, incluyendo IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C e IL1RN:c.215-516(86)[2_6], así como su asociación con las enfermedades periodontales en poblaciones europeas, asiáticas y afroamericanas. Sin embargo, a la fecha, no existen estudios en las que se reporte a la población mexicana. Está ampliamente demostrado que la distribución de variaciones genéticas muestra diferencias importantes entre poblaciones específicas del mundo, por lo que el reporte de asociaciones, o de la ausencia de ellas, con enfermedades específicas en unas poblaciones no puede ser extrapolado a otros grupos de distintas zonas geográficas, razas o etnias. Por lo tanto, es necesario determinar la distribución de las frecuencias de tales variaciones, y determinar su relación con las enfermedades periodontales en la población mexicana para poder valorar el riesgo y la susceptibilidad de individuos a desarrollar formas severas de enfermedad periodontal.

OBJETIVOS

1. Describir la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las variaciones en genes de la familia de IL-1 IL1A:c.-949C>T , IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C e IL1RN:c.215-516(86)[2_6] en sujetos mexicanos sistémicamente sanos con periodontitis crónica generalizada (PCG), periodontitis agresiva generalizada (PAG) y salud periodontal (SP).

2. Evaluar las asociaciones de alelos y genotipos individuales, así como de haplotipos de las variaciones genéticas descritas en el objetivo 1, con la PCG y PAG en sujetos mexicanos.
3. Determinar la capacidad de alelos y genotipos individuales, así como de haplotipos de las variaciones genéticas descritas en el objetivo 1, para diagnosticar, marcar y separar a individuos mexicanos con PCG, PAG y SP.
4. Determinar la eficacia del "genotipo-compuesto de susceptibilidad a la enfermedad periodontal" (prueba PST™) para determinar la susceptibilidad y riesgo de individuos mexicanos a padecer PCG y PAG.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente investigación consistió en un estudio de tipo transversal en el que se evaluaron muestras de DNA provenientes de un total de 127 sujetos de estudio. Los sujetos fueron examinados en una sola visita en la que se realizó una evaluación de su estado de salud general y periodontal, se registraron los datos clínicos y se recolectó la muestra, de acuerdo con los procedimientos que se describen en los textos siguientes. El DNA se analizó para determinar la presencia de alelos y genotipos específicos de las variaciones genéticas IL1A:c.-949C>T , IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C, IL1RN:c.215-516(86)[2_6].

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio consistió de un total de 127 sujetos sistémicamente sanos sin relación familiar sanguínea (periodontitis crónica generalizada, PCG $n= 58$; periodontitis agresiva generalizada, PAG $n= 27$; salud periodontal, SP $n= 42$). En la **tabla 1** se describen las características clínicas de la población de estudio. Cabe señalar que además de los tres grupos de estudio mencionados, se creó un grupo adicional (enfermedad periodontal, EP) en el cual se incluyeron a todos los sujetos que forman parte de los grupos PCG y PAG (EP $n=85$), esto con el objetivo de explorar la posibilidad de que algunas de las variaciones evaluadas pudieran estar asociadas a la enfermedad periodontal independientemente de su tipo.

Los sujetos de estudio se reclutaron de la población de pacientes que reciben atención en la clínica de Periodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cada sujeto recibió información sobre los objetivos del estudio, además se les entregó una copia de la forma de consentimiento

informado, aprobada por el Comité de Ética de la Dependencia, en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio. Cada sujeto de estudio leyó y firmó la carta de consentimiento informado, con lo que estableció su deseo voluntario de participar (**Anexo 1**).

Criterios de selección

Todos los sujetos incluidos en el estudio presentaron por lo menos 20 dientes naturales y fueron mexicanos por nacimiento, con ambos padres, y por lo menos 2 abuelos nacidos en México y no pertenecientes a alguna denominación indígena mexicana. Se excluyeron del estudio todos los sujetos que presentaron alguna condición sistémica que pudiera influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal, como diabetes, VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes, etc. Así mismo, se excluyeron a las mujeres que se encontraban embarazadas o en lactancia.

Los sujetos incluidos en los grupos PCG y PAG presentaron por lo menos 9 sitios con nivel de inserción ≥ 5 mm. Todos aquellos incluidos en el SP presentaron menos de 4 sitios con nivel de inserción de 3 a 4 mm y ningún sitio con nivel de inserción ≥ 5 mm. Los sujetos incluidos en el grupo PCG tuvieron una edad ≥ 35 años, aquellos incluidos en el grupo PAG tuvieron edades de 12 a 29 años y los individuos del grupo SP tuvieron una edad ≥ 18 años.

EVALUACIÓN CLÍNICA

Cada sujeto de estudio recibió una evaluación periodontal completa realizada por clínicos calibrados para este propósito. Todas las mediciones clínicas se registraron de un total de 6 sitios (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de cada diente, excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios por sujeto dependiendo del número de dientes faltantes) de acuerdo con los procedimientos previamente descritos (**Haffajee et al. 1983**).

Los parámetros clínicos evaluados y el orden de las mediciones se realizaron de la siguiente manera: **1.** Acumulación de placa (0/1, ausente/presente), **2.** Enrojecimiento gingival (0/1), **3.** Profundidad de bolsa (mm), **4.** Nivel de inserción (mm), **5.** Sangrado al sondeo (0/1) y **6.** Supuración al sondeo (0/1). La profundidad de bolsa y el nivel de inserción se tomaron 2 veces al milímetro más cercano utilizando una sonda periodontal “Carolina del Norte” de 15 mm de longitud (North Carolina periodontal probe, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). El promedio de las dos mediciones se utilizó para el análisis de los datos. Los parámetros clínicos 1, 2, 5 y 6 se evaluaron una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) o ausencia (0).

EVALUACIÓN GENÉTICA

Se evaluó la presencia de las variaciones que se describen en las **tablas 2 y 3**, mediante las técnicas que se resumen en la **tabla 4**.

Recolección y procesamiento de muestras

Se obtuvo una muestra de cada sujeto de estudio mediante alguno de los dos métodos que se describen a continuación para extraer, purificar y analizar su DNA.

Muestras de sangre

Se recolectaron 3ml de sangre periférica total en un tubo vacutainer de 6 ml, que contenía 0.4 ml de solución de citrato ácido de dextrosa (ACD). De estas muestras se utilizaron 200 µl para la obtención de DNA genómico, y el resto se alicuotó en crioviales y se almacenó a -80°C. Las alícuotas fueron procesadas inmediatamente para la extracción y purificación de DNA genómico. Esto se realizó utilizando el QIAamp™ DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del DNA obtenido se midió a partir de 2 µl de cada muestra utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher

Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). El resto de la muestra de DNA purificado fue alicuotada y almacenada a -20°C hasta su procesamiento para la identificación de variaciones genéticas.

Muestras de células epiteliales de mejilla

En algunos casos, se tomó una muestra de células epiteliales de la mucosa bucal, la cual fue recolectada utilizando hisopos estériles (Whatman, Clifton NJ, USA) y colocada en una tarjeta MiniCard FTA (Whatman) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se permitió que la muestra secase sobre la tarjeta a temperatura ambiente durante 1 hora. Un disco de 2 mm de diámetro fue tomado de la muestra para la detección de cada una de las 4 variaciones genéticas evaluadas, utilizando un Uni-Core punch estéril (Whatman). Cada disco fue colocado individualmente en un tubo para PCR de 0.2 ml y procesado para la extracción y purificación de DNA genómico siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección de variaciones genéticas

Los alelos y genotipos de cada variación se determinaron mediante 4 reacciones individuales de PCR para cada sujeto de estudio utilizando las metodologías que se describen en la **tabla 4**. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl utilizando ≈150 ng de DNA genómico purificado, 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Biogénica, México, D.F.), 0.2 mM de mezcla de dNTPs (Biogénica), 1 x *Taq* DNA polimerasa buffer (10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C.), 50 mM KCl (Biogénica), 1.5 mM MgCl₂ (Biogénica), 0.01% gelatina y 1 µM de cada uno de los primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todos los primers fueron diseñados *in silico* con base a las secuencias de referencia de cada gen depositadas en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Así mismo, cada primer fue alineado *in silico* para comprobar su especificidad, localización y el tamaño del fragmento resultante. Para cada corrida de PCR, se incluyeron controles positivos utilizando DNA de sujetos previamente caracterizados mediante

secuenciación como portadores de cada uno de los 3 posibles genotipos de cada variación, y un control negativo sin templado de DNA.

El análisis de los fragmentos se llevó a cabo con 10 µl de los productos de PCR o digestión, dependiendo del caso. Se utilizaron geles de TBE en gradiente del 4 al 20% (Invitrogen) y se corrieron a 200V (10V por cm entre electrodos) como indica el fabricante, en cámaras de electroforesis XCell SureLock™ (NOVEX, Invitrogen). Los geles se tiñeron durante 40 minutos con SYBR Green I (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) para visualizar las bandas bajo luz ultravioleta (UV Transilluminator 2000, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Se obtuvieron imágenes digitales de todos los geles utilizando el sistema de documentación DigiDoc (BioRad). El análisis del peso molecular de cada banda se realizó mediante la comparación con estándares de pesos moleculares conocidos (Invitrogen) utilizando el programa Quantity One (BioRad).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos generados en el presente estudio fueron sometidos a análisis estadísticos considerando las frecuencias de portadores de cada alelo y genotipo de las 4 variaciones genéticas IL1A:c.-949C>T , IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C e IL1RN:c.215-516(86)[2_6] en sujetos mexicanos distribuidos de acuerdo con su estado de salud periodontal en 4 grupos (PCG: periodontitis crónica generalizada, PAG: periodontitis agresiva generalizada, EP: grupo que incluye a todos los sujetos con enfermedad periodontal tanto PCG como PAG, y SP: salud periodontal). Los resultados fueron analizados mediante la utilización de un modelo matemático-estadístico, diseñado expresamente para este proyecto, el cual permitió identificar las combinaciones (haplotipos) de alelos y genotipos individuales de diferentes variaciones que pudieran asociarse y separar a los grupos de estudio. Esto con el propósito de no limitar la exploración y análisis de datos únicamente a las posibles asociaciones de alelos y genotipos individuales, como se realiza más tradicionalmente en

estudios similares de variaciones genéticas relacionadas con padecimientos específicos. La **figura 1** muestra un diagrama de flujo que sintetiza la secuencia de pasos que se siguieron para el análisis de datos, mismos que constituyen el modelo de análisis propuesto.

Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas individuales

Las frecuencias alélicas y genotípicas de las 4 variaciones evaluadas fueron determinadas para cada uno de los 4 grupos de estudio (PCG, PAG, EP y SP) mediante conteos directos. La proporción (%) de portadores de cada alelo y genotipo fue calculada dividiendo la frecuencia ($i=$) entre el número de sujetos ($n=$) incluidos en cada grupo ($i=/n=$). Tres de las variaciones genéticas analizadas fueron del tipo SNP, por lo que tuvieron la posibilidad de presentar únicamente dos alelos (ejemplo: A y a); de ahí que, la posibilidad de genotipos en todos los casos fue de 3 para cada variación (A/A: homocigoto para el alelo A, A/a: heterocigoto y a/a: homocigoto para el alelo a). Una de las variaciones evaluadas (IL1RN:c.215-516(86)[2_6]) fue del tipo VNTR (variable number of tandem repeats), contando esta con 5 posibles alelos. Dado lo anterior, el total de alelos y genotipos individuales reportados fue de 35: ((3 genotipos + 2 alelos) x 3 variaciones)=15 + ((15 genotipos + 5 alelos) x 1 variación)=20. El reporte de la distribución de frecuencias incluyó el número y porcentaje de portadores de cada uno de los 35 alelos y genotipos individuales para los sujetos de cada grupo de estudio, así como el resultado de los cálculos de heterocigocidad (frecuencia de heterocigotos/ $n=$) y chi-cuadrada bajo el principio de Hardy-Weinberg (χ^2 H-W) para cada una de las variaciones genéticas. Bajo el principio de H-W, cuando una población se encuentra en equilibrio genético, las frecuencias genotípicas observadas serán $p^2+2pq+q^2$, considerando un locus con dos alelos A y a, y con frecuencias alélicas de p y q , respectivamente; donde $p^2=$ frecuencia AA, $2pq=$ frecuencia Aa y $q^2=$ frecuencia aa.

Con el objeto de saber si la distribución de genotipos para cada variación en cada grupo de estudio se encontraba dentro del equilibrio de H-W, se calcularon las frecuencias esperadas de cada genotipo mediante las siguientes fórmulas: $\sqrt{p^2} \times n =$, $\sqrt{2pq} \times n =$ y $\sqrt{q^2} \times n =$, respectivamente. Se empleó la prueba χ^2 H-W para determinar si las diferencias entre los genotipos observados y los esperados bajo el equilibrio de H-W en cada grupo eran significativas. En breve, se formuló una hipótesis conservadora llamada hipótesis nula (H_0) de que no existía diferencia significativa entre los valores observados y los esperados; es decir, que la distribución de genotipos en el grupo de estudio se encontraba dentro del equilibrio de H-W. Por otro lado, se formuló una hipótesis alterna (H_A) de que la diferencia era significativa, por lo que la distribución de genotipos en el grupo de estudio no se encontraba dentro del equilibrio de H-W. Considerando las hipótesis anteriores, la prueba χ^2 H-W permitió determinar la probabilidad de que las diferencias fueran o no debidas al azar. La ecuación que se utilizó para determinar lo anterior, fue la siguiente: $\chi^2 = \frac{\sum(\text{frecuencia genotípica observada} - \text{esperada})^2}{\text{esperada}}$. Se estableció un valor de $p < 0.05$ y se calcularon los grados de libertad (GL) de acuerdo con la siguiente fórmula: $GL = k - m$; donde k representó el número de genotipos (para todas las variaciones de tipo SNP este valor fue =3) y m representó el número de valores independientes en las frecuencias alélicas (para todas las variaciones de tipo SNP este valor fue =2). Por lo tanto, los GL para tres de las cuatro variaciones fueron =1. Para la variación evaluada de tipo VNTR, se calcularon los GL como: $15 - 5 = 10$, utilizando la fórmula anteriormente descrita. Por lo tanto, los valores críticos considerados en la prueba χ^2 H-W fueron 3.8415 para las tres variaciones de tipo SNP y 10.307 para la variación de tipo VNTR. En cualquiera de los casos, cuando se presentó un valor crítico mayor al establecido, se consideró que la distribución de genotipos no estaba dentro del equilibrio de H-W.

Comparación de alelos y genotipos individuales

Se calcularon las diferencias en % de portadores de cada alelo y genotipo individual entre el grupo experimental y el control (D_{max}) para pares de los cuatro grupos de estudio (PCG vs. SP, PAG vs. SP, PAG vs. PCG y EP vs. SP), considerando en todos los casos al primer grupo de estudio citado como grupo experimental y al segundo como grupo control en cada comparación. Las frecuencias de portadores de cada genotipo y alelo individual ($n=35$) fueron evaluadas y comparadas estadísticamente entre los grupos de cada comparación. La significancia de las diferencias en la frecuencia de portadores de cada alelo y genotipo individual entre los grupos de estudio fue calculada utilizando la prueba U de Mann-Whitney (M-W). Así mismo, se evaluó la habilidad de cada alelo y genotipo individual para marcar a los grupos experimentales en cada una de las 4 comparaciones, mediante el cálculo de la sensibilidad (SNS), especificidad (ESP), exactitud (EXC), índice de falsos positivos (IFP), índice de falsos negativos (IFN), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). La SNS se consideró como la proporción de portadores del alelo o genotipo en cuestión en el grupo experimental (% de verdaderos positivos, ($i=1$ exp)) y fue calculada como: $\frac{(i=1 \text{ exp})}{n=\text{exp}}$. La ESP representó la proporción de no-portadores en el grupo control (% de verdaderos negativos, ($i=0$ con)) y fue calculada como: $\frac{(i=0 \text{ con})}{n=\text{con}}$. La exactitud se tomó como una medida del grado de certeza o veracidad y se consideró como la proporción del % de verdaderos positivos y de verdaderos negativos. La EXC fue calculada como: $\frac{(i=1 \text{ exp})+(i=0 \text{ con})}{n=\text{exp}+n=\text{con}}$. Los IFP e IFN, fueron definidos como la proporción de no-portadores del alelo o genotipo en cuestión en el grupo experimental (% de falsos positivos, ($i=0$ exp)) y proporción de portadores en el grupo control (falsos negativos, ($i=1$ con)). Los índices anteriores fueron calculados como: $\frac{(i=1 \text{ con})}{n=\text{con}}$ y $\frac{(i=0 \text{ exp})}{n=\text{exp}}$, respectivamente. Por último, los VPP y VPN fueron considerados como la proporción de

portadores del alelo o genotipo en cuestión, que padecían la condición periodontal que se deseaba marcar (la del grupo experimental) considerando al total de sujetos en los dos grupos de la comparación, y como la proporción de portadores del alelo o genotipo en cuestión, que no padecían el tipo de enfermedad periodontal que se deseaba marcar, considerando al total de sujetos en los dos grupos de la comparación, respectivamente. Los VPP y VPN fueron calculados como: $\frac{(i=1 \text{ exp})}{(i=1 \text{ exp}+i=1 \text{ con})}$ y $\frac{(i=0 \text{ con})}{(i=0 \text{ exp}+i=0 \text{ con})}$, respectivamente.

Adicionalmente, se buscaron asociaciones de alelos y genotipos individuales con cada grupo de estudio utilizando la prueba exacta de Fisher (F) y, se estimaron los índices y probabilidades de riesgo mediante los cálculos del riesgo relativo (RR) y la razón de momios (RM), respectivamente. El RR se consideró como la proporción (razón) del % de portadores de un alelo o genotipo determinado en el grupo experimental (% de verdaderos positivos) y el % de portadores en el grupo control (% de falsos positivos). El RR fue calculado mediante la siguiente ecuación: $\frac{\frac{(i=1 \text{ exp})}{(n=\text{exp})}}{\frac{(i=1 \text{ con})}{(n=\text{con})}}$.

La RM se consideró como la proporción (razón) de la probabilidad de portadores de un alelo o genotipo específico en el grupo experimental (probabilidad de verdaderos positivos) y de la probabilidad de portadores en el grupo control (probabilidad de falsos positivos), la cual fue calculada como sigue: $\frac{\frac{(i=1 \text{ exp})}{(n=\text{exp})-(i=1 \text{ exp})}}{\frac{(i=1 \text{ con})}{(n=\text{con})-(i=1 \text{ con})}}$. La significancia de la probabilidad de riesgo (RM) fue determinada mediante la prueba de Mantel-Haenszel (M-H) para la razón de momios común, utilizando intervalos de confianza al 95% (IC95%).

Generación de variables con alelos y genotipos combinados (haplotipos)

A partir de todos los alelos y genotipos individuales ($n=35$), se generaron variables dicotómicas que identificaron a los portadores de todas las posibles combinaciones de 2, 3 y 4

genotipos y/o alelos individuales. Las variables generadas fueron de tres tipos: *alélicas*: combinaciones que incluyeron en su composición únicamente alelos, *genotípicas*: combinaciones que incluyeron en su composición únicamente genotipos y, *alélicas/genotípicas*: combinaciones que incluyeron en su composición tanto alelos como genotipos. Se excluyeron de los análisis posteriores únicamente los haplotipos que no se detectaron en ninguno de los 127 sujetos de estudio, así como aquellos en los que la composición de alelos y/o genotipos presentaba redundancia o incoherencias. Se consideraron como redundancias aquellos haplotipos, por ejemplo, cuya composición incluía el genotipo heterocigoto [CG] de una variación y también uno o los dos alelos de la misma variación incluidos en el genotipo [C] y [G]. Similarmente, se consideraron como haplotipos incoherentes aquellos que presentaron combinaciones que no son posibles en el ser humano; por ejemplo, una combinación en la que se incluye el genotipo homocigoto [CC] de una variación y también el alelo [G] de la misma variación.

Comparación de haplotipos entre grupos de estudio

Para todas las combinaciones generadas, se procedió a determinar las frecuencias de portadores mediante conteos directos y, se calculó tanto la proporción de portadores en cada grupo de estudio, como la D_{max} . Las frecuencias de portadores de cada combinación fueron evaluadas y comparadas estadísticamente entre pares de los cuatro grupos de estudio. La significancia de las diferencias en la frecuencia de portadores de cada combinación entre los grupos fue calculada utilizando la prueba M-W. Así mismo, se evaluó la habilidad de cada combinación para marcar a los grupos experimentales en cada una de las 4 comparaciones, mediante el cálculo de SNS, ESP, EXC, IFP, IFN, VPP y VPN, siguiendo los mismos procedimientos que se describen en los párrafos que anteceden. Adicionalmente, se buscaron asociaciones de cada combinación con los grupos de estudio utilizando la prueba F y, se estimaron los índices y

probabilidades de riesgo mediante los cálculos del RR y RM, respectivamente. La significancia de la probabilidad de riesgo (RM) fue determinada mediante la prueba M-H para la razón de momios común, utilizando IC95%.

Selección de haplotipos

Fase 1. En base a los análisis estadísticos

En la primera fase de selección, se consideraron combinaciones que cumplieron con cada uno de los siguientes criterios en cualquiera de las cuatro comparaciones entre grupos: $RM > 1$, $EXC > 0.5$, $IFN < 0.3$, $M-W p < 0.05$, $F p < 0.05$, $M-H p < 0.05$, $\% i=1 exp > 0.5$, $\% i=1 con < 0.3$ y $D_{max} > 0.2$.

Fase 2. En base a redundancias

En la segunda fase de selección, se llevó a cabo una discriminación de combinaciones con base a las redundancias entre unas combinaciones y otras. En esta fase de selección, se consideraron únicamente las combinaciones no-redundantes conformadas por el mayor número de alelos y genotipos individuales dentro de alguno de los conjuntos de combinaciones que fueron agrupados por la presentación en común de un alelo o genotipo individual, mismo que no estuviera incluido en alguna de las demás combinaciones.

Propuesta de marcadores genéticos

Tomando en consideración al conjunto de análisis estadísticos anteriores, se propusieron como posibles marcadores genéticos aquellos haplotipos seleccionados con el mayor poder, menor error y más elevada capacidad para separar y marcar específicamente a los grupos experimentales en cada par de comparaciones. Cabe mencionar que los valores de los parámetros para los marcadores seleccionados estuvieron dentro de los límites aceptables para pruebas diagnósticas.

Evaluación del genotipo PST™

Adicionalmente, se realizaron evaluaciones de la eficacia del genotipo PST™ (Periodontal Susceptibility Test, Interleukin Genetics Inc.) por sus siglas en inglés como marcador de la periodontitis crónica y agresiva en la población mexicana. Para dicha evaluación se seleccionaron específicamente a los haplotipos que presentaron en su composición al alelo [T] (como alelo o genotipo) tanto de la variación IL1A:c.-949C>T como IL1B:c.315C>T, sin importar que presentaran o no alelos y/o genotipos de otras variaciones. Se realizó un análisis de dichos haplotipos utilizando las mismas pruebas y parámetros descritos en los párrafos que anteceden.

III. RESULTADOS

Se evaluó y comparó la distribución de 4 variaciones genéticas, tres de ellas de tipo SNP (IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T e IL1B:c.-583T>C) y una de tipo VNTR (IL1RN:c.215-516(86)[2_6]). Las evaluaciones se realizaron tanto de manera individual como en combinaciones (haplotipos), utilizando el modelo de análisis que se resume en la **Figura 1**. En total se incluyeron 127 sujetos mexicanos sistémicamente sanos y sin relación familiar que presentaban PCG, PAG o SP.

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS INDIVIDUALES

En las **figuras 2a-d** se presenta la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas ($i=$) y la proporción de portadores (%) de cada una de las 4 variaciones genéticas evaluadas, en sujetos incluidos en cada uno de los 4 grupos de estudio (PCG, PAG, EP y SP). Así mismo, se presentan los cálculos de heterocigocidad (Htr) y H-W χ^2 para cada variación en los diferentes grupos de estudio.

Se detectaron diferencias en la distribución de alelos y genotipos entre grupos de estudio en las 4 variaciones genéticas evaluadas. Las distribuciones de frecuencias en el grupo PAG tendieron a ser las menos similares a las del resto de los grupos de estudio. Se detectó una frecuencia mayor de portadores de los genotipos IL1A:c.[-949CC], IL1B:c.[-583TT], IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2] e IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4] en el grupo PAG que en el resto de los grupos de estudio. Exceptuando el caso de la variación IL1B:c.315C>T, en el que se detectó una proporción mayor de portadores de los genotipos IL1B:c.[315CT] y IL1B:c.[315TT] en el grupo SP que en el resto de los grupos, la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas presentaron tendencias similares entre los grupos PCG, SP y EP para todas las variaciones evaluadas.

Las diferencias en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos de estudio fueron estadísticamente significativas únicamente para el genotipo IL1B:c.[315CC] ($p<0.05$)

M-W), presentándose en una proporción significativamente mayor de individuos de los grupos PCG y EP que en sujetos SP. Así mismo, el grupo PAG presentó una proporción significativamente mayor de portadores del genotipo IL1B:c.[-583TT] ($p < 0.05$ M-W) que el grupo SP (**tablas 5a-d**). Interesantemente, todos los genotipos y alelos evaluados de las variaciones IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T e IL1B:c.-583T>C, fueron detectados en sujetos mexicanos tanto con PCG, PAG como con SP. Sin embargo, en lo que respecta a la variación IL1RN:c.215-516(86)[2_6], los alelos IL1RN:c.215-516(86)[3] e IL1RN:c.215-516(86)[6], no fueron detectados en ningún sujeto de la población mexicana evaluada.

Un hallazgo interesante en cuanto a la distribución de genotipos fue que para las variaciones IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T e IL1RN:c.215-516(86)[2_6], el genotipo más frecuentemente detectado en la población mexicana fue el homocigoto del alelo considerado como "ancestral" (alelo no-variante, "normal", de referencia); de acuerdo con la secuencia de referencia del genoma humano inscrita en las bases de datos del NCBI, seguido por el genotipo heterocigoto y posteriormente por el genotipo homocigoto para el alelo variante. En contraste, para la variación IL1B:c.-583T>C, el genotipo más frecuentemente detectado fue el heterocigoto.

En la distribución de genotipos de la variación IL1A:c.-949C>T (**Figuras 2a y 3**) se observó una proporción muy alta (de 59.5% a 81.5%) de portadores del genotipo IL1A:c.[-949CC] en todos los grupos de estudio. La proporción de heterocigotos IL1A:c.[-949CT] varió entre 14.8% y 29.4%, mientras que la proporción de homocigotos IL1A:c.[-949TT] fue la más baja (3.4% a 4.8%). Para esta variación, todos los grupos se encontraron dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg. Así

mismo, se observó que existía una diferencia muy marcada en la proporción de portadores del alelo IL1A:c.[-949C] (entre 77.4% y 88.9%) y el alelo IL1A:c.[-949T] (entre 11.1% y 22.6%).

En el caso de la variación IL1B:c.315C>T (**Figuras 2b y 3**) la diferencia en la proporción de portadores de cada uno de los 3 genotipos similar para los grupos PCG, PAG y EP, sin embargo, en el grupo SP se detectó una disminución en la proporción de portadores del genotipo IL1B:c.[315CC] y del alelo IL1B:c.[315C], en relación a los otros grupos de estudio. Así mismo, en sujetos del grupo SP se encontró una proporción mayor de portadores del genotipo heterocigoto IL1B:c.[315CT] y del alelo IL1B:c.[315T] que en los grupos de sujetos con enfermedad periodontal tanto crónica como agresiva. La distribución de genotipos para esta variación, en todos los grupos de estudio, se observó dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg.

La variación IL1B:c.-583T>C (**Figuras 2c y 3**) mostró una distribución de genotipos notablemente diferente a la observada para las 2 variaciones anteriormente mencionadas. En este caso, se observó una proporción más elevada de portadores del genotipo heterocigoto IL1B:c.[-583TC] en todos los grupos de estudio que de cualquiera de los otros dos genotipos (51.9% a 73.8%). Se detectaron también proporciones relativamente altas de portadores del genotipo homocigoto IL1B:c.[-583TT] (entre 23.8% y 48.1%), mientras que para el genotipo IL1B:c.[-583CC], la proporción de portadores fue muy baja (0% a 5.2%). Es interesante que para esta variación, la distribución de genotipos en los grupos de PCG, EP y SP no se observó dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el caso de la distribución de los genotipos de la variación genética IL1RN:c.215-516(86)[2_6] (**Figuras 2d y 3**), los genotipos IL1RN:c.215-516(86)[2]+[3], IL1RN:c.215-516(86)[2]+[6], IL1RN:c.215-516(86)[3]+[3], IL1RN:c.215-516(86)[3]+[4], IL1RN:c.215-

516(86)[3]+[5], IL1RN:c.215-516(86)[3]+[6], IL1RN:c.215-516(86)[4]+[6], IL1RN:c.215-516(86)[5]+[5], IL1RN:c.215-516(86)[5]+[6] y IL1RN:c.215-516(86)[6]+[6], así como los alelos IL1RN:c.215-516(86)[3] y IL1RN:c.215-516(86)[6], no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio. La distribución de frecuencias genotípicas y alélicas para esta variación mostró patrones muy variables entre los 4 grupos de estudio. La proporción de portadores del genotipo IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2] fue de entre 11.9% y 22.2%, mientras que para el genotipo IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4] la proporción de portadores varió entre 36.2% y 51.9% y para el genotipo IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4] las proporciones de portadores detectadas en los diferentes grupo de estudio fueron de 22.2% a 45.2%. Los genotipos menos frecuentes fueron IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5] y IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5] con una proporción de portadores de 0% a 3.7%. Ningún sujeto de los grupo PAG y SP fueron portadores del genotipo IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5], y en el grupo SP tampoco se detectaron portadores del genotipo IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]. La distribución de genotipos en todos los grupos de estudio se observaron dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg.

En las **figura 3** se pueden observar más detalladamente, las diferencias en la proporción de portadores de los genotipos homocigotos y heterocigotos entre las 4 variaciones genéticas evaluadas, así como la similitud en la tendencia de la distribución en el grueso de la población y las diferencias puntuales entre grupos de estudio.

COMPARACIÓN DE ALELOS Y GENOTIPOS INDIVIDUALES

En las **tablas 5a-d** se muestran los resultados de las pruebas estadísticas empleadas para evaluar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de las 4 variaciones genéticas entre cada uno de los 4 pares de grupos de estudio. De los 35 alelos y genotipos individuales analizados, únicamente 4 (IL1B:c.[315CC], IL1B:c.[315T], IL1B:c.[-583TT] e IL1B:c.[-583C]) presentaron

frecuencias significativamente diferentes entre los grupos comparados (M-W). Para la comparación tanto entre PCG y SP, como entre EP y SP, las frecuencias del genotipo IL1B:c.[315CC] e IL1B:c.[315T] mostraron diferencias significativas entre los grupos experimental y control ($p < 0.05$); sin embargo, únicamente el genotipo IL1B:c.[315CC] presentó una asociación positiva con los grupos experimentales (PCG vs. SP: RM=1.94, IC95%=0.67-5.60. EP vs. SP: RM=2.36, IC95%=1.06-5.26).

En la comparación entre los grupos PAG y SP las frecuencias de IL1B:c.[-583TT] e IL1B:c.[-583C] mostraron diferencias significativas entre el grupo experimental y el control ($p < 0.05$); sin embargo, únicamente el genotipo IL1B:c.[-583TT] mostró una asociación positiva con el grupo experimental (RM=2.97, IC95%=1.05-8.38). En la comparación PAG vs. PCG, ninguno de los alelos o genotipos evaluados presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. A pesar de lo anterior, se consideró que ninguno de los alelos o genotipos individuales evaluados mostró suficiente capacidad para marcar a los grupos experimentales y separarlos de sus controles para sugerir que alguno sería un marcador genético útil. Esto se debió a que no puede emplearse un solo dato estadístico para efectuar una interpretación adecuada en el sentido de la utilidad de algún alelo o genotipo como marcador de enfermedad, sino que deben considerarse en conjunto diversos parámetros estadísticos tales como la significancia de las diferencias entre grupos y las estimaciones de riesgo, pero también la sensibilidad, especificidad, exactitud, y los errores estimados por medio de los índices de falsos positivos y negativos (**Kwee et al. 2008, Leslie et al. 2008, Lin et al. 2008**).

En la **figura 4** se presenta un gráfico de burbuja en el que se presenta la distribución de alelos y genotipos de acuerdo con los valores calculados de exactitud (EXC) e índice de falsos negativos (IFN), así mismo, el tamaño de las burbujas refleja el valor calculado de la razón de

momios (RM). Se establecieron puntos de corte para cada uno de estos parámetros para hacer una evaluación global de la capacidad diagnóstica de alelos y genotipos individuales de la siguiente manera: $EXC \geq 0.5$, $IFN \leq 0.5$, $RM \geq 1.0$. Únicamente, 4 alelos y 3 genotipos presentaron valores de estos parámetros dentro de los puntos de corte establecidos. Dichas variables genéticas individuales se encuentran señaladas por los recuadros punteados que se presentan en las **tablas 5a-d** y por el recuadro sombreado en el extremo superior derecho de la **figura 4**. En la **figura 5**, se ilustran las comparaciones entre grupos para las cuales cada uno de los 7 alelos y genotipos que cumplieron con los puntos de corte establecidos, fueron relevantes. Ninguna de las variables individuales demostró ser relevante exclusivamente para alguna de las comparaciones. Sin embargo, 3 alelos (IL1A:c.[-949C], IL1B:c.[315C] y IL1B:c.[-583T]) mostraron relevancia, de acuerdo con los punto de corte, para las comparaciones PCG vs. SP y EP vs. SP. Dos de las variables individuales (1 alelo: IL1RN:c.215-516(86)[2] y 1 genotipo: IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]), mostraron relevancia para las comparaciones PAG vs. SP y PAG vs. PCG. Un genotipo (IL1B:c.[315CC]) fue relevante en las comparaciones PCG vs. SP, PAG vs. SP y EP vs. SP, y un genotipo más (IL1A:c.[-949CC]) mostró relevancia para marcar a los grupos experimentales en todas las comparaciones.

A pesar de lo anterior, es importante destacar que como se puede observar en las **tablas 5a-d**, los alelos y genotipos señalados presentan valores deficientes en otros parámetros estadísticos como D_{max} , ESP o SNS, IFP, M-W, F y RR, que deben ser también considerados en la interpretación. Además, cabe señalar que mientras que los puntos de corte establecidos pueden ser adecuados como parámetros de exploración, son demasiado permisivos para ser utilizados como lineamientos para establecer una utilidad diagnóstica o predictiva.

GENERACIÓN DE VARIABLES CON ALELOS Y GENOTIPOS COMBINADOS (HAPLOTIPOS)

En la **figura 6** se proporciona una descripción de las variables generadas para identificar a los portadores de combinaciones de los alelos y genotipos seleccionados (haplotipos). En total se generaron 1,904 haplotipos de los cuales sólo 1,147 fueron detectados en por lo menos 1 sujeto de estudio. Los haplotipos estuvieron compuestos por 2 a 4 de los 35 genotipos y/o alelos individuales. Como se puede observar en la figura citada, Los haplotipos considerados para el análisis fueron de 3 tipos: *alélicos*: haplotipos que incluyeron en su composición únicamente alelos, *genotípicos*: haplotipos que incluyeron en su composición únicamente genotipos y, *alélicos/genotípicos*: haplotipos que incluyeron en su composición tanto alelos como genotipos. En total se incluyeron en los análisis 83 haplotipos alélicos (28 con 2 alelos, 37 con 3 alelos y 18 con 4 alelos individuales), 159 haplotipos genotípicos (56 con 2 genotipos, 79 con 3 genotipos y 24 con 4 genotipos individuales), y 905 haplotipos alélicos/genotípicos (84 con 2 variables individuales, 375 con 3 variables individuales y 446 con 4 variables individuales). La composición específica de cada haplotipo, así como el número de veces que cada variable individual fue incluida en los diferentes haplotipos se detallan en la **figura 6**. Así mismo, en la **figura 7** se muestran una gráfica de burbuja de los haplotipos detectados en la población de estudio ($n=1,147$), distribuidos de acuerdo con su exactitud (EXC) y el % de portadores en el grupo control (% $i=1$ control) para cada una de las 4 comparaciones entre grupos. Dicha figura refleja también los valores obtenidos para cada haplotipo en cuanto a las diferencias detectadas en el porcentaje de portadores para cada uno de ellos entre los grupos experimental y control (D_{max}).

COMPARACIÓN DE HAPLOTIPOS ENTRE GRUPOS DE ESTUDIO

Los análisis estadísticos empleados para evaluar y comparar a los 1,147 haplotipos detectados en la población de estudio, fueron los mismos utilizados para la evaluación de alelos y genotipos individuales. Las frecuencias de portadores de 15 de los 1,147 haplotipos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (M-H). Dichos haplotipos se presentan en la **figura 8**. Los haplotipos consistieron en 3 combinaciones alélicas (2 con 3 alelos, y 1 con 4 alelos), una combinación genotípica de 2 genotipos individuales y 11 combinaciones de tipo alélica/genotípica (2 con 2 variables individuales, 6 con 3 variables y 3 con 4). De los 15 haplotipos mencionados, 14 de ellos fueron relevantes para distinguir específicamente al grupo PAG de SP y/o de PCG, de los anteriores, un haplotipo mostró relevancia también para separar el grupo EP de SP. Únicamente un haplotipo fue relevante de manera exclusiva en la comparación PAG vs. PCG. Ninguno de los haplotipos fue relevante para distinguir específicamente al grupo PCG de SP.

La composición de los haplotipos relevantes, incluyó únicamente a 6 alelos y genotipos individuales (4 alelos y 2 genotipos) de los 35 evaluados. Resulta interesante destacar que a pesar de que en los análisis de alelos y genotipos individuales, únicamente 2 presentaron frecuencias significativamente diferentes entre los grupos PAG y SP, y de que ninguno de ellos demostró tener una capacidad aceptable para marcar o separar a dichos grupos; en los análisis de haplotipos, el mayor número de diferencias estadísticamente significativas se presentaron precisamente en la comparación entre los grupos mencionados. Aún más, los valores calculados en cuanto a la capacidad de haplotipos para marcar específicamente a los grupos experimentales y de separarlos de sus controles, así como en cuanto a las probabilidades de riesgo; fueron superiores en la comparación PAG vs. SP que en el resto de las comparaciones. Esto indica que la evaluación de la

asociación de variaciones genéticas con determinadas enfermedades, abordada mediante estrategias de análisis que consideran a los alelos y genotipos de diferentes variaciones de manera conjuntas, aumenta la capacidad para identificar asociaciones y la potencia global como marcadores de grupos específicos. Lo anterior, en contraste con las estrategias más comúnmente empleadas que consideran a cada variación genética de manera individual como entidades independientes.

SELECCIÓN DE HAPLOTIPOS

La selección de combinaciones se realizó mediante un procedimiento en 2 fases, de acuerdo con la descripción que se presentó en la sección de materiales y métodos.

Fase 1. En base a los análisis estadísticos

Los 15 haplotipos mencionados en los párrafos que anteceden, fueron seleccionados para ser incluidos en los análisis de datos posteriores debido a que, en adición a presentar diferencias significativas entre grupo experimental y control, presentaron $EXC > 0.65$, $\% i=1 \text{ control} < 0.3$, $D_{\max} > 0.25$, $RM > 3$, Fisher $p < 0.05$, Mantel-Haenszel $p < 0.05$, $\% i=1 \text{ experimental} > 0.5$, e $IFN < 0.5$. Los 15 haplotipos mencionados (**figuras 7 y 8**).

Fase 2. En base a redundancias

En la segunda fase de selección, se eliminaron las combinaciones redundantes utilizando el método que se describe en la **figura 9**. Inicialmente, los haplotipos fueron agrupados en base a las coincidencias en la presentación de alelos o genotipos individuales en 4 grupos. Los haplotipos del grupo 1 fueron aquellos que presentaron en su composición al alelo IL1A:c.[-949C] ($n=4$), los del grupo 2 al alelo IL1B:c.[315C] ($n=3$), los del grupo 4 al genotipo IL1A:c.[-949CC] ($n=6$), y los del grupo 4 al genotipo IL1B:c.[315CC] ($n=2$). Se realizó una discriminación intra-grupal en la que los

haplotipos redundantes fueron eliminados y únicamente los de mayor tamaño fueron conservados para los análisis posteriores. Lo anterior resultó en la selección de 5 haplotipos (2 del grupo 1, y uno de cada uno de los grupos 2, 3, y 4). Posteriormente, se realizó una discriminación inter-grupal utilizando el mismo criterio que para la selección intra-grupal; es decir, se eliminaron los haplotipos redundantes de menor tamaño, y se conservaron sólo aquellos con combinaciones únicas y de mayor tamaño. Al completar la secuencia de selección se conservaron únicamente 4 haplotipos, todos ellos conformados por combinaciones de 4 alelos o genotipos individuales. Tres de los haplotipos seleccionados fueron de tipo alélico/genotípico y uno de tipo alélico.

Los haplotipos seleccionados se mencionan a continuación:

1. IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]
2. IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]
3. IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]
4. IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]

En la **Figura 10** se proporciona una descripción de la composición de los 4 haplotipos seleccionados. Todos los haplotipos seleccionados fueron relevantes para marcar al grupo PAG y separarlo de los grupos PCG y/o SP. Interesantemente, todas las variaciones genéticas evaluadas estuvieron representadas en los haplotipos seleccionados, por lo menos con un alelo o genotipo. Cabe señalar que todas las combinaciones que se conservaron después de esta última fase de selección exhibieron, en términos generales, una buena capacidad y potencia global para marcar al grupo PAG. En la **figura 11** se presentan las distribuciones de frecuencias en cada uno de los grupos de estudio de los 4 haplotipos seleccionados. En todos los casos, el grupo PAG presentó una mayor proporción de portadores que el resto de los grupos de estudio. La diferencia fue

particularmente grande para el cuarto haplotipo en comparación al grupo SP, y para el tercer haplotipo en comparación al grupo PCG.

PROPUESTA DE MARCADORES GENÉTICOS

Las **figuras 12a-d** muestran la distribución de cada uno de los 4 haplotipos seleccionados en los diferentes grupos de estudio. Asimismo, se ilustra la separación que cada uno de los haplotipos proporciona entre los grupos experimental y control en cada una de las 4 comparaciones entre grupos. En dichas **figuras 12a-d** se presentan además los resúmenes de los análisis estadísticos empleados para evaluar a cada haplotipo en las diferentes comparaciones. Las **figuras 12a y 12d** muestran, respectivamente, los datos correspondientes a las comparaciones PCG vs. SP y EP vs. SP. Ninguno de los haplotipos seleccionados proporcionó una separación adecuada entre los grupos control y experimental, o mostró relevancia para marcar de manera específica a alguno de los grupos experimentales. Por otra parte, en las **figuras 12b y 12c** se puede observar que los cuatro haplotipos seleccionados proporcionan una buena separación entre el grupo PAG y los grupos SP y PCG.

Los haplotipos 2, 3 y 4 (ver numeración proporcionada en la sección anterior), presentaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias entre el grupo PAG y SP ($p < 0.01$ M-W). Sin embargo, la separación máxima entre dichos grupos se obtuvo con el haplotipo 4 (señalado por el recuadro punteado en la **figura 12b**). La exactitud diagnóstica de los 4 haplotipos varió entre 0.59 y 0.69, con índices de falsos negativos entre 0.29 y 0.40. Para los 4 haplotipos, la probabilidad de riesgo basada en la RM fue mayor a 2.5 (de 2.6 a 4.6). En el caso de los haplotipos 2, 3 y 4 la probabilidad de riesgo fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$, haplotipos 2 y 3; $p < 0.01$, haplotipo 4, M-H). En conjunto, los resultados de los análisis indicaron

que el haplotipo 4 fue el que presentó la mejor capacidad para marcar al grupo PAG y separarlo del grupo SP, con la mayor potencia y menor error detectados.

Por otra parte, los haplotipos 1, 3 y 4, presentaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias entre el grupo PAG y PCG ($p < 0.05$, haplotipo 1; $p < 0.01$, haplotipos 3 y 4, M-W). La separación máxima entre dichos grupos se obtuvo con el haplotipo 3 (señalado por el recuadro punteado en la **figura 12c**). La exactitud diagnóstica de los 4 haplotipos varió entre 0.60 y 0.68, con índices de falsos negativos entre 0.29 y 0.40. Para los 4 haplotipos la probabilidad de riesgo basada en la RM fue mayor a 2.3 (de 2.4 a 4.1). En el caso de los haplotipos 1, 3 y 4 la probabilidad de riesgo fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$, haplotipos 1 y 4; $p < 0.01$, haplotipo 3, M-H). En conjunto, los resultados de los análisis indicaron que el haplotipo 3 fue el que presentó la mejor capacidad para marcar al grupo PAG y separarlo del grupo PCG, con la mayor potencia y menor error detectados.

La propuesta de marcadores genéticos se realizó considerando únicamente a los haplotipos que presentaron el mayor poder, menor error y mejor capacidad para separar y marcar específicamente a los grupos experimentales en cada una de las 2 comparaciones PAG vs. SP y PAG vs. PCG. Por lo tanto, se sugieren como marcadores de la PAG en la población mexicana a los haplotipos 3 y 4.

EVALUACIÓN DEL GENOTIPO PST™

Con respecto al genotipo PST™ el cual contiene combinaciones de los alelos IL1A:c.[-949T] e IL1B:c.[315T], en el presente estudio se seleccionaron 218 haplotipos que contenían este genotipo en cualquiera de los 4 grupos de estudio. De los anteriores, 9 presentaron diferencias significativas (M-W) en el porcentaje de portadores como se muestra en la **figuras 13**. Dichos haplotipos fueron

significativos para las comparaciones PCG vs. SP y EP vs. SP. En la **figura 14** se resumen los detalles de las estadísticas para cada uno de los haplotipos mencionados. Es importante señalar, que en todos los casos los grupos control (SP) presentaron un mayor porcentaje de dichos haplotipos que los grupos experimentales. De ahí que las diferencias no se consideraron relevantes como marcadores de la enfermedad.

Dado que los haplotipos seleccionados inicialmente para evaluar al genotipo PST™, consideraron además la incorporación de alelos y/o genotipos de otras variaciones genéticas, se realizó un segundo análisis en el que fueron considerados únicamente aquellos haplotipos con el genotipo PST™ “puro”, es decir, en los que no se tomó en consideración la presencia de otras variaciones, sino exclusivamente los alelos relacionados con el genotipo en cuestión. La **figura 15**, ilustra la distribución de frecuencias de los 9 haplotipos que incluyen al genotipo PST™ “puro” en los 4 grupos de estudio. En 6 de los 9 haplotipos, el grupo SP presentó una mayor proporción de portadores que cualquiera de los grupos con enfermedad periodontal, y en los 3 haplotipos restantes, las frecuencias de portadores fueron demasiado bajas para poder establecer asociaciones con la periodontitis. Los resultados de los análisis estadísticos relacionados con la evaluación de haplotipos con genotipo PST™ “puro” se presentan en la **figura 16**. En todos los casos el grupo control SP presentó un mayor porcentaje de portadores que los 3 grupos de sujetos con enfermedad periodontal.

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio se mostraron las asociaciones que existían entre combinaciones (haplotipos) de los diferentes alelos y genotipos específicos en los genes de la familia de la interleucina 1, y su relación con la periodontitis agresiva generalizada en sujetos mexicanos.

En la actualidad es necesario buscar nuevas alternativas para el odontólogo que permitan un mejor y adecuado diagnóstico periodontal, con pruebas que sean precisas, de bajo costo y de fácil aplicación dentro de la práctica privada, es por esta razón que nos encontramos en un momento donde la secuenciación del genoma humano ha facilitado la identificación de algunas variaciones que pueden estar involucradas en la predisposición a padecer ciertas enfermedades. Se ha calculado que dentro del genoma existen entre 25,000-50,000 genes constituidos de 3 billones de nucleótidos, en los cuales existen entre 7 y 10 millones de variaciones de tipo SNP (**Hinds *et al.* 2006, Kinane & Hart 2003**) lo cual hace que cada vez sea más complejo buscar un modelo que sea lo suficientemente preciso para poder procesar e interpretar esta cantidad de datos, por esta razón una de las mayores dificultades para la interpretación adecuada de los datos obtenidos en las variaciones genéticas y la asociación que guardan con enfermedades, es relacionar la información de la combinación de múltiples alelos y genotipos en un gran número de variaciones y asociarlos no sólo con la patología sino con los efectos funcionales que poseen estos genotipos complejos.

En el caso de la enfermedad periodontal donde se sabe que existen diversos factores que favorecen la progresión de la enfermedad periodontal, actualmente existe evidencia de que los genes tienen un papel importante en la predisposición y la progresión de las enfermedades periodontales (**Kinane & Hart 2003, Kornman 2006**). Los individuos pueden responder de forma

diferente a los cambios en el medio, y esta respuesta diferencial se ve influenciada por los perfiles genéticos individuales, es decir, por las variantes alélicas que tienen un efecto en la estructura de los tejidos (inmunidad innata), respuesta a anticuerpos (inmunidad adaptativa) y a mediadores inflamatorios (inflamación no específica) (**D'Aiuto et al. 2004, Galbraith et al. 1998, Mark et al. 2000**).

Actualmente se sabe que las enfermedades pueden transmitirse de manera hereditaria y a diferencia de las mutaciones donde se puede eliminar el producto del gen o cambiar la proteína del producto hace que se interrumpan otros procesos biológicos, pero a diferencia de las variaciones genéticas que son importantes en enfermedades complejas, se ha visto que son poco obstaculizadas y usualmente trabajan dentro del rango normal de la función. Esto refleja el hecho de que dichas variantes son comunes en la población. Muchas de las enfermedades asociadas a una variación génica son comunes y pueden presentar una frecuencia alélica mayor de 20% en la población, pero esto no es un indicio para afirmar que el hecho de portar un alelo sea suficiente para desencadenar la enfermedad, pero se ha observado que la presencia del alelo variante en las variaciones genéticas IL1A:c.-949C>T e IL1B:c.315C>T han sido asociadas a diversas enfermedades como: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerativa, miastenia grave, alopecia y ciertas formas de diabetes (**Frazer et al. 2009, Kinane & Hart 2003, Sakellari et al. 2003**). De hecho, la presencia de algunos alelos asociados a una enfermedad en una proporción significativa de la población en general que no está afectada refleja que, mientras estos alelos pueden influenciar el riesgo de enfermedad estos no son determinantes en la mayoría de los casos. Por esta razón, ciertas medidas de especificidad y sensibilidad de un alelo asociado a una enfermedad son una herramienta útil que permite predecir si la misma es deseable (**Kinane & Hart 2003**).

La mayoría de las enfermedades craneofaciales que están asociadas a los genes y que muestran patrones de herencia Mendeliana como: la amelogenesis imperfecta, Síndrome de Crouzon, y la displasia cleidocraneana, se ha reportado que este tipo de enfermedades es dominada por los componentes genéticos y la interacción entre genes y factores ambientales de riesgo o microorganismos son poco significativos. En el caso de la enfermedad periodontal donde es considerada multifactorial, se hereda el riesgo de desarrollar la enfermedad pero no la certeza de presentarla, por tal motivo la interacción entre los genes y los factores ambientales de riesgo o microorganismos en la periodontitis es compleja y discreta y por tal motivo la enfermedad periodontal no posee una herencia de tipo Mendeliana (**Hinds et al. 2006, Kinane & Hart 2003**).

Existen reportes de la fuerte evidencia de la influencia que tienen los factores genéticos en la susceptibilidad y progresión de la enfermedad periodontal, ya que la presencia de dichos factores han sido vinculados a la herencia familiar en la distribución de la periodontitis en particular de su forma agresiva (**Costa et al. 2008**). La periodontitis agresiva, a diferencia de la periodontitis crónica, generalmente exhibe una desproporción entre la severidad de la destrucción de los tejidos periodontales y la cantidad de depósitos bacterianos, sugiriendo una elevada susceptibilidad del hospedero. Las variaciones genéticas pueden ser una de las explicaciones en la prevalencia, severidad y la extensión de la destrucción periodontal.

Dada la gran diversidad poblacional que existe a nivel mundial ello ha provocado que exista un mayor interés en el campo de la investigación, en específico del área odontológica, ya que los datos que se arrojan de estudios realizados entre poblaciones nos permite realizar mapas de asociación donde se pueda encontrar una relación de las variaciones genéticas con la predisposición, etiología y los factores ambientales de riesgo de ciertas enfermedades en diferentes poblaciones. Es importante remarcar que la población que conformó este estudio

fueron pacientes que pertenecían a la “población mexicana”, es decir, que solo se incorporaban al estudio aquellos que cumplieran con los criterios de inclusión, es decir, mexicanos por nacionalidad y por nacimiento que sus padres y por lo menos 2 de sus abuelos también fueran mexicanos; y que ninguno perteneciera a alguna entidad indígena, a la raza negra, asiática o caucásica. Los sujetos incluidos en el estudio provenían del Distrito Federal y de la Zona Metropolitana lo cual hace que nuestro estudio tenga mayor especificidad porque realizamos nuestra investigación en grupo homogéneo perteneciente a la “población mexicana”.

En el caso de las variaciones genéticas pertenecientes a la familia de la interleucina 1, estas han sido estudiada en la población Hispana, Afroamericana, Griega, Brasileña, Árabe y Europea. En particular, la presencia de las variaciones genéticas IL1A:c.-949C>T e IL1B:c:315C>T, ha recibido gran atención porque se ha sugerido que existe una relación entre ellas y la susceptibilidad a las enfermedades periodontales en pacientes fumadores y no fumadores (**Caffesse et al. 2002a**). Los alelos combinados de estas variaciones en los que se presentan tanto IL1A:c.[-949T] como IL1B:c:[315T], son considerados como el “genotipo compuesto de susceptibilidad a la enfermedad periodontal” en individuos no fumadores (**Kornman et al. 1997a**). Se ha reportado que los portadores de dicho genotipo presentan 6 veces más riesgo de padecer formas severas de enfermedad periodontal que aquellos que no son portadores. En la actualidad, sólo existe una prueba en el mercado auxiliar en el diagnóstico de las enfermedades periodontales; la prueba PST™ la cual ha sido considerada como un marcador genético predictivo del riesgo a padecer formas severas de periodontitis.

Diversos estudios se han realizados en poblaciones del mundo sobre la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas para las variaciones genéticas de IL-1. En el caso de la población caucásica del Norte de Europa con periodontitis crónica severa se evaluaron 134 sujetos

destacándose que el 30% fueron positivos a la presencia de los alelos IL1A:c.[-949T] e IL1B:c.[315T], 60% eran fumadores y 30% presentaba una periodontitis menos severa. En el 29.1% de los casos se detectaron ambos alelos, determinado que se trataba de un “genotipo compuesto” el cual es reconocido como un marcador para la severidad de la enfermedad periodontal (**Huynh-Ba et al. 2007, Kornman et al. 1997a, Kornman & di Giovine 1998, Lang et al. 2000**). Para el caso de la población suiza se realizó un estudio donde se reportó que el 35.3% de la población presentaba este genotipo compuesto (**Lang et al. 2000**). Otro estudio realizado en la población mexicana encontró que un 26% de la población era portadora de dicho genotipo ya que se ha propuesto que la frecuencia de periodontitis es elevada en la población Hispana (**Caffesse et al. 2002b, Gonzales et al. 2003**). Para el caso de Afroamericanos y poblaciones Chinas la frecuencia de portadores de este genotipo ha sido reportada alrededor del 3.3% (**Armitage et al. 2000, Caffesse et al. 2002b, Sakellari et al. 2003, Wagner et al. 2007**), mientras que en la población Griega se determinó que el 44% de la población era positiva (**Sakellari et al. 2003**).

En el caso particular de nuestra investigación realizada en una población de mestizos mexicanos incluidos en este estudio, se encontró que el genotipo más frecuente detectado para la variación IL1A:c.-949C>T, independientemente del grupo de estudio, fue IL1A:c.[-949CC] (59.5% a 81.5%), seguido por el genotipo heterocigoto (14.8% a 36.2%) y el homocigoto IL1A:c.[-949TT] (3.4% a 4.8%). Para dicha variación, el alelo detectado con menor frecuencia fue IL1A:c.[-949T] (11.1 a 22.6%). Así mismo, para la variación IL1B:c.315C>T, fue IL1B:c.[315CC] (59.5% a 79.3%) seguido por su genotipo heterocigoto IL1B:c.[315CT] (59.3% a 79.3%), seguido por el genotipo heterocigoto (17.2% a 33.3%) y el homocigoto IL1B:c.[315TT] (3.4% a 7.1%) y en el caso de esta variación el alelo menos frecuente fue IL1B:c.[315T] (12.1% a 23.8%). Así mismo para las variaciones IL1B:c.-583T>C e IL1RN:c.215-516(86)2_6 se encontró que los genotipos más comunes

fueron IL1B:c.[-583TC] (51.9% a 73.8%) e IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4] (36.2% a 51.9%), respectivamente. Para estas variaciones los genotipos homocigotos siguieron a los genotipos anteriores en el porcentaje de portadores.

La detección de variaciones genéticas específicas en la actualidad puede servir como una herramienta diagnóstica y predictiva muy útil dentro de la práctica clínica para el manejo de enfermedades multifactoriales comunes. Se tiene conocimiento de que una amplia gama de variaciones en diversos genes que codifican para citocinas inflamatorias han sido propuestas como buenos marcadores de predisposición y riesgo a diversas enfermedades y para el caso en específico de el gen de IL1 en enfermedades como la espondilitis anquilosante (**Maksymowych et al. 2006**), oclusión de la arteria retiniana (**Steinbrugger et al. 2009**), queratocono (**Kim et al. 2008**), cáncer de seno (**Grimm et al. 2009, Hefler et al. 2005**), enfermedad coronaria (**Arman et al. 2008**), gastritis (**Melo Barbosa et al. 2009**), cáncer de ovario (**Sehouli et al. 2003**), cáncer de próstata (**Lindmark et al. 2005, Saenz-Lopez et al. 2008**), lupus eritematoso, (**Barksby et al. 2007, Parks et al. 2004**), artritis (**Barksby et al. 2007, Johnsen et al. 2008**) y cáncer de pulmón (**Engels et al. 2007**).

En las diversas variaciones de los genes pertenecientes a la IL1 se ha observado que en diferentes estudios las asociaciones entre alelos y genotipos presentes en las variaciones de esta interleucina, se muestra cierta relación a padecer diversos grupos de enfermedades sistémicas ya que algunas de estas variaciones génicas han sido asociadas con enfermedades cardiovasculares, indicando que las alteraciones en la genética del sistema inflamatorio pueden modificar el riesgo a padecer estas enfermedades. Se ha reportado en la literatura la importancia que posee IL-1 en la sobrevivencia celular, proliferación y angiogénesis en las células cancerígenas, y su secreción está asociada con formas más agresivas de cáncer de mama (**Grimm et al. 2009, Hefler et al. 2005**).

Para las variaciones de IL1A existen estudios que demuestran la asociación entre las variantes y el riesgo a padecer enfermedad de Alzheimer **(Maksymowych et al. 2006)**. Mientras que para enfermedades inflamatorias autoinmunes como la artritis reumatoide se realizó un estudio en sujetos con descendencia Europea quienes presentaban la enfermedad donde se buscaba determinar si las variaciones genéticas IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C e IL1B:c-949 C>T estaban asociadas con formas más severas o erosivas de la enfermedad, pero no se encontró ninguna asociación con la presencia de estos alelos en el riesgo y severidad de la artritis reumatoide **(Johnsen et al. 2008)**. En estudios similares para determinar si el alelo IL1A:c.[-949T] tenía un efecto con él un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias y quimiocinas y que a su vez estas estuvieran asociadas con un aumento en el riesgo de cáncer de próstata no se encontró asociación, mientras que para otros tipos de cáncer como el gástrico y de las variaciones genéticas IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C si están asociadas a un incremento en el riesgo **(Saenz-Lopez et al. 2008)**. Para el caso de otra de las enfermedades inflamatorias como el Lupus Eritematoso Sistémico se realizó un estudio en la población Afroamericana donde se encontró un incremento en el riesgo a padecer Lupus en los sujetos homocigotos del genotipo IL1A:c.[-949CC] comparados con aquellos que eran portadores del alelo IL1A:c.[-949T] que mostraron poca asociación **(Parks et al. 2004)**.

Para las variantes de IL 1B que han sido asociadas con un incremento en el riesgo de padecer diversos tipos de cáncer tal como: cáncer gástrico, cáncer de pulmón y otras enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Parkinson; en el caso de cáncer de pulmón se realizó un estudio en una población no Hispana de Caucásicos en individuos de edad mayor, fumadores en el cual se determino que los sujetos homocigotos IL1B:c.[315TT] y heterocigotos IL1B:c.[315CT], para el alelo variante presentaban un incremento en el riesgo de

padecer cáncer de pulmón, una explicación de esto puede deberse a que la variante IL1B:c.315C>T en asociación con otra variación génica puede afectar la expresión de IL1B en la enfermedad pulmonar, ya que presentaban elevados niveles de proteína C reactiva, que es una proteína secretada por el hígado durante la inflamación aguda. En el caso del Lupus Eritematoso Sistémico en la población Afroamericana se mostró una asociación significativa de riesgo en los pacientes que eran portadores del genotipo IL1B:c.[315CT] comparados con los homocigotos del genotipo IL1B:c.[315CC] y portadores del alelo IL1B:c.[315T] en los cuales también se reportó la asociación con un incremento en el riesgo de lupus (**Parks et al. 2004**). Para la variación IL1B:c.[-583 T>C] está fuertemente asociada con el riesgo de padecer cáncer en mujeres Caucásicas y su presencia está ligada al estadio del tumor y a la participación de nódulos linfáticos en estos pacientes (**Hefler et al. 2005**). Se ha reportado que IL 1 tiene un papel importante en la aterosclerosis y que diversas variaciones genéticas pertenecientes a la familia de esta interleucina están asociadas con enfermedades vasculares como la enfermedad arterial coronaria, donde en un estudio realizado en la población italiana no se encontró riesgo para con el hecho de ser portador de la variación IL1B:c.[315 C>T] y no existieron diferencias en la distribución de alelos IL1B:c.[315C], IL1B:c.[315T] y en los genotipos IL1B:c.[315 CT] IL1B:c.[315 CC] IL1B:c.[315TT] entre los casos y los controles. Los resultados de este estudio no mostraron diferencia en la distribución de esta variación de acuerdo al número de vasos afectados en pacientes con reciente infarto al miocardio. A diferencia de la variación que estaba asociada con el riesgo a presentar un infarto al miocardio en pacientes jóvenes, lo cual sugiere el posible papel de la variación IL1B:c.[315 C>T] en el riesgo de trombosis más que en el desarrollo de la aterosclerosis (**Vohnout et al. 2003**).

Para IL1-RN específicamente en su alelo variante, ha sido relacionado con diabetes mellitus tipo 1, psoriasis, colitis ulcerativa, lupus eritematosos sistémico, fracturas por osteoporosis,

nefropatía diabética, esclerosis múltiple, hipertensión y síndrome de déficit de atención **(Maksymowych et al. 2006)** .

La mayoría de las enfermedades autoinmunes muestra una importante participación de las variaciones génicas de IL IL1RN:c.215-516(86)2_6, ya que se ha reportado que el alelo IL1RN:c.215-516(86)[2] está asociado con enfermedades tales como: lupus eritematoso, y esclerosis múltiple. En pacientes femeninas Caucásicas el hecho de ser portador del alelo IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2] ha sido asociado con el acortamiento de la enfermedad y la sobrevivencia **(Grimm et al. 2009)**. En el caso del alelo IL1RN:c.215-516(86)[2] ha sido detectado en pacientes con úlceras gástricas y adenocarcinoma, se sabe que los pacientes portadores de este alelo poseen mayor riesgo de desarrollar úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico, así como, un alto grado de inflamación y actividad neutrofílica en la mucosa gástrica en la población brasileña **(Melo Barbosa et al. 2009)**.

En la mayoría de los estudios que se han realizado en relación a las enfermedades periodontales, se han enfocado en las variaciones genéticas propias de la IL-1. Esto debido, a la amplia difusión que se le ha dado respecto a los resultados de los estudios que sustentan la colocación de la prueba PST™ en el mercado que ha sido descrita previamente en la parte introductoria de este texto. Pero desafortunadamente aún no existe una clara comprensión del efecto que los factores genéticos tienen sobre los mecanismos fisiológicos de destrucción periodontal. Actualmente se sabe que el factor inflamatorio es esencial para el desarrollo y la severidad de esta enfermedad, con lo cual podemos establecer una pauta respecto a que el factor inflamatorio propio de otras enfermedades comunes como la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso, Síndrome de Sjögren entre otras. Dentro de lo que anteriormente reportamos respecto a lo que actualmente existe en la literatura, podemos establecer que la gran mayoría de estas variaciones del gen de IL-1 están relacionadas con alguna

enfermedad sistémica, y de aquí que se desprenda el hecho, de que si la patogenia de dichas enfermedades es similar a la de las enfermedades periodontales, los determinantes de genéticos de predisposición y riesgo, también pueden serlo y se han publicado nuevos estudios donde se contempla esta posibilidad.

A la fecha existen diversos estudios donde se reporta la prevalencia y la asociación de las variaciones IL1B:c.[315 C>T] IL1A:c.[-949] IL1B:c.[-583T>C] e IL1RN:c.215-516(86)2_6 y los diferentes estados de salud periodontal en sujetos de diversas poblaciones. Donde la mayoría de estos estudios se demuestra que el ser positivo al genotipo compuesto IL1A:c.[-949T] + IL1B:c.[315T] incrementa el riesgo en la progresión y severidad de la periodontitis crónica **(Greenstein & Hart 2002, Kornman 2006)**. Hoy en día sabemos que las variaciones en ciertos genes de IL-1, son responsables de provocar la sobreproducción de esta proteína al exponer al individuo a una carga bacteriana. En otro estudio se observó que el presentar una variación génica donde el alelo 2 está presente en el locus del gen de IL-1, en su posición -949 está asociado a un incremento en los niveles de la proteína IL-1A . Este incremento de la proteína en pacientes con periodontitis severa es aproximadamente cuatro veces mayor de lo normal. Las diferencias son más claras en el estudio realizado por **(Kornman et al. 1997a)** en sujetos no fumadores del Norte de Europa con las variantes genéticas IL1A:c.[-949C>T] e IL1B:c.[-583T>C] (genotipo compuesto), y observaron que la variación era significativamente más frecuente en sujetos con periodontitis avanzada(67%), que en sujetos con periodontitis leve o sin enfermedad periodontal (22%). Este estudio sugiere que el ser portador del alelo 2, tanto en forma homocigota como heterocigota en ambos locus, predispone en mayor medida a estos individuos a desarrollar enfermedad periodontal en su estado severo **(Kornman et al. 1997a)**.

En un estudio realizado en la población Chilena en 330 sujetos donde se reportó que la prevalencia de heterocigotos de IL1A:c.[-949CT] y de IL1B:c.[-583 TC] fue significativamente elevada en relación a su asociación con la periodontitis, mientras que los sujetos homocigotos para el alelo 1 de IL1B:c.[-583 TT] fue un factor protector para la enfermedad periodontal. La prevalencia del un genotipo compuesto fue significativamente alta (26.06%) que en los controles (9.9%) y estuvo significativamente asociada con la periodontitis y sin tener en cuenta si eran fumadores y la severidad de su estado periodontal (**Lopez et al. 2005**). Similarmente en otro estudio en la población adulta Europea se determinó si el alelo IL1B:c.[-583C] está asociado con un incremento en la susceptibilidad y severidad en la enfermedad periodontal así como un aumento en el sangrado durante el mantenimiento periodontal (**Cullinan et al. 2001**).

En un estudio realizado en la población Brasileña donde la variación genética IL1B:c.[-583 T>C] del gen de IL-1B se ha mostrado que afecta los niveles de esta citocina y la relación que tiene con el establecimiento de las enfermedades inflamatorias incluyendo a la enfermedad periodontal. El objetivo de este estudio era determinar la asociación de esta variación genética y la ocurrencia de las diferentes formas clínicas de periodontitis en esta población donde se encontró que el grupo de periodontitis crónica mostraron un elevado porcentaje del alelo IL1B:c.[-583T] (28%) comparado con los del grupo de periodontitis agresiva (10.7%) y el grupo control (8.7%) donde se sugiere que la variación genética IL1B:c.[-583T>C] del gen de IL1B puede ser un factor de riesgo para la periodontitis crónica en sujetos Brasileños (**Moreira et al. 2007a**).

La asociación de la variación génica de IL1RN:c.215-516(86)2_6 ha sido poco estudiada en diversas enfermedades y del mismo modo para la enfermedad periodontal donde existe un estudio en sujetos de una población Turca donde se buscaba determinar si el ser portador del alelo IL1RN:c.215-516(86)[2] tenía relación con la periodontitis donde la distribución en la

presencia de este alelo fue elevado en el grupo de Periodontitis agresiva y el **grupo control (Berdeli et al. 2006)**. Sin embargo, en la población Brasileña también se observó que el alelo IL1RN:c.215-516(86)[2] está asociado con la severidad de periodontitis crónica **(Ferreira et al. 2008)**.

En el presente estudio realizado en sujetos mexicanos los alelos y genotipos de la variación fueron analizados de manera individual, y se determinó que ninguno de estos puede ser considerado un buen estimador de riesgo ($RM < 3.0$) en la enfermedad periodontal. A diferencia de lo reportado por **(Kornman et al. 1997a)** en el que se determinó que la presencia del genotipo compuesto IL1A:c.[-949T] + IL1B:c.[315T] favorece que se tenga 6 veces mayor riesgo de presentar periodontitis. A diferencia de nuestro estudio, Kornmann realizó su estudio en sujetos no fumadores del Norte de Europa para marcar específicamente periodontitis en su forma crónica y en nuestra población teníamos como objetivo determinar si el genotipo PST es un marcador adecuado en la población mexicana pero para el grupo de periodontitis agresiva. Los resultados muestran que el genotipo PST no es buen marcador de enfermedad periodontal dentro de la población Mexicana, sin embargo, la combinación de haplotipos (alelos y genotipos) pueden considerarse buenos marcadores de riesgo ($RM > 3.0$). Por lo que cual se determinó que los sujetos portadores de los haplotipos que contenían al genotipo PST presentan un aumento en el riesgo a padecer periodontitis en su forma agresiva, ya que la combinación IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2] presentó una RM de 4.655 en el grupo PAG vs. SP y en para el grupo PAG vs. PCG la combinación IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T] + IL1RN:c.215-516(86)[2] tuvo una RM de 4.100 siendo estas combinaciones las que presentan una buena separación con el grupo experimental PAG y el grupo control como se observa en las estadísticas y **figuras 12a-c** con lo cual se determino que de las 4

combinaciones seleccionadas que contienen el genotipo PST son buenos marcadores de riesgo para el grupo de PAG.

Muchos de los estudios publicados relacionados con la enfermedad periodontal y la susceptibilidad genética se basan en los resultados reportados basados en estadísticas, específicamente por los valores que reportan en las razones de momios y la significancia de pruebas comparativas entre los casos y los controles. Los valores de estas pruebas no son del todo precisas para determinar la habilidad de las variaciones genéticas para marcar diversas enfermedades, pero en nuestro estudio no sólo se consideraron estos valores porque suelen ser insuficientes e inexactas, sino en la necesidad de incluir indicadores que comprendan, sensibilidad, especificidad, exactitud, índice de falsos positivos y negativos, riesgo relativo, valores predictivos positivos y negativos, así como indicadores como el porcentaje entre los casos y los controles. En este estudio estos marcadores se consideraron en las evaluaciones de alelos y genotipos individuales así como de haplotipos. En el caso de esta investigación los genotipos y alelos evaluados de forma individual no mostraron razones de momios significativas, por lo cual no puede ser considerado un buen marcador, a diferencia de las que se presentaron en la evaluación de haplotipos, las cuales mostraron una razón de momio relativamente alta y donde se presentaron diferencias significativas entre casos y controles exhibiendo una mejor habilidad diagnóstica y predictiva de la enfermedad periodontal. Las cifras para uno de los haplotipos que mejor marcaron y separaron al grupo PAG para separarlo del grupo SP con SNS=0.60%, ESP=0.77%, EXC=0.70%, IFP=0.24%, IFN=0.41%, VPP=0.61%, VPN=0.74%, M-W $p=0.003$, Fisher $p=0.005$, RR= 2.49% y RM =4.65, considerando el que mostró mejores valores para poder ser contemplados como buen marcador de para PAG.

Los resultados arrojados en nuestro estudio nos permiten dilucidar que de acuerdo a todos los estudios reportados en este trabajo asociados con el genotipo PST™ y su asociación con la susceptibilidad de riesgo a padecer enfermedad periodontal en diversas poblaciones del mundo, se contraponen con lo encontrado en nuestra investigación, ya que el ser portador del genotipo PST “puro” no es una determinante en sí para presentar periodontitis, ya que en la población Mexicana este genotipo como tal, no puede ser un buen marcador, ya que solo la presencia del genotipo PST mas otra combinación puede ser considerado un buen estimador de riesgo, aunque sus valores estadísticos no son los mejores ni ideales para considerarse un buen marcador de PAG.

V. CONCLUSIONES

En este estudio se presentaron las distribuciones alélicas y genotípicas de 4 variaciones pertenecientes al gen de interleucina 1 IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C, IL1RN:c.215-516(86)[2_6]. Se evaluaron sujetos mexicanos con periodontitis crónica generalizada, periodontitis crónica agresiva y salud periodontal. Cuando fueron evaluados los alelos y genotipos de forma individual, mostraron poca relevancia para marcar a los grupos con enfermedad, a diferencia de la evaluación que se realizó de los haplotipos en la que 4 combinaciones fueron seleccionadas, las cuales mostraron ser buenos estimadores de riesgo para marcar específicamente al grupo PAG y separarlo de los grupos PCG y SP. De acuerdo a nuestros resultados se puede concluir que la presencia del genotipo PST en su forma pura no es considerado un buen marcador de riesgo en la población mexicana., ya que es necesaria la presencia de otra combinación para que pueda ser considerado un buen estimador de riesgo de acuerdo a los valores estadísticos que arrojó nuestro estudio.

Si nuestros resultados pueden ser confirmados por medio de estudios inmunológicos que determinen y cuantifiquen la producción de citocinas en los sujetos que sean portadores de estos haplotipos, podría tener una gran relevancia en el manejo de los pacientes con enfermedad periodontal, para poder en un futuro estandarizar pruebas que sean de bajo costo, y de uso fácil que permitan detectar susceptibilidad o riesgo de presentar periodontitis en su forma agresiva, o bien ofrecer a los pacientes un tratamiento y mejorar el pronóstico de las terapias periodontales.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 2000 **2002**; 29(177-206).
- Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol* **2001**; 72(3): 368-373.
- Arman A, Soylu O, Yildirim A, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist gene VNTR polymorphism is associated with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol* **2008**; 91(5): 293-298.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **1999**; 4(1): 1-6.
- Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* **2000**; 71(2): 164-171.
- Arregui I, Guisasola C, Menendez M, *et al.* IL-1 genotype distribution in a periodontally diseased population in Spain. *J Clin Periodontol* **2000**; 27(Suppl. 1): 86.
- Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol* **2007**; 149(2): 217-225.
- Berdeli A, Emingil G, Gurkan A, Atilla G, Kose T. Association of the IL-1RN2 allele with periodontal diseases. *Clin Biochem* **2006**; 39(4): 357-362.
- Bioque G, Bouma G, Crusius JB, *et al.* Evidence of genetic heterogeneity in IBD: 1. The interleukin-1 receptor antagonist in the predisposition to suffer from ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1996**; 8(2): 105-110.

- Bioque G, Crusius JB, Koutroubakis I, *et al.* Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* **1995**; 102(2): 379-383.
- Blakemore AI, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Duff GW. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **1994**; 37(9): 1380-1385.
- Blakemore AI, Watson PF, Weetman AP, Duff GW. Association of Graves' disease with an allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Clin Endocrinol Metab* **1995**; 80(1): 111-115.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, *et al.* Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: a pathway-wide association study. *Genet Epidemiol* **2008**;
- Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, *et al.* Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* **2005**; 84(12): 1149-1153.
- Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun* **2001**; 2(4): 222-228.
- Caffesse RG, De La Rosa RM, De La Rosa GM, Weltman R. Effect of interleukin-1 gene polymorphism in a periodontally healthy Hispanic population treated with mucogingival surgery. *J Clin Periodontol* **2002a**; 29(2): 177-181.
- Caffesse RG, De LaRosa MR, De LaRosa MG, Mota LF. Prevalence of interleukin 1 periodontal genotype in a Hispanic dental population. *Quintessence Int* **2002b**; 33(3): 190-194.
- Caton J. *Periodontal Diagnosis and Diagnostic Aids*. Princeton, NJ: American Academy of Periodontology; **1989**: 1-22.

- Cork MJ, Tarlow JK, Blakemore AI, *et al.* Psoriasis and interleukin-1. A translation. *J R Coll Physicians Lond* **1993**; 27(4): 366.
- Costa JE, Gomes CC, Cota LO, *et al.* Polymorphism in the promoter region of the gene for 5-HTT in individuals with aggressive periodontitis. *J Oral Sci* **2008**; 50(2): 193-198.
- Crusius JB, Pena AS, Van Oosten BW, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and multiple sclerosis. *Lancet* **1995**; 346(8980): 979.
- Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, *et al.* A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol* **2001**; 28(12): 1137-1144.
- Chen H, Wilkins LM, Aziz N, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet* **2006**; 15(4): 519-529.
- D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine* **2004**; 28(1): 29-34.
- Dinarello CA. Interleukin-1. *Rev Infect Dis* **1984**; 6(1): 51-95.
- Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* **1991**; 163(6): 1177-1184.
- Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* **2002**; 20(5 Suppl 27): S1-13.
- Dinarello CA. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* **2006**; 83(2): 447S-455S.

- Duff GW. Evidence for genetic variation as a factor in maintaining health. *Am J Clin Nutr* **2006**; 83(2): 431S-435S.
- Engels EA, Wu X, Gu J, Dong Q, Liu J, Spitz MR. Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer. *Cancer Res* **2007**; 67(13): 6520-6527.
- Ferreira SB, Jr., Trombone AP, Repeke CE, *et al.* An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun* **2008**; 76(8): 3725-3734.
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* **2009**; 10(4): 241-251.
- Galbraith GM, Hagan C, Steed RB, Sanders JJ, Javed T. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. *J Periodontol* **1997**; 68(9): 832-838.
- Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* **1998**; 69(4): 428-433.
- Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* **1996**; 67(10 Suppl): 1041-1049.
- Gonzales JR, Herrmann JM, Boedeker RH, Francz PI, Biesalski H, Meyle J. Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **2001**; 28(6): 544-549.
- Gonzales JR, Michel J, Rodriguez EL, Herrmann JM, Bodeker RH, Meyle J. Comparison of interleukin-1 genotypes in two populations with aggressive periodontitis. *Eur J Oral Sci* **2003**; 111(5): 395-399.

- Greene JC. Oral hygiene and periodontal disease. *Am J Public Health Nations Health* **1963**; 53(913-922).
- Greenstein G, Hart TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. *J Am Dent Assoc* **2002**; 133(4): 452-459; quiz 492-453.
- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin, Richard C., Carroll, Sean B. *An Introduction to Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman; **2000**.
- Grimm C, Kantelhardt E, Heinze G, *et al*. The prognostic value of four interleukin-1 gene polymorphisms in Caucasian women with breast cancer: a multicenter study. *BMC Cancer* **2009**; 9(78).
- Guasch JF, Bertina RM, Reitsma PH. Five novel intragenic dimorphisms in the human interleukin-1 genes combine to high informativity. *Cytokine* **1996**; 8(8): 598-602.
- Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol* **1994**; 12-18.
- Hacker UT, Bidlingmaier C, Gomolka M, *et al*. Inflammatory bowel disease: no association between allele combinations of the interleukin (IL) 1 beta and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms. *Eur J Clin Invest* **1998**; 28(3): 214-219.
- Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* **2004**; 31(11): 996-1002.
- Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, *et al*. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* **1998**; 25(5): 346-353.
- Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **1988**; 15(4): 240-246.

- Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* **1983**; 10(3): 257-265.
- Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* **1997**; 14(202-215).
- Hassell TM, Harris EL. Genetic influences in caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* **1995**; 6(4): 319-342.
- Hefler LA, Grimm C, Lantzsch T, *et al.* Interleukin-1 and interleukin-6 gene polymorphisms and the risk of breast cancer in caucasian women. *Clin Cancer Res* **2005**; 11(16): 5718-5721.
- Heresbach D, Alizadeh M, Dabadie A, *et al.* Significance of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genetic polymorphism in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* **1997**; 92(7): 1164-1169.
- Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X, Frazer KA. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* **2006**; 38(1): 82-85.
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, *et al.* Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* **2005**; 307(5712): 1072-1079.
- Honig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontal Res* **1989**; 24(6): 362-367.
- Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Salvi GE. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol* **2007**; 34(4): 305-317.
- Irfan UM, Dawson DV, Bissada NF. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. *J Int Acad Periodontol* **2001**; 3(1): 14-21.

- Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, *et al.* Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* **1997**; 14(79-111).
- Johnsen AK, Plenge RM, Butty V, *et al.* A broad analysis of IL1 polymorphism and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **2008**; 58(7): 1947-1957.
- Jouvenne P, Chaudhary A, Buchs N, Giovine FS, Duff GW, Miossec P. Possible genetic association between interleukin-1alpha gene polymorphism and the severity of chronic polyarthritis. *Eur Cytokine Netw* **1999**; 10(1): 33-36.
- Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol* **2004**; 31(10): 894-902.
- Katila H, Hanninen K, Hurme M. Polymorphisms of the interleukin-1 gene complex in schizophrenia. *Mol Psychiatry* **1999**; 4(2): 179-181.
- Kim SH, Mok JW, Kim HS, Joo CK. Association of -31T>C and -511 C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients. *Mol Vis* **2008**; 14(2109-2116).
- Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* **2003**; 14(6): 430-449.
- Kjeldsen M, Holmstrup P, Lindemann RA, Bendtzen K. Bacterial-stimulated cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories. *J Periodontol* **1995**; 66(2): 139-144.
- Kornman KS. Interleukin 1 genetics, inflammatory mechanisms, and nutrigenetic opportunities to modulate diseases of aging. *Am J Clin Nutr* **2006**; 83(2): 475S-483S.

- Kornman KS, Crane A, Wang HY, *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* **1997a**; 24(1): 72-77.
- Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* **1998**; 3(1): 327-338.
- Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* **1997b**; 14(33-53).
- Kwee LC, Liu D, Lin X, Ghosh D, Epstein MP. A powerful and flexible multilocus association test for quantitative traits. *Am J Hum Genet* **2008**; 82(2): 386-397.
- Lafage M, Maroc N, Dubreuil P, *et al.* The human interleukin-1 alpha gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q13. *Blood* **1989**; 73(1): 104-107.
- Laine ML, Farre MA, Gonzalez G, *et al.* Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *J Dent Res* **2001**; 80(8): 1695-1699.
- Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res* **2000**; 35(2): 102-107.
- Lennard AC. Interleukin-1 receptor antagonist. *Crit Rev Immunol* **1995**; 15(1): 77-105.
- Leslie S, Donnelly P, McVean G. A statistical method for predicting classical HLA alleles from SNP data. *Am J Hum Genet* **2008**; 82(1): 48-56.
- Lin DY, Hu Y, Huang BE. Simple and efficient analysis of disease association with missing genotype data. *Am J Hum Genet* **2008**; 82(2): 444-452.
- Lin L, Pan YP, Yin LY. Study on the correlation of cytokine gene polymorphism with chronic periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **2003**; 12(6): 456-459.

- Lindhe J, Hamp S, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodontal Res* **1973**; 8(1): 1-10.
- Lindmark F, Zheng SL, Wiklund F, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist haplotype associated with prostate cancer risk. *Br J Cancer* **2005**; 93(4): 493-497.
- Lopez NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *J Periodontol* **2005**; 76(2): 234-243.
- Maksymowych WP, Rahman P, Reeve JP, Gladman DD, Peddle L, Inman RD. Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum* **2006**; 54(3): 974-985.
- Marcos M, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ. Interleukin-10 gene polymorphism is associated with alcoholism but not with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* **2008**; 43(5): 523-528.
- Mark LL, Haffajee AD, Socransky SS, *et al.* Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis. *J Periodontal Res* **2000**; 35(3): 172-177.
- Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* **1990**; 25(3): 156-163.
- McDevitt MJ, Wang HY, Knobelmann C, *et al.* Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* **2000**; 71(2): 156-163.
- McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodontal Res* **1990**; 25(4): 207-214.

- Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol* **2002**; 73(1): 27-32.
- Meisel P, Siegemund A, Grimm R, *et al.* The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res* **2003**; 82(3): 189-193.
- Melo Barbosa HP, Martins LC, Dos Santos SE, *et al.* Interleukin-1 and TNF-alpha polymorphisms and Helicobacter pylori in a Brazilian Amazon population. *World J Gastroenterol* **2009**; 15(12): 1465-1471.
- Michalowicz BS. Genetic and inheritance considerations in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* **1993**; 11-17.
- Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol* **1994**; 65(5 Suppl): 479-488.
- Miller LS, Manwell MA, Newbold D, *et al.* The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol* **1992**; 63(10): 843-848.
- Moore WE, Burmeister JA, Brooks CN, *et al.* Investigation of the influences of puberty, genetics, and environment on the composition of subgingival periodontal floras. *Infect Immun* **1993**; 61(7): 2891-2898.
- Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontol Res* **2007a**; 42(1): 23-30.
- Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, *et al.* Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol* **2007b**; 148(1): 119-126.

- Nemetz A, Nosti-Escanilla MP, Molnar T, *et al.* IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* **1999**; 49(6): 527-531.
- Nevins M, Becker W, Kornman K. *Consensus Report. Discussion section 1.* Princeton, NJ: American Academy of Periodontology; **1989**: 23-32.
- Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, *et al.* Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine* **2009**; 45(1): 50-54.
- Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* **1991**; 26(3 Pt 2): 230-242.
- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* **1976**; 34(3): 235-249.
- Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, *et al.* Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Ann Rheum Dis* **2004**; 63(1): 91-94.
- Perez-Soria A, Higashida-Guerrero C, Jacobo-Soto V, Lopez-Hernandez A, Ximenez-Fyvie LA. Distribution of interleukin-1B+3954 and IL-1A-889 polymorphisms in Mexican subjects. *J Dent Res* **2006**; 85(special issue A): Abstract 1106.
- Preshaw PM, Seymour RA, Heasman PA. Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent Update* **2004**; 31(10): 570-572, 574-578.
- Saenz-Lopez P, Carretero R, Cozar JM, *et al.* Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer* **2008**; 8(382).
- Sakellari D, Koukoudetsos S, Arsenakis M, Konstantinidis A. Prevalence of IL-1A and IL-1B polymorphisms in a Greek population. *J Clin Periodontol* **2003**; 30(1): 35-41.

- Sanchez E, Sabio JM, Jimenez-Alonso J, *et al.* Study of two polymorphisms of the MHC2TA gene with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **2008**; 47(1): 102-103.
- Schulz S, Machulla HK, Altermann W, *et al.* Genetic markers of tumour necrosis factor alpha in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **2008**; 35(6): 493-500.
- Sehouli J, Mustea A, Koensgen D, Lichtenegger W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2003**; 12(11 Pt 1): 1205-1208.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* **2007**; 86(4): 306-319.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* **1992**; 63(4 Suppl): 322-331.
- Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* **1994**; 5(7-25).
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **2005**; 38(135-187).
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **1998**; 25(2): 134-144.
- Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* **1991a**; 18(7): 548-554.
- Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* **1991b**; 62(8): 504-509.
- Steinbrugger I, Haas A, Maier R, *et al.* Analysis of inflammation- and atherosclerosis-related gene polymorphisms in branch retinal vein occlusion. *Mol Vis* **2009**; 15(609-618).

- Stokkers PC, van Aken BE, Basoski N, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. Five genetic markers in the interleukin 1 family in relation to inflammatory bowel disease. *Gut* **1998**; 43(1): 33-39.
- Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* **2005**; 49(3): 551-571, vi.
- Terwilliger JD, Goring HH. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol* **2000**; 72(1): 63-132.
- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol* **2003**; 30(5): 438-442.
- Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* **1995**; 66(10): 852-859.
- Unur M, Demirez E, Agachan B, *et al.* The relationship of oral disturbances of diabetes mellitus patients with paraoxonase gene polymorphisms. *Cell Biochem Funct* **2008**; 26(8): 870-873.
- Vairaktaris E, Serefoglou Z, Avgoustidis D, *et al.* Gene polymorphisms related to angiogenesis, inflammation and thrombosis that influence risk for oral cancer. *Oral Oncol* **2008**;
- Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* **2005**; 7(1): 3-7.
- Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, *et al.* Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica* **2003**; 88(1): 54-60.
- Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, *et al.* Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **2007**; 34(10): 823-827.
- Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphisms of the IL-1alpha and IL-1beta genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol* **2000**; 71(5): 723-728.

- Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci Prog* **1995**; 78 (Pt 1)(19-34.
- Wong LY, Ong KL, Cheung BM, Leung RY, Man YB, Lam TH. Polymorphisms of the fibrinogen-beta gene are related to 2-hour glucose level after oral glucose tolerance test in Hong Kong Chinese. *Dis Markers* **2008**; 24(3): 167-173.
- Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **2006a**; 33(12): 869-877.
- Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* **2006b**; 77(3): 460-471.
- Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* **2000**; 27(9): 648-657.
- Yang L, Lu R, Jiang L, Liu Z, Peng Y. Expression and genetic analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) G-308A polymorphism in sporadic Alzheimer's disease in a Southern China population. *Brain Res* **2009**; 1247(178-181.

VII. TABLAS

Tabla 1. Descripción de la población de estudio ($n=127$).

	PCG $n=58$		PAG $n=27$		EP ($n=85$)		SP $n=42$	
	Media \pm EEM	Rango	Media \pm EEM	Rango	Media \pm EEM	Rango	Media \pm EEM	Rango
Edad (años) * † § £	47.6 \pm 1.2	35 - 75	22.7 \pm 0.9	12 - 29	39.7 \pm 1.5	12 - 75	27.5 \pm 1.1	18 - 60
Género (% mujeres)	51.7		81.5		61.2		54.8	
Número de dientes faltantes * § £	3.7 \pm 0.3	0 - 8	1.4 \pm 0.4	0 - 7	3.0 \pm 0.3	0 - 8	1.5 \pm 0.3	0 - 6
% fumadores actuales	27.6		22.2		25.9		23.8	
Profundidad de bolsa promedio (mm) * † £	4.04 \pm 0.13	2.30 - 7.37	4.36 \pm 0.27	2.58 - 7.77	4.14 \pm 0.12	2.30 - 7.77	2.05 \pm 0.03	1.68 - 2.57
Nivel de inserción promedio (NI, mm) * † £	4.53 \pm 0.16	2.66 - 9.04	4.46 \pm 0.28	2.64 - 8.23	4.51 \pm 0.14	2.64 - 9.04	1.93 \pm 0.04	0.92 - 2.30
Número de sitios con NI \geq 5 mm * † £	55.8 \pm 3.7	11 - 118	56.9 \pm 7.9	9 - 156	56.2 \pm 3.6	9 - 156	0 \pm 0	0 - 0
% sitios con:								
Acumulación de placa * † £	43.1 \pm 4.3	0 - 100	39.0 \pm 6.9	0 - 96.4	41.8 \pm 3.7	0 - 100	17.3 \pm 3.2	0 - 72.0
Enrojecimiento gingival * † £	17.8 \pm 3.4	0 - 100	30.5 \pm 6.3	0 - 100	21.8 \pm 3.1	0 - 100	4.5 \pm 1.5	0 - 42.3
Sangrado al sondeo * † £	44.8 \pm 2.8	4.9 - 100	50.8 \pm 5.0	13.1 - 97.4	46.7 \pm 2.5	4.9 - 100	5.1 \pm 1.2	0 - 38.1
Supuración * † £	5.3 \pm 1.0	0 - 37.0	8.3 \pm 2.4	0 - 61.3	6.2 \pm 1.0	0 - 61.3	0 \pm 0	0 - 0

* $p < 0.001$ PCG vs. SP. † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ PAG vs. SP. § $p < 0.001$ PAG vs. PCG. £ $p < 0.001$ EP vs. SP (prueba U de Mann-Whitney). **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **EEM:** error estándar de la media.

Tabla 2. Descripción de las variaciones genéticas evaluadas.

	IL1A:c.-949C>T	IL1B:c.315C>T	IL1B:c.-583T>C	IL1RN:c.215-516ATCCTGGGAAAGTGAGGGAATATGGACATCATGG AACAAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAACTGGGTAGTGTGC(2_6)
ID de referencia en NCBI dbSNP (rs#)	rs1800587	rs1143634	rs16944	rs2234663
ID del Lab. GM UNAM en NCBI dbSNP (ss#)	NA	104807662	104831320	NA
Nomenclatura	NM_000575.3:c.-949C>T NT_022135.15:g.2250883G>A	NM_000576.2:c.315C>T NT_022135.15:g.2298312G>A NP_000567.1:p.F105F	NM_000576.2:c.-583T>C NT_022135.15:g.2302790A>G	NM_173841.1:c.215-516ATCCTGGGAAAGTGAGGGAATATGGACATCACA TGGAAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAACTGGGTAGTGTGC(2_6)
Abreviación	IL1A:c.-949C>T IL1A:g.2250883G>A	IL1B:c.315C>T IL1B:g.2298312G>A IL1B:p.F105F	IL1B:c.-583T>C IL1B:g.2302790A>G	IL1RN:c.215-516ATCCTGGGAAAGTGAGGGAATATGGACATCATGG AACAAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAACTGGGTAGTGTGC(2_6) IL1RN:c.215-516(86)[2_6]
Sinónimos	IL1A-889	IL1B+3953 IL1B+3954	IL1B-511	IL1RN int2 IL1RN_STR (int 2) IL1RN (86bp VNTR)
Clase	SNP	SNP	SNP	VNTR
Tipo	No-codificante	Codificante (sinónima)	No-codificante	No-codificante
Localización	Exón 1 (5' UTR)	Exón 5 (+14)	5' cercana al gen	Intrón 2 (isoforma 1) Intrón 4 (isoforma 2)
Posición en cromosoma	113,259,431	113,306,861	113,311,338	113,604,577
Posición en contig	2,250,883	2,298,313	2,302,790	2,596,029
Posición en mRNA	12	402	NA	NA
Posición en codón	NA	3	NA	NA
Posición en proteína	NA	105	NA	NA
Aminoácidos	NA	Phe>Phe	NA	NA
Secuencia 5' (30pb)	AAATCTTTA ATAATAGTAA CCAGGCAACA	TGTGCTCCAC ATTCAGAAC CTATCTTCTT	CAGAGCTCC TGCAATTGAC AGAGAGCTCC	GCAACACTCC TATTGACCTG GAGCACAGGT
Alelos	(C>T)	(C>T)	(T>C)	(ATCCTGGGAAAGTGAGGGAATATGGACATCATGGAAACATCCAGGAGACT CAGGCCTCTAGGAGTAACTGGGTAGTGTGC) 2 a 6 repeticiones (86bp)
Secuencia 3' (30pb)	CATTGAAGGC TCATATGTAA AAATCCATGC	GACACATGGG ATAACGAGGC TTATGTGCAC	GAGGCAGAGA ACAGACCCA AGGTAGAGAC	ATCCTGGGGA AAGTGAGGGA AATATGGACA

ID: número de identificación. **NCBI:** National Center for Biotechnology Information. **Lab. GM UNAM:** Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México. **SNP:** single nucleotide polymorphism (variación génica de un solo nucleótido). **VNTR:** variable number of tandem repeats (número variable de secuencias repetitivas continuas). **NA:** no aplica. **pb:** pares de bases.

Tabla 3. Descripción de los genes en los que se localizan las variaciones evaluadas.

	IL1A:c.-949C>T	IL1B:c.315C>T	IL1B:c.-583T>C	IL1RN:c.215-516ATCCTGGGGAAAGTGAGGGAAATATGGACATC ACATGGAACAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAACTGGG TAGTGTGC(2_6)
ID en NCBI	3552	3553	3553	3557
Versión (Build)	36.3	36.3	36.3	36.3
Símbolo	IL1A	IL1B	IL1B	IL1RN
Nombre oficial	Interleucina 1, alfa	Interleucina 1, beta	Interleucina 1, beta	Interleucina 1, antagonista del receptor (isoforma 1, precursor)
Tipo	Codificador de proteína	Codificador de proteína	Codificador de proteína	Codificador de proteína
Localización	chr2q14	chr2q14	chr2q14	chr2q14.2
Posición de inicio	113247963	113303808	113303808	113591941
Posición de terminación	113259442	113310827	113310827	113608064
Posición codón de inicio	113257818	113310277	113310277	113606919
Tamaño (kpb)	11.48	7.02	7.02	16.12

ID: número de identificación. **NCBI:** National Center for Biotechnology Information. **kpb:** pares de kilobases.

Tabla 4. Descripción de los métodos empleados para la detección de variaciones genéticas.

	IL1A:c.-949C>T	IL1B:c.315C>T	IL1B:c.-583T>C	IL1RN:c.215-516ATCCTGGGGAAAGTGAGGGAAATATGGACATCAC ATGGAAACAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAAGTGGGTAG TGTGC(2_6)
RFLP				
Secuencia de primer-F (m.t. C°)	ACTAGGCTGGCCACAGGAATT (62.2)	GTTGTCATCAGACTTTGACC (52.8)	TGGCATTGATCTGGTTCATC (59.5)	CTCAGCAACTCCTAT (45.5)
Secuencia de primer-R (m.t. C°)	GTAGAAGAAGGTGTGCAAGCC (62.4)	TTCAGTTCATATGACCAGA (53.9)	GTTAGGAATCTCCACTT (52.5)	TCCTGGTCTGCAGTAA (53.1)
Temp. de alineamiento (C°)	59	55	55	54
Tamaño del producto (pb)	190	250	305	412
Secuencia del producto	ACTAGGCTGGCCACAGGAATataaaagctgagaa atctttaaataatagtaaccaggcaacaccattgaaggctca tatgtaaaaatccatgcttcttctccaatctccattccca aacttagccactggcttctgctgaggccttacgcatactcc cggGCTTGACACACC TTCTTCTAC	GTTGTCATCAGACTTTGACCgtatgatctcagggt cctccaagaaatacaattttgcccgtcgcctcacgaggc ctgcccctctgatttatacctaacaacatgctccacat ttcagaacctatcttctgcacacatgggataacgagcct atgtgcacagtcacctgacgatcactgaactgcacgct ccgggactcacagcaaaaagcttgggtgatgTCTGGTC CATATGAACCTGAA	TGGCATTGATCTGGTTCATCcatgagattggctag ggtaacagcacctggtcttcagggttgtgagccttatct ccagggttgcccacaactccgtcaggagcctgaaccctgc ataccgtatgttctctgcccagcgaagaaaggtaatttt ctctcagagcctcctcaattgacagagagcctcctgagg cagagaacagcaccgaagtagagaccaccctcaa tacagacagggaggctattggccctcattgtaccattt atccatctgtAAGTGGGAAGATTCCTAAAC	CTCAGCAACTCCTATtgacgtggagcacaggtatcctgggaaagtgaggaaat ggacatcacatggaacaacatccaggagactcaggccttaggagtaactgggtagtgatc ctgggaaagtgaggaaatattggacatcacatggaacaacatccaggagactcaggcctta ggagtaactgggtagtgatcctgggaaagtgaggaaatattggacatcacatggaaca catccaggagactcaggccttaggagtaactgggtagtgatcctgggaaagtgaggga aataatggacatcacatggaacaacatccaggagactcaggccttaggagtaactgggtagtg gcttggtttaactcttatTACCTGCAGACCAGGA
Localización cromosómica	chr2:113259305-113259494	chr2:113306748-113306997	chr2:113311225-113311529	chr2:113604543+113604954
Enzima de restricción	3U Bsb 37°C 3h inactivación 65°C 20m	3U Taq 65°C 3h inactivación 80°C 20m	3U Ava 37°C 3h inactivación 80°C 20m	NA
Tamaño de los fragmentos (pb)	Alelo C: 85+105 Alelo T: 190	Alelo C: 136+114 Alelo T: 250	Alelo T: 305 Alelo C: 190+115	2 repeticiones: 240, 3 repeticiones: 326, 4 repeticiones: 412, 5 repeticiones: 498, 6 repeticiones: 584
SECUENCIACIÓN				
Secuencia de primer-F (m.t. C°)	TTTATTATTTTTAGAGATGGGGG (57.0)	TCCAGTGTCTTAGCCACCC (60.1)	GGTAACAGCACCTGTGCTTGC (62.0)	ACTCCTATTGACCTGGAGCACAGGT (65.5)
Secuencia de primer-R (m.t. C°)	CGGGAGGTATGCCGTAAGG (59.1)	CAGGATGTTCCATTACCTTG (58.5)	GCACATATTTTCTTCACTTC (58.5)	TTGGTTAATCTCTATTACCTGC (57.3)
Tamaño del producto (pb)	387	351	306	394
Secuencia del producto	TTTATTATTTTTAGAGATGGGGGcttactatggt gcccacactggactaaaacttggcccaagtgttctct gcctcagcctcctgtaatagctgggactaggggcatgcca tcacacctagttcatttctctttaaataatacatggcttaa actccaactgggaaccacaacattcattgtctaagagctctg gtgttaccacctgaactagctggccacagaaatataaa agctgagaatctttaaataatagtaaccaggcaacaccatt gaaggctcatatgaaaaatccatgcttcttctcccaatc tccattcccaacttagccactgcttctggtgaggCCTTA CGCATACTCCCG	TCCAGTGTCTTAGCCACCCcactcccagctcctc cctactggtgtgtcagactttgaccgtatgtctcag tgtcctccaagaaatacaattttgcccgtcgcctcacg gcctgcccctctgatttatacctaacaacatgtgctcac atffcagaacctatcttctgcacacatgggataacgagc ttatgtgcacgatgcacctgtacatcactgaactgcacg tccgggactcacagcaaaaagcttgggtatgctgtgctc atatacctgaaagcttccacctccaggacaggtatg gagcaaaAAGTGAATGAAGAAAGTATGT GC	GGTAACAGCACCTGTGCTTGCagggttgtgag cttatctcagggttgcccacaactccgtcaggagcctgaa ccctgcataccgtatgttctgcccagcgaagaaagt caatttctcctcagagctcctgcaattgacagagagct cctgaggcagagaacagcaccgaaggtagagaccaca ccctcaatcacagcaggaggctattggccctcattgt accatttaccatctgtaagtgggaagattcctaaacta agtacaaaGAAGTGAATGAAGAAAGTATGT GC	ACTCCTATTGACCTGGAGCACAGGTatcctgggaaagtgaggaaatattggacatc aaagtgaggaaataatggacatcacatggaacaacatccaggagactcaggccttaggagta actgggtagtgatcctgggaaagtgaggaaatattggacatcacatggaacaacatcca ggagactcaggccttaggagtaactgggtagtgatcctgggaaagtgaggaaatattg gacatcacatggaacaacatccaggagactcaggccttaggagtaactgggtagtgctg GTTAATCTCTATTACCTGC
Localización cromosómica	chr2:113259329-113259715	chr2:113306692-113307042	chr2:113311189-113311494	chr2:113604552+113604945

RFLP: restriction fragment length polymorphism (longitud polimórfica de fragmentos de restricción). **m.t.:** melting temperatura (temperatura de fusión). **pb:** pares de bases. **NA:** no aplica.

Tabla 5a. Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas, comparando los grupos PCG ($n=58$) y SP ($n=42$).

	PCG vs. SP														
	D_{max}	SNS	ESP	EXC	IFP	IFN	VPP	VPN	M-W ($p=$)	Fisher ($p=$)	RR	RM	IC95%	M-H ($p=$)	
IL1A:c.[-949CC]	0.01	0.60	0.40	0.52	0.60	0.40	0.58	0.43	0.93	1.00	1.01	1.03	0.46	2.33	0.93
IL1A:c.[-949CT]	0.00	0.36	0.64	0.48	0.36	0.64	0.58	0.42	0.96	1.00	1.01	1.02	0.45	2.34	0.96
IL1A:c.[-949TT]	-0.01	0.03	0.95	0.42	0.05	0.97	0.50	0.42	0.74	1.00	0.72	0.71	0.10	5.29	0.74
IL1A:c.[-949C]	0.01	0.78	0.23	0.55	0.77	0.22	0.58	0.43	0.74	1.00	1.01	1.06	0.19	10.36	0.74
IL1A:c.[-949T]	-0.01	0.22	0.77	0.45	0.23	0.78	0.57	0.42	0.93	1.00	0.95	0.94	0.43	2.17	0.93
IL1B:c.[315CC]	0.20	0.79	0.40	0.63	0.60	0.21	0.65	0.59	0.03	0.04	1.33	2.61	1.08	6.32	0.03
IL1B:c.[315CT]	-0.16	0.17	0.67	0.38	0.33	0.83	0.42	0.37	0.06	0.10	0.52	0.42	0.16	1.06	0.07
IL1B:c.[315TT]	-0.04	0.03	0.93	0.41	0.07	0.97	0.40	0.41	0.41	0.65	0.48	0.46	0.07	2.91	0.41
IL1B:c.[315C]	0.12	0.88	0.24	0.61	0.76	0.12	0.61	0.59	0.41	0.65	1.15	2.28	0.34	13.50	0.41
IL1B:c.[315T]	-0.12	0.12	0.76	0.39	0.24	0.88	0.41	0.39	0.03	0.04	0.51	0.44	0.16	0.93	0.03
IL1B:c.[-583TT]	0.06	0.29	0.76	0.49	0.24	0.71	0.63	0.44	0.54	0.65	1.23	1.33	0.54	3.29	0.54
IL1B:c.[-583TC]	-0.08	0.66	0.26	0.49	0.74	0.34	0.55	0.35	0.38	0.51	0.89	0.67	0.28	1.62	0.38
IL1B:c.[-583CC]	0.03	0.05	0.98	0.44	0.02	0.95	0.75	0.43	0.48	0.64	2.17	2.24	0.22	22.28	0.49
IL1B:c.[-583T]	0.01	0.62	0.39	0.53	0.61	0.38	0.59	0.43	0.48	0.64	1.02	1.06	0.04	4.46	0.49
IL1B:c.[-583C]	-0.01	0.38	0.61	0.48	0.39	0.62	0.57	0.41	0.54	0.65	0.97	0.94	0.30	1.87	0.54
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2]	0.05	0.17	0.88	0.47	0.12	0.83	0.67	0.44	0.46	0.58	1.45	1.54	0.49	4.90	0.46
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]	-0.07	0.36	0.57	0.45	0.43	0.64	0.54	0.39	0.50	0.54	0.84	0.76	0.34	1.71	0.50
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]	0.02	0.02	1.00	0.43	0.00	0.98	1.00	0.42	0.39	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	-0.02	0.43	0.55	0.48	0.45	0.57	0.57	0.41	0.83	0.84	0.95	0.92	0.41	2.04	0.83
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5]	0.02	0.02	1.00	0.43	0.00	0.98	1.00	0.42	0.39	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[2]	0.03	0.36	0.67	0.49	0.33	0.64	0.60	0.43	0.97	1.00	1.09	1.14	0.46	2.26	0.97
IL1RN:c.215-516(86)[4]	-0.05	0.62	0.33	0.50	0.67	0.38	0.56	0.39	0.34	0.42	0.93	0.82	0.18	1.81	0.35
IL1RN:c.215-516(86)[5]	0.02	0.02	1.00	0.43	0.00	0.98	1.00	0.42	0.23	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Los recuadros punteados señalan alelos y genotipos individuales que cumplieron con los puntos de corte establecidos en el análisis exploratorio en cuanto a EXC (≥ 0.5), IFN (≤ 0.5) y RM (≥ 1) para evaluar la capacidad diagnóstica y predictiva de los alelos y genotipos individuales. Los valores sombreados destacan los datos específicos que fueron considerados en la evaluación. Los genotipos [2]+[3], [2]+[6], [3]+[3], [3]+[4], [3]+[5], [3]+[6], [4]+[6], [5]+[5], [5]+[6] y [6]+[6], así como los alelos [3] y [6], de la variación IL1RN:c.215-516(86) no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **SP:** salud periodontal. **D_{max} :** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental (PCG) y el grupo control (SP). **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza al 95% para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel para la razón de momios. **NA:** no aplica.

Tabla 5b. Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas, comparando los grupos PAG ($n=27$) y SP ($n=42$).

	PAG vs. SP														
	D_{max}	SNS	ESP	EXC	IFP	IFN	VPP	VPN	M-W ($p=$)	Fisher ($p=$)	RR	RM	IC95%	M-H ($p=$)	
IL1A:c.[-949CC]	0.22	0.81	0.40	0.57	0.60	0.19	0.47	0.77	0.06	0.07	1.37	2.99	0.95	9.45	0.06
IL1A:c.[-949CT]	-0.21	0.15	0.64	0.45	0.36	0.85	0.21	0.54	0.06	0.10	0.41	0.31	0.09	1.08	0.07
IL1A:c.[-949TT]	-0.01	0.04	0.95	0.59	0.05	0.96	0.33	0.61	0.83	1.00	0.78	0.77	0.07	8.92	0.83
IL1A:c.[-949C]	0.12	0.89	0.23	0.49	0.77	0.11	0.42	0.76	0.83	1.00	1.15	2.34	0.11	15.08	0.83
IL1A:c.[-949T]	-0.12	0.11	0.77	0.51	0.23	0.89	0.24	0.58	0.06	0.07	0.49	0.43	0.11	1.06	0.06
IL1B:c.[315CC]	0.15	0.74	0.40	0.54	0.60	0.26	0.44	0.71	0.22	0.30	1.24	1.94	0.67	5.60	0.22
IL1B:c.[315CT]	-0.11	0.22	0.67	0.49	0.33	0.78	0.30	0.57	0.32	0.42	0.67	0.57	0.19	1.74	0.32
IL1B:c.[315TT]	-0.03	0.04	0.93	0.58	0.07	0.96	0.25	0.60	0.55	1.00	0.52	0.50	0.05	5.07	0.56
IL1B:c.[315C]	0.09	0.85	0.24	0.48	0.76	0.15	0.42	0.71	0.55	1.00	1.12	1.80	0.20	20.29	0.56
IL1B:c.[315T]	-0.09	0.15	0.76	0.52	0.24	0.85	0.29	0.58	0.22	0.30	0.62	0.56	0.18	1.48	0.22
IL1B:c.[-583TT]	0.24	0.48	0.76	0.65	0.24	0.52	0.57	0.70	0.04	0.07	2.02	2.97	1.05	8.38	0.04
IL1B:c.[-583TC]	-0.22	0.52	0.26	0.36	0.74	0.48	0.31	0.46	0.06	0.07	0.70	0.38	0.14	1.06	0.06
IL1B:c.[-583CC]	-0.02	0.00	0.98	0.59	0.02	1.00	0.00	0.60	0.42	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1B:c.[-583T]	0.13	0.74	0.39	0.53	0.61	0.26	0.44	0.70	0.42	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1B:c.[-583C]	-0.13	0.26	0.61	0.47	0.39	0.74	0.30	0.56	0.04	0.07	0.66	0.54	0.12	0.95	0.04
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2]	0.10	0.22	0.88	0.62	0.12	0.78	0.55	0.64	0.26	0.32	1.87	2.11	0.58	7.77	0.26
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]	0.09	0.52	0.57	0.55	0.43	0.48	0.44	0.65	0.47	0.62	1.21	1.44	0.54	3.79	0.47
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]	0.04	0.04	1.00	0.62	0.00	0.96	1.00	0.62	0.21	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	-0.23	0.22	0.55	0.42	0.45	0.78	0.24	0.52	0.05	0.07	0.49	0.35	0.12	1.03	0.06
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5]	0.00	0.00	1.00	0.61	0.00	1.00	NA	0.61	1.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[2]	0.17	0.50	0.67	0.60	0.33	0.50	0.49	0.67	0.05	0.07	1.50	2.00	0.97	8.62	0.06
IL1RN:c.215-516(86)[4]	-0.19	0.48	0.33	0.39	0.67	0.52	0.32	0.50	0.14	0.19	0.72	0.46	0.11	1.37	0.14
IL1RN:c.215-516(86)[5]	0.02	0.02	1.00	0.62	0.00	0.98	1.00	0.61	0.21	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Los recuadros punteados señalan alelos y genotipos individuales que fueron seleccionados para ser considerados en los análisis posteriores en base a su cumplimiento con los criterios de selección en la comparación entre estos 2 grupos de estudio en particular. Los valores sombreados destacan los datos específicos que fueron considerados en la selección. Los genotipos [2]+[3], [2]+[6], [3]+[3], [3]+[4], [3]+[5], [3]+[6], [4]+[6], [5]+[5], [5]+[6] y [6]+[6], así como los alelos [3] y [6], de la variación IL1RN:c.215-516(86) no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **SP:** salud periodontal. **D_{max} :** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental (PCG) y el grupo control (SP). **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza al 95% para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel para la razón de momios. **NA:** no aplica.

Tabla 5c. Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas, comparando los grupos PAG ($n=27$) y PCG ($n=58$).

	PAG vs. PCG														
	D_{max}	SNS	ESP	EXC	IFP	IFN	VPP	VPN	M-W ($p=$)	Fisher ($p=$)	RR	RM	IC95%	M-H ($p=$)	
IL1A:c.[-949CC]	0.21	0.81	0.40	0.53	0.60	0.19	0.39	0.82	0.05	0.08	1.35	2.89	0.96	8.72	0.06
IL1A:c.[-949CT]	-0.21	0.15	0.64	0.48	0.36	0.85	0.16	0.62	0.05	0.07	0.41	0.31	0.09	1.01	0.05
IL1A:c.[-949TT]	0.00	0.04	0.97	0.67	0.03	0.96	0.33	0.68	0.95	1.00	1.07	1.08	0.09	12.42	0.95
IL1A:c.[-949C]	0.10	0.89	0.22	0.43	0.78	0.11	0.35	0.81	0.95	1.00	1.13	2.20	0.08	10.71	0.95
IL1A:c.[-949T]	-0.10	0.11	0.78	0.57	0.22	0.89	0.19	0.65	0.05	0.08	0.52	0.46	0.11	1.04	0.06
IL1B:c.[315CC]	-0.05	0.74	0.21	0.38	0.79	0.26	0.30	0.63	0.59	0.59	0.93	0.75	0.26	2.17	0.59
IL1B:c.[315CT]	0.05	0.22	0.83	0.64	0.17	0.78	0.38	0.70	0.59	0.57	1.29	1.37	0.44	4.27	0.59
IL1B:c.[315TT]	0.00	0.04	0.97	0.67	0.03	0.96	0.33	0.68	0.95	1.00	1.07	1.08	0.09	12.42	0.95
IL1B:c.[315C]	-0.03	0.85	0.12	0.35	0.88	0.15	0.31	0.64	0.95	1.00	0.97	0.79	0.08	10.71	0.95
IL1B:c.[315T]	0.03	0.15	0.88	0.65	0.12	0.85	0.36	0.69	0.59	0.59	1.23	1.27	0.46	3.91	0.59
IL1B:c.[-583TT]	0.19	0.48	0.71	0.64	0.29	0.52	0.43	0.75	0.09	0.14	1.64	2.24	0.87	5.75	0.09
IL1B:c.[-583TC]	-0.14	0.52	0.34	0.40	0.66	0.48	0.27	0.61	0.23	0.24	0.79	0.57	0.22	1.44	0.23
IL1B:c.[-583CC]	-0.05	0.00	0.95	0.65	0.05	1.00	0.00	0.67	0.23	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1B:c.[-583T]	0.12	0.74	0.38	0.49	0.62	0.26	0.36	0.76	0.23	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1B:c.[-583C]	-0.12	0.26	0.62	0.51	0.38	0.74	0.24	0.64	0.09	0.14	0.68	0.57	0.17	1.15	0.09
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2]	0.05	0.22	0.83	0.64	0.17	0.78	0.38	0.70	0.59	0.57	1.29	1.37	0.44	4.27	0.59
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]	0.16	0.52	0.64	0.60	0.36	0.48	0.40	0.74	0.17	0.24	1.43	1.90	0.75	4.79	0.17
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]	0.02	0.04	0.98	0.68	0.02	0.96	0.50	0.69	0.58	0.54	2.15	2.19	0.13	36.43	0.58
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	-0.21	0.22	0.57	0.46	0.43	0.78	0.19	0.61	0.06	0.09	0.52	0.38	0.13	1.07	0.07
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5]	-0.02	0.00	0.98	0.67	0.02	1.00	0.00	0.68	0.50	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[2]	0.14	0.50	0.64	0.59	0.36	0.50	0.39	0.73	0.05	0.06	1.38	1.76	1.00	8.08	0.05
IL1RN:c.215-516(86)[4]	-0.14	0.48	0.38	0.41	0.62	0.52	0.27	0.61	0.47	0.57	0.78	0.57	0.23	1.97	0.47
IL1RN:c.215-516(86)[5]	0.00	0.02	0.98	0.68	0.02	0.98	0.33	0.68	0.95	1.00	1.07	1.08	0.09	12.42	0.95

Los recuadros punteados señalan alelos y genotipos individuales que fueron seleccionados para ser considerados en los análisis posteriores en base a su cumplimiento con los criterios de selección en la comparación entre estos 2 grupos de estudio en particular. Los valores sombreados destacan los datos específicos que fueron considerados en la selección. Los genotipos [2]+[3], [2]+[6], [3]+[3], [3]+[4], [3]+[5], [3]+[6], [4]+[6], [5]+[5], [5]+[6] y [6]+[6], así como los alelos [3] y [6], de la variación IL1RN:c.215-516(86) no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **D_{max} :** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental (PCG) y el grupo control (SP). **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza al 95% para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel para la razón de momios. **NA:** no aplica.

Tabla 5d. Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas, comparando los grupos EP ($n=85$) y SP ($n=42$).

	EP vs. SP														
	D_{max}	SNS	ESP	EXC	IFP	IFN	VPP	VPN	M-W ($p=$)	Fisher ($p=$)	RR	RM	IC95%	M-H ($p=$)	
IL1A:c.[-949CC]	0.08	0.67	0.40	0.58	0.60	0.33	0.70	0.38	0.41	0.43	1.13	1.38	0.64	2.97	0.40
IL1A:c.[-949CT]	-0.06	0.29	0.64	0.41	0.36	0.71	0.63	0.31	0.47	0.54	0.82	0.75	0.34	1.64	0.47
IL1A:c.[-949TT]	-0.01	0.04	0.95	0.34	0.05	0.96	0.60	0.33	0.74	1.00	0.74	0.73	0.12	4.56	0.74
IL1A:c.[-949C]	0.04	0.82	0.23	0.62	0.77	0.18	0.68	0.38	0.74	1.00	1.06	1.31	0.22	8.51	0.74
IL1A:c.[-949T]	-0.04	0.18	0.77	0.38	0.23	0.82	0.62	0.32	0.41	0.43	0.81	0.76	0.34	1.55	0.40
IL1B:c.[315CC]	0.18	0.78	0.40	0.65	0.60	0.22	0.73	0.47	0.03	0.04	1.30	2.36	1.06	5.26	0.04
IL1B:c.[315CT]	-0.15	0.19	0.67	0.35	0.33	0.81	0.53	0.29	0.07	0.08	0.56	0.46	0.20	1.08	0.07
IL1B:c.[315TT]	-0.04	0.04	0.93	0.33	0.07	0.96	0.50	0.32	0.37	0.40	0.49	0.48	0.09	2.46	0.38
IL1B:c.[315C]	0.11	0.87	0.24	0.66	0.76	0.13	0.70	0.48	0.37	0.40	1.14	2.10	0.41	10.89	0.38
IL1B:c.[315T]	-0.11	0.13	0.76	0.34	0.24	0.87	0.52	0.30	0.03	0.04	0.54	0.48	0.19	0.94	0.04
IL1B:c.[-583TT]	0.11	0.35	0.76	0.49	0.24	0.65	0.75	0.37	0.19	0.23	1.48	1.75	0.76	4.03	0.19
IL1B:c.[-583TC]	-0.13	0.61	0.26	0.50	0.74	0.39	0.63	0.25	0.16	0.17	0.83	0.56	0.25	1.26	0.16
IL1B:c.[-583CC]	0.01	0.04	0.98	0.35	0.02	0.96	0.75	0.33	0.73	1.00	1.48	1.50	0.15	14.87	0.73
IL1B:c.[-583T]	0.05	0.66	0.39	0.57	0.61	0.34	0.69	0.36	0.73	1.00	1.09	1.25	0.07	6.61	0.73
IL1B:c.[-583C]	-0.05	0.34	0.61	0.43	0.39	0.66	0.64	0.31	0.19	0.23	0.87	0.80	0.25	1.32	0.19
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2]	0.07	0.19	0.88	0.42	0.12	0.81	0.76	0.35	0.33	0.45	1.58	1.72	0.58	5.06	0.33
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]	-0.02	0.41	0.57	0.46	0.43	0.59	0.66	0.32	0.86	1.00	0.96	0.93	0.44	1.97	0.86
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]	0.02	0.02	1.00	0.35	0.00	0.98	1.00	0.34	0.32	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	-0.09	0.36	0.55	0.43	0.45	0.64	0.62	0.30	0.34	0.44	0.81	0.69	0.33	1.47	0.34
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5]	0.01	0.01	1.00	0.34	0.00	0.99	1.00	0.33	0.48	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL1RN:c.215-516(86)[2]	0.07	0.41	0.67	0.49	0.33	0.59	0.71	0.36	0.41	0.45	1.22	1.37	0.65	2.90	0.41
IL1RN:c.215-516(86)[4]	-0.09	0.58	0.33	0.50	0.67	0.42	0.64	0.28	0.20	0.23	0.86	0.68	0.17	1.47	0.21
IL1RN:c.215-516(86)[5]	0.02	0.02	1.00	0.34	0.00	0.98	1.00	0.33	0.22	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Los recuadros punteados señalan alelos y genotipos individuales que fueron seleccionados para ser considerados en los análisis posteriores en base a su cumplimiento con los criterios de selección en la comparación entre estos 2 grupos de estudio en particular. Los valores sombreados destacan los datos específicos que fueron considerados en la selección. Los genotipos [2]+[3], [2]+[6], [3]+[3], [3]+[4], [3]+[5], [3]+[6], [4]+[6], [5]+[5], [5]+[6] y [6]+[6], así como los alelos [3] y [6], de la variación IL1RN:c.215-516(86) no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio. **EP:** enfermedad periodontal (incluye a los sujetos de los grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **D_{max} :** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental (PCG) y el grupo control (SP). **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza al 95% para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel para la razón de momios. **NA:** no aplica.

VIII. FIGURAS

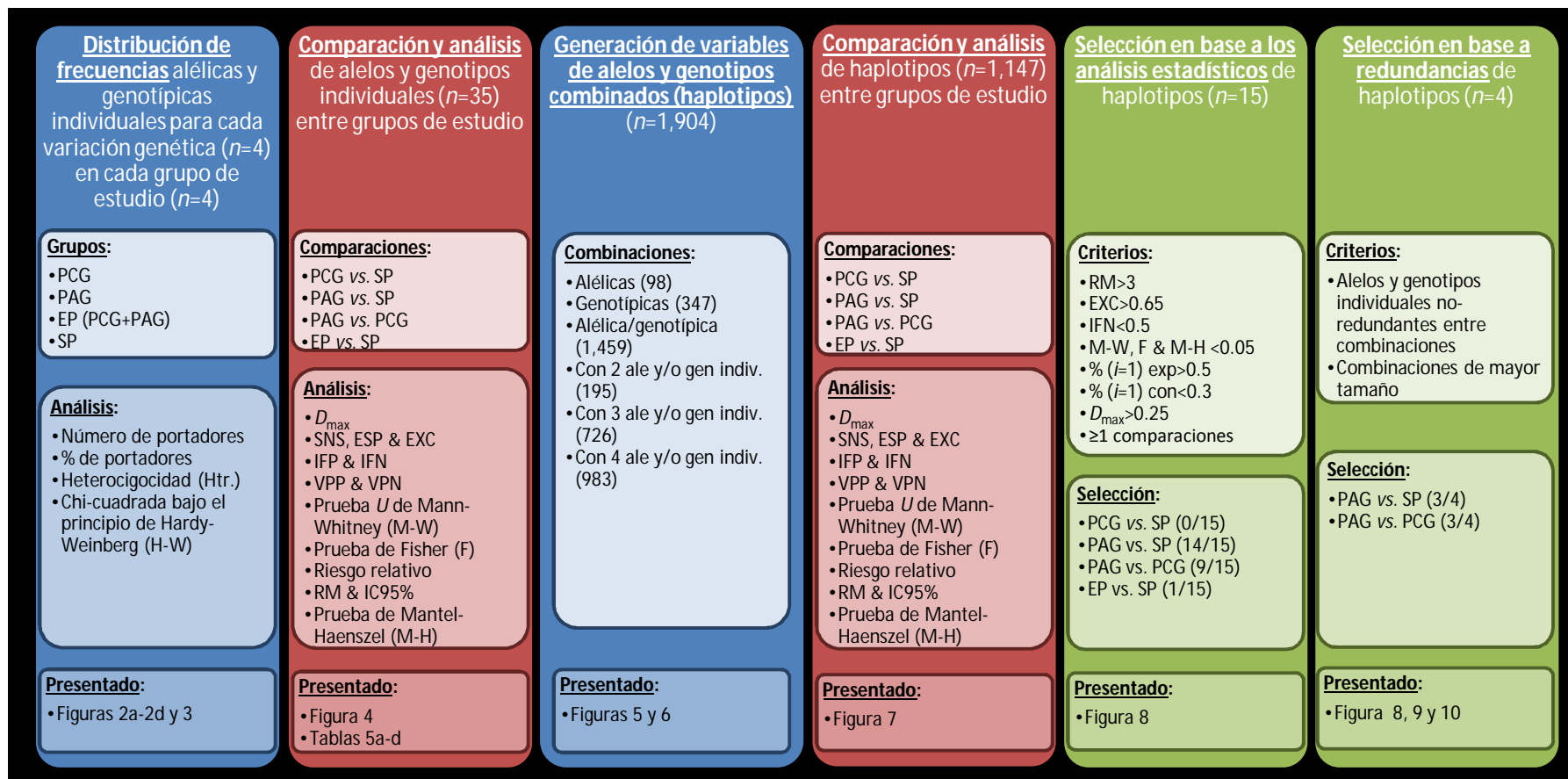
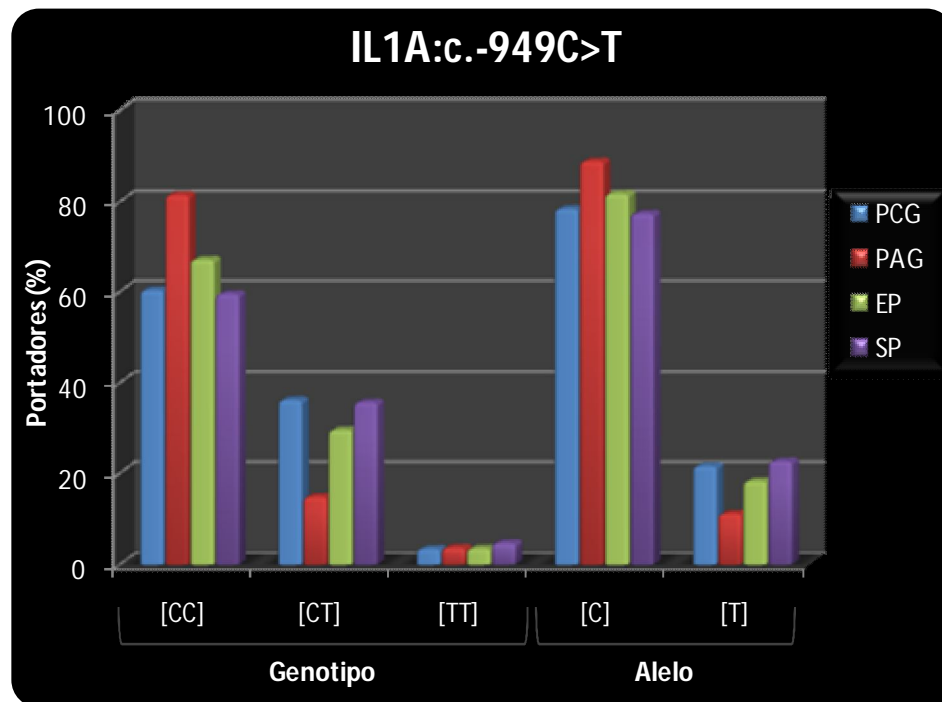
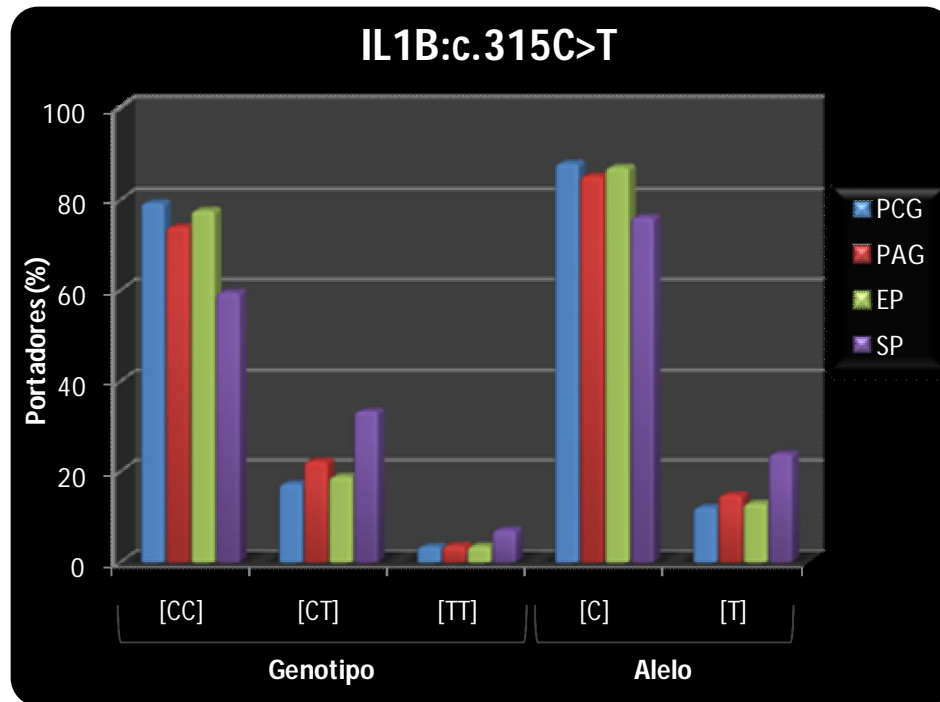


Figura 1. Esquema de la secuencia de pasos seguidos para la realización de los análisis de datos. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye a los grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. D_{max} : diferencia en el % de portadores entre los grupos experimental y control. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza al 95% para la razón de momios. **ale y/o gen indiv.:** alelos y/o genotipos individuales. **% ($i=1$) exp:** % de portadores en el grupo experimental. **% ($i=1$) con:** % de portadores en el grupo control. **≥ 1 comparaciones:** en una o más de las 4 comparaciones entre grupos.



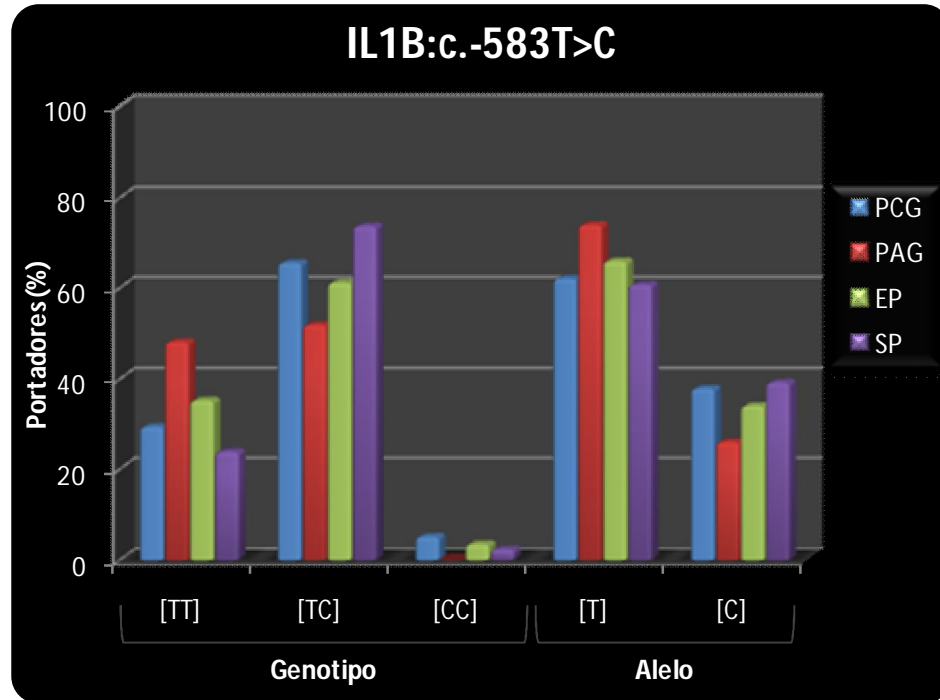
Grupo	n=	Genotipo			Alelo		Distribución	
		[CC]	[CT]	[TT]	[C]	[T]	Htr	H-W χ^2
PCG	58	i= 35 (60.3)	i= 21 (36.2)	i= 2 (3.4)	i= 91 (78.4)	i= 25 (21.6)	0.36	0.29
PAG	27	i= 22 (81.5)	i= 4 (14.8)	i= 1 (3.7)	i= 48 (88.9)	i= 6 (11.1)	0.15	1.69
EP	85	i= 57 (67.1)	i= 25 (29.4)	i= 3 (3.5)	i= 139 (81.8)	i= 31 (18.2)	0.29	0.02
SP	42	i= 25 (59.5)	i= 15 (35.7)	i= 2 (4.8)	i= 65 (77.4)	i= 19 (22.6)	0.36	0.02

Figura 2a. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1A:c.-949C>T en sujetos mexicanos ($n=127$) con diferente condición periodontal. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **n=:** número total de sujetos evaluados. **i=:** número de portadores. **%=:** porcentaje de portadores. **Htr:** heterocigocidad. **H-W χ^2 :** chi-cuadrada bajo el principio de Hardy-Weinberg.



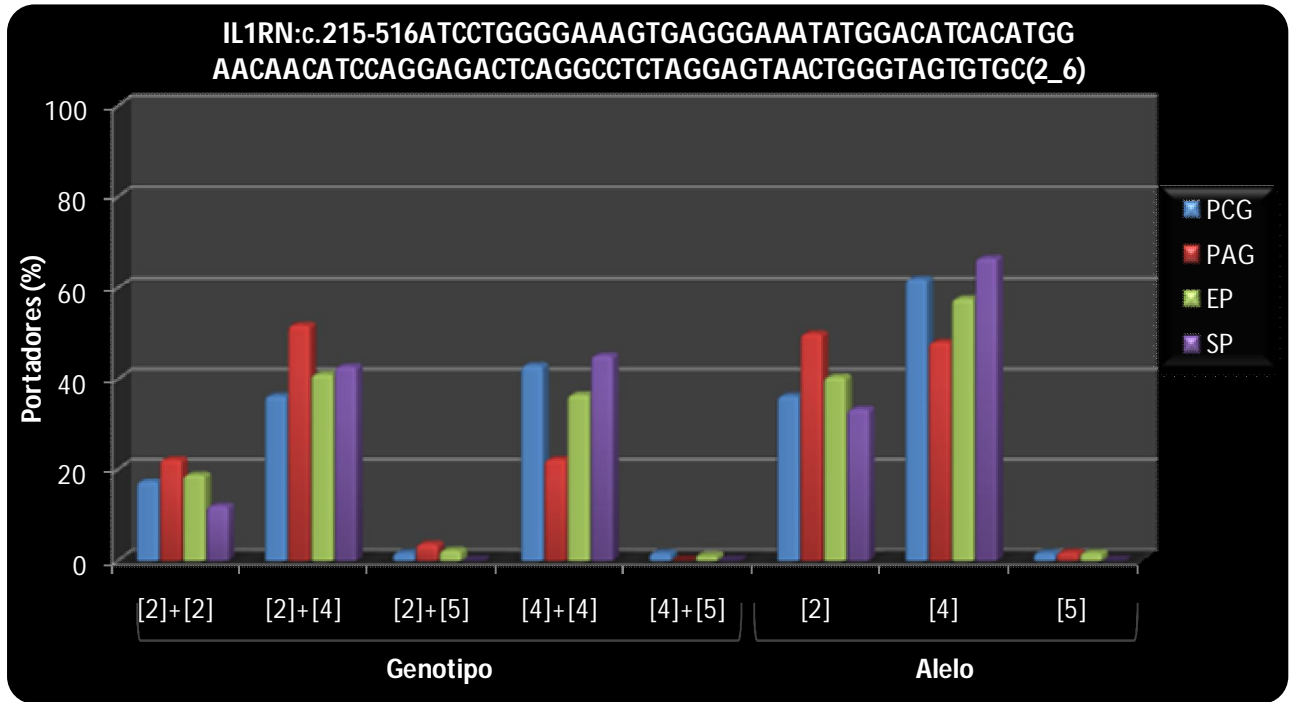
Grupo	n =	Genotipo			Alelo		Distribución	
		[CC]	[CT]	[TT]	[C]	[T]	Htr	H-W χ^2
PCG	58	i= 46 (79.3)	i= 10 (17.2)	i= 2 (3.4)	i= 102 (87.9)	i= 14 (12.1)	0.17	2.04
PAG	27	i= 20 (74.1)	i= 6 (22.2)	i= 1 (3.7)	i= 46 (85.2)	i= 8 (14.8)	0.22	0.39
EP	85	i= 66 (77.6)	i= 16 (18.8)	i= 3 (3.5)	i= 148 (87.1)	i= 22 (12.9)	0.19	2.30
SP	42	i= 25 (59.5)	i= 14 (33.3)	i= 3 (7.1)	i= 64 (76.2)	i= 20 (23.8)	0.33	0.28

Figura 2b. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1B:c.315C>T en sujetos mexicanos ($n=127$) con diferente condición periodontal. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **n=:** número total de sujetos evaluados. **i=:** número de portadores. **%=:** porcentaje de portadores. **Htr:** heterocigocidad. **H-W χ^2 :** chi-cuadrada bajo el principio de Hardy-Weinberg.



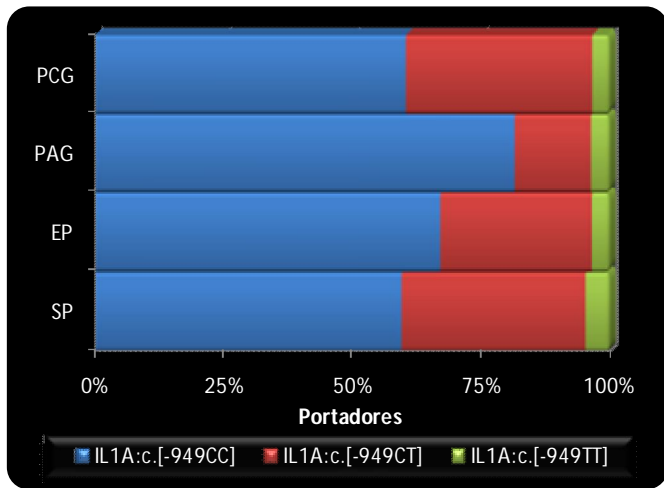
Grupo	n =	Genotipo			Alelo		Distribución	
		[TT]	[TC]	[CC]	[T]	[C]	Htr	H-W χ^2
PCG	58	i= 17 (29.3)	i= 38 (65.5)	i= 3 (5.2)	i= 72 (62.1)	i= 44 (37.9)	0.66	8.89
PAG	27	i= 13 (48.1)	i= 14 (51.9)	i= 0 (0.0)	i= 40 (74.1)	i= 14 (25.9)	0.52	3.31
EP	85	i= 30 (35.3)	i= 52 (61.2)	i= 3 (3.5)	i= 112 (65.9)	i= 58 (34.1)	0.61	11.07
SP	42	i= 10 (23.8)	i= 31 (73.8)	i= 1 (2.4)	i= 51 (60.7)	i= 33 (39.3)	0.74	12.58

Figura 2c. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1B:c.-583T>C en sujetos mexicanos ($n=127$) con diferente condición periodontal. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. Los valor sombreados en rojo, corresponden a resultados de H-W χ^2 que están fuera de equilibrio de acuerdo con la distribución de Hardy-Weinberg. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **n=:** número total de sujetos evaluados. **i=:** número de portadores. **%=:** porcentaje de portadores. **Htr:** heterocigicidad. **H-W χ^2 :** chi-cuadrada bajo el principio de Hardy-Weinberg.

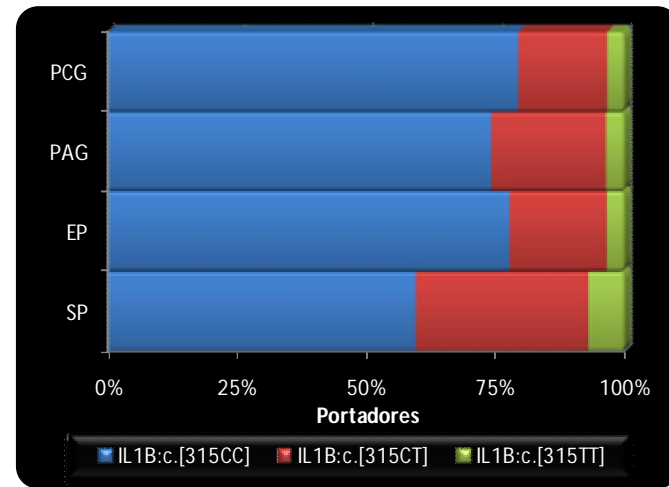


Grupo	n=	Genotipo					Alelo			Distribución	
		[2]+[2]	[2]+[4]	[2]+[5]	[4]+[4]	[4]+[5]	[2]	[4]	[5]	Htr	H-W χ^2
PCG	58	i= 10 (17.2)	i= 21 (36.2)	i= 1 (1.7)	i= 25 (43.1)	i= 1 (1.7)	i= 42 (36.2)	i= 72 (62.1)	i= 2 (1.7)	0.40	2.21
PAG	27	i= 6 (22.2)	i= 14 (51.9)	i= 1 (3.7)	i= 6 (22.2)	i= 0 (0.0)	i= 27 (50.0)	i= 26 (48.1)	i= 1 (1.9)	0.56	1.15
EP	85	i= 16 (18.8)	i= 35 (41.2)	i= 2 (2.4)	i= 31 (36.5)	i= 1 (1.2)	i= 69 (40.6)	i= 98 (57.6)	i= 3 (1.8)	0.45	1.94
SP	42	i= 5 (11.9)	i= 18 (42.9)	i= 0 (0.0)	i= 19 (45.2)	i= 0 (0.0)	i= 28 (33.3)	i= 56 (66.7)	i= 0 (0.0)	0.43	0.05

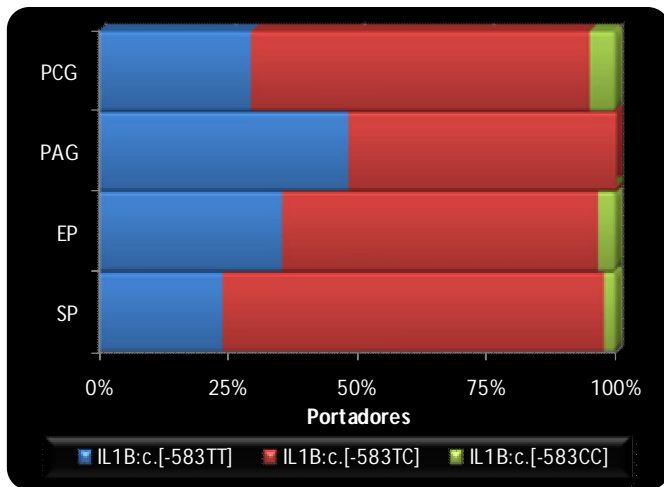
Figura 2d. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1RN:c.215-516ATCCTGGGGAAAGTGAGGGAAATATGGACATCACATGGAAACAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAACTGGGTAGTGTGC(2_6) (IL1RN:c.215-516(86)[2_6]) en sujetos mexicanos ($n=125$) con diferente condición periodontal. Los genotipos [2]+[3], [2]+[6], [3]+[3], [3]+[4], [3]+[5], [3]+[6], [4]+[6], [5]+[5], [5]+[6] y [6]+[6], así como los alelos [3] y [6], no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **n=:** número total de sujetos evaluados. **i=:** número de portadores. **%=:** porcentaje de portadores. **Htr:** heterocigocidad. **H-W χ^2 :** chi-cuadrada bajo el principio de Hardy-Weinberg.



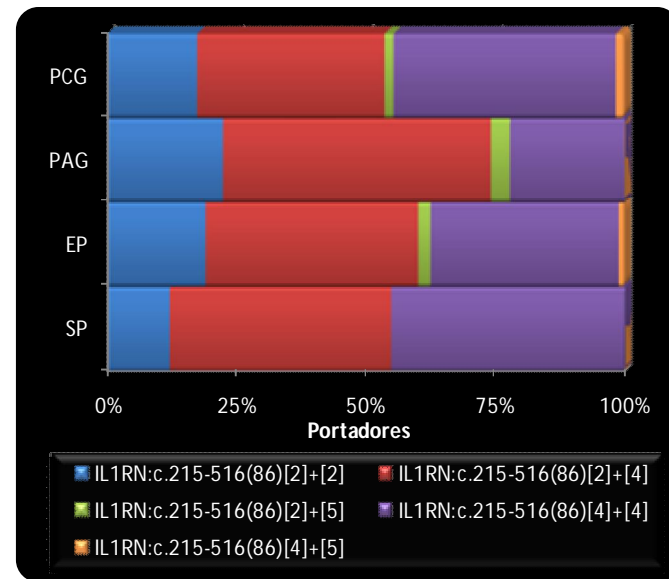
a.



b.



c.



d.

Figura 3. Gráficas de mosaico que ilustran las diferencias en la proporción de portadores de los diferentes genotipos en cada grupo de estudio para las variaciones genéticas evaluadas (**a.** IL1A:c.-949C>T, **b.** IL1B:c.315C>T, **c.** IL1B:c.-583T>C, **d.** IL1RN:c.215-516(86)[2_6]). Para las variaciones presentadas en **a.**, **b.**, y **c.** los segmentos azules corresponden a los portadores homocigotos para el alelo "ancestral", los rojos a los heterocigotos y los verdes a los homocigotos para los alelos variantes. En el caso de la variación que se presenta en **d.**, los segmentos azul y morado representan a los portadores homocigotos y el resto de

los colores a portadores heterocigotos de los alelos que se describen en la figura. Los genotipos [2]+[3], [2]+[6], [3]+[3], [3]+[4], [3]+[5], [3]+[6], [4]+[6], [5]+[5], [5]+[6] y [6]+[6] de la variación IL1RN:c.215-516(86)[2_6], no fueron detectados en alguno de los sujetos de estudio.

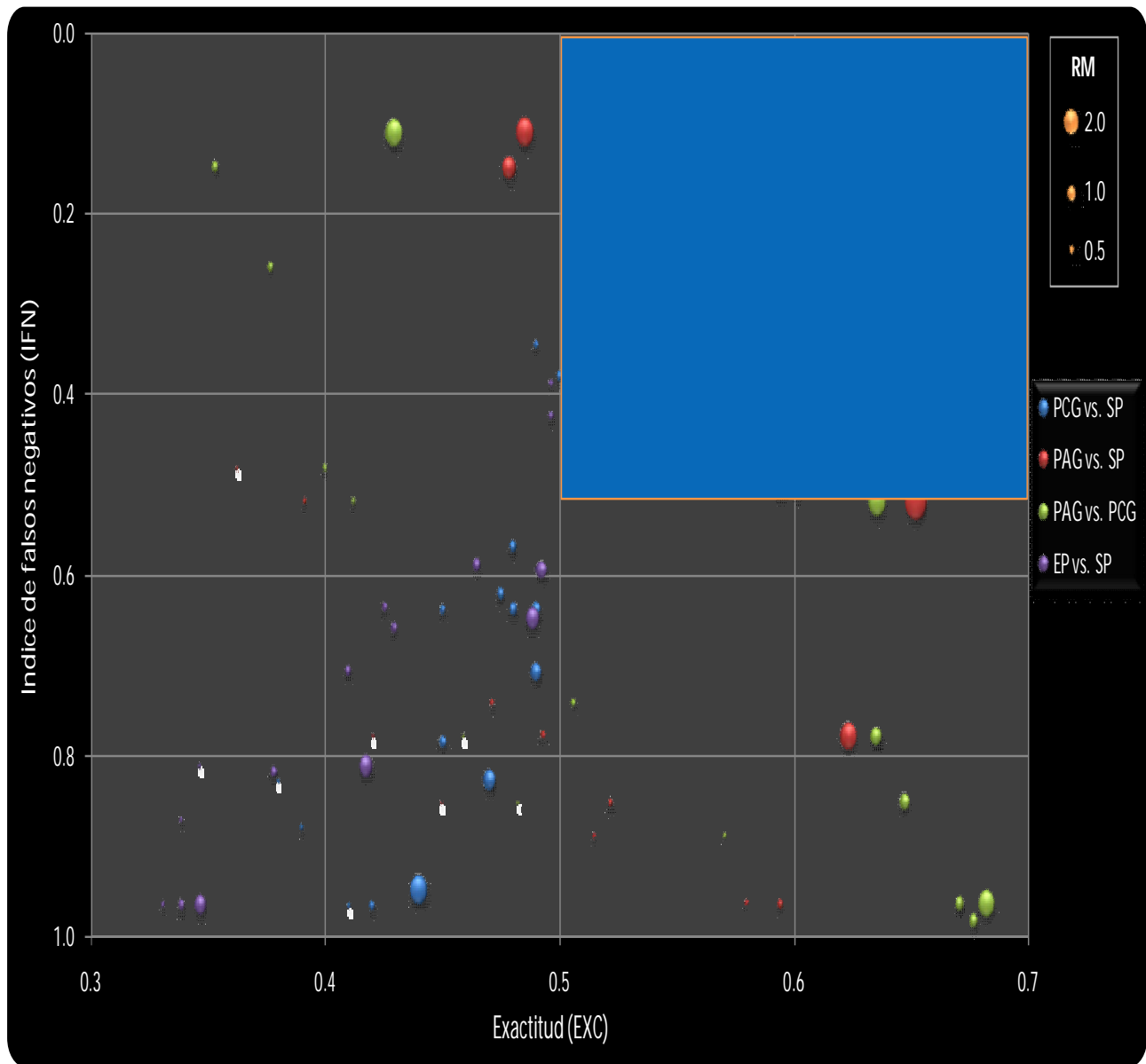


Figura 4. Gráfica de burbuja de los alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas ($n=35$) en el espacio de “exactitud (EXC) vs. índice de falsos negativos (IFN)”. El tamaño de las burbujas representa la razón de momios (RM, probabilidad de riesgo de padecer la condición del grupo experimental y no la del grupo control cuando se es portador del alelo o genotipo individual en cuestión). Los diferentes colores de las burbujas señalan los valores obtenidos para alelos y genotipos individuales en cada una de las 4 comparaciones entre grupos: PCG vs. SP (azul), PAG vs. SP (rojo), EP vs. SP (verde) y PAG vs. PCG (morado). El recuadro sombreado en el extremo superior derecho, delimita los puntos de corte establecidos en cuanto a EXC (≥ 0.5) e IFN (≤ 0.5) para explorar la capacidad diagnóstica y predictiva de alelos y genotipos individuales en una o más de las 4 comparaciones entre grupos. De los 35 alelos y genotipos individuales evaluados, 23 fueron detectados en la población de estudio, y únicamente 7 (4 alelos y 3 genotipos) cumplieron con los puntos de corte establecidos en el análisis exploratorio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **RM:** razón de momios.

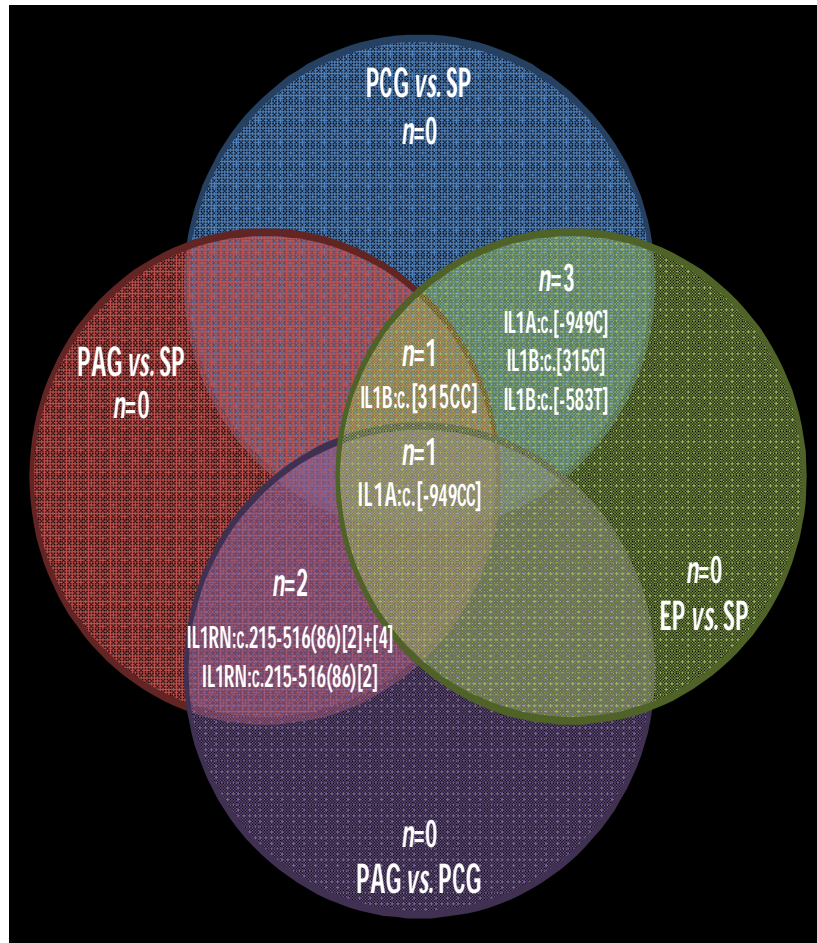


Figura 5. Diagrama de Venn que presenta el universo de los 7 alelos y genotipos individuales que cumplieron con los puntos de corte establecidos para el análisis exploratorio de su capacidad diagnóstica y predictiva. Ninguna de las variables individuales demostró ser relevante exclusivamente para alguna de las comparaciones. Sin embargo, 3 alelos (intersección azul-verde) mostraron relevancia, de acuerdo con los punto de corte, para las comparaciones PCG vs. SP y EP vs. SP. Dos de las variables individuales (intersección roja-morada), mostraron relevancia para las comparaciones PAG vs. SP y PAG vs. PCG. Un genotipo (intersección roja-azul-verde) fue relevante en las comparaciones PCG vs. SP, PAG vs. SP y EP vs. SP, y un genotipo más (intersección roja-azul-verde-morada) mostró relevancia para marcar a los grupos experimentales en todas las comparaciones. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye PCG y PAG). **SP:** salud periodontal.

Total de combinaciones generadas			Combinaciones detectadas en la población			Alelos y genotipos individuales	
Tipo de combinación	No. de alelos y/o genotipos individuales	No. de combinaciones	Tipo de combinación	No. de alelos y/o genotipos individuales	No. de combinaciones		No. de combinaciones
Alélica			Alélica			Alelos	
	2	30		2	28	IL1A:c.[-949C]	238
	3	44		3	37	IL1A:c.[-949T]	192
	4	24		4	18	IL1B:c.[315C]	241
	Total alélicas	98		Total alélicas	83	IL1B:c.[315T]	178
Genotípica			Genotípica			IL1B:c.[-583T]	224
	2	72		2	56	IL1B:c.[-583C]	221
	3	162		3	79	IL1RN:c.215-516(86)[2]	186
	4	113		4	24	IL1RN:c.215-516(86)[4]	194
	Total genotípicas	347		Total genotípicas	159	IL1RN:c.215-516(86)[5]	44
Alélica/genotípica			Alélica/genotípica			Genotipos	
	2 (1 alelo y 1 genotipo)	93		2 (1 alelo y 1 genotipo)	84	IL1A:c.[-949CC]	211
	3 (2 alelos y 1 genotipo)	204		3 (2 alelos y 1 genotipo)	163	IL1A:c.[-949CT]	179
	3 (1 alelo y 2 genotipos)	316		3 (1 alelo y 2 genotipos)	212	IL1A:c.[-949TT]	107
	4 (3 alelos y 1 genotipo)	153		4 (3 alelos y 1 genotipo)	107	IL1B:c.[315CC]	223
	4 (2 alelos y 2 genotipos)	342		4 (2 alelos y 2 genotipos)	197	IL1B:c.[315CT]	167
	4 (1 alelo y 3 genotipos)	351		4 (1 alelo y 3 genotipos)	142	IL1B:c.[315TT]	115
	Total alélicas/genotípicas	1,459		Total alélicas/genotípicas	905	IL1B:c.[-583TT]	190
	Total	1,904		Total	1,147	IL1B:c.[-583TC]	215
						IL1B:c.[-583CC]	94
						IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2]	121
						IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]	177
						IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]	44
						IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	165
						IL1RN:c.215-516(86)[4]+[5]	35

Figura 6. Descripción de las 1,904 variables combinadas (haplotipos) generadas en base a los 35 alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas (izquierda). 1,147 haplotipos fueron detectados en por lo menos un sujeto de estudio. En el cuadro central y derecho se detalla la composición específica de cada uno de los 1,147 haplotipos seleccionados, así como el número de veces que cada una de las variables individuales fue incluida en los diferentes haplotipos.

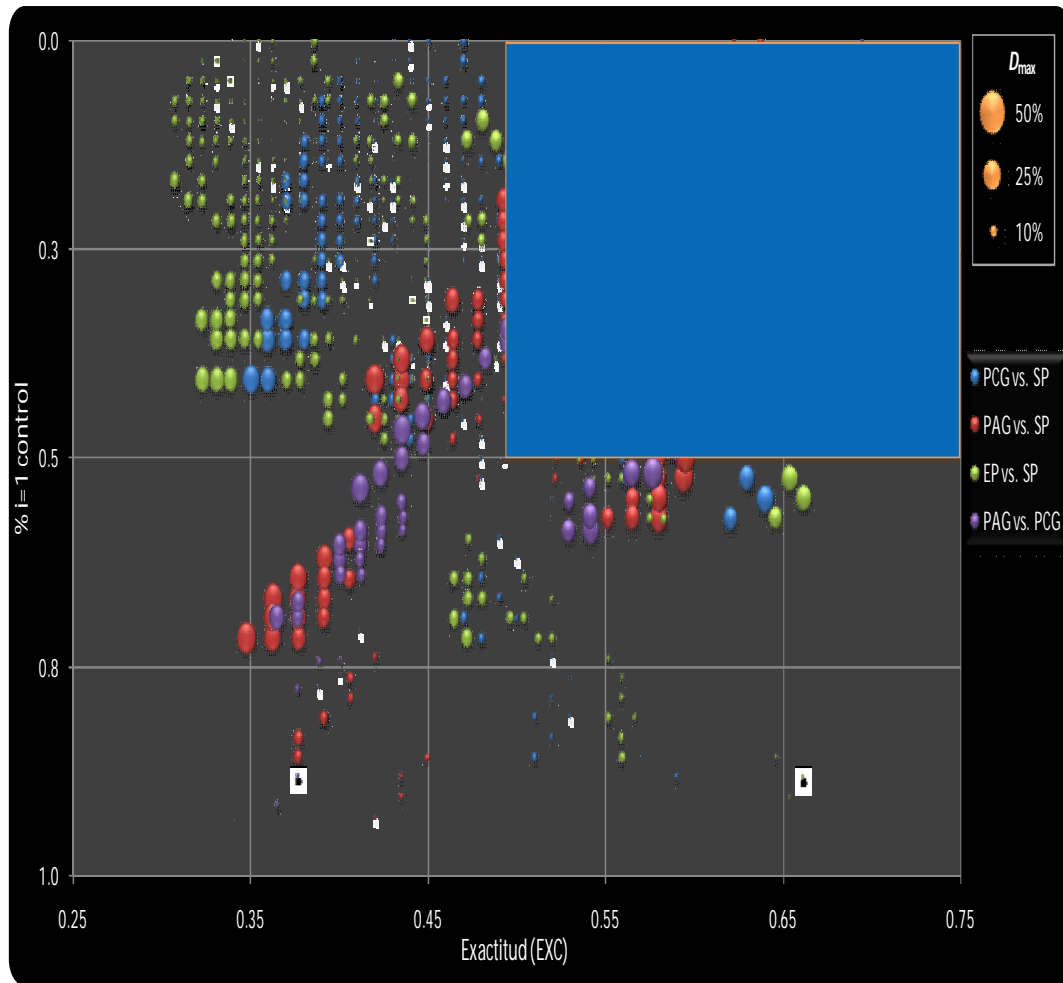
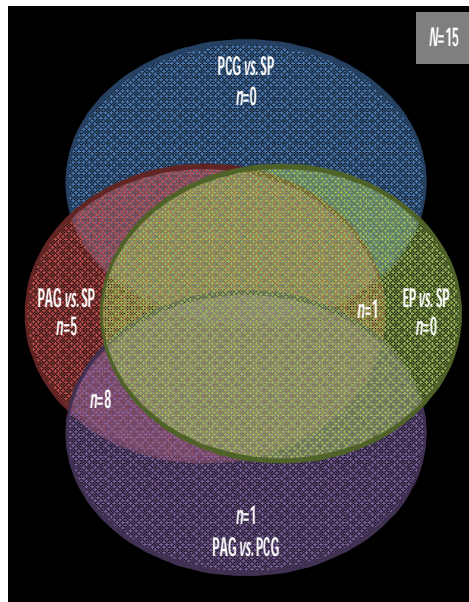


Figura 7. Gráfica de burbuja de los haplotipos detectados en la población de estudio ($n=1,147$) en el espacio de "exactitud (EXC) vs. % de portadores en el grupo control (% $i=1$ control)". El tamaño de las burbujas representa la diferencia entre el grupo experimental y control en cuanto al porcentaje de portadores (D_{max}). Los diferentes colores de las burbujas señalan los valores obtenidos para las combinaciones en cada una de las 4 comparaciones entre grupos: PCG vs. SP (azul), PAG vs. SP (rojo), EP vs. SP (verde) y PAG vs. PCG (morado). El recuadro sombreado en el extremo superior derecho, delimita aquellos haplotipos que presentaron EXC >0.65 y % $i=1$ control <0.3 , de los cuales, 15 presentaron adicionalmente $D_{max} >0.25$, RM >3 , prueba U de Mann-Whitney $p < 0.05$, prueba exacta de Fisher $p < 0.05$, prueba de Mantel-Haenszel $p < 0.05$, porcentaje de portadores en el grupo experimental >0.5 , y un índice de falsos negativos en el grupo experimental <0.5 . Dichos haplotipos fueron seleccionados para los análisis posteriores. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal.

Combinaciones seleccionadas (n=15)	Comparaciones relevantes
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]	PAG vs. SP
IL1B:c.[315CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP
IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]	PAG vs. SP y EP vs. SP
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP y PAG vs. PCG

Tipo de combinación	No. de alelos y/o genotipos individuales	No. de combinaciones
Alélica		
	3	2
	4	1
	Total alélicas	3
Genotípica		
	2	1
	Total genotípicas	1
Alélica/genotípica		
	2 (1 alelo y 1 genotipo)	2
	3 (2 alelos y 1 genotipo)	4
	3 (1 alelo y 2 genotipos)	2
	4 (3 alelos y 1 genotipo)	2
	4 (2 alelos y 2 genotipos)	1
	Total alélicas/genotípicas	11
	Total	15



Alelos y genotipos individuales	No. de combinaciones
Alelos	
IL1A:c.[-949C]	4
IL1B:c.[315C]	4
IL1B:c.[-583T]	9
IL1RN:c.215-516(86)[2]	13
Genotipos	
IL1A:c.[-949CC]	8
IL1B:c.[315CC]	8

Figura 8. Descripción de los 15 haplotipos que mostraron diferencias significativas entre los grupos control y experimental. En el recuadro superior izquierdo se proporciona un listado de los haplotipos así como las comparaciones entre grupos para las cuales mostraron relevancia. En el diagrama de Venn, se ilustra la distribución de los 15 haplotipos de acuerdo con su relevancia en cada una de las comparaciones entre grupos. En el recuadro superior derecho se resume la composición de cada haplotipo, así como el número de alelos y/o genotipos individuales incluidos en cada uno. Adicionalmente, el número de ocasiones en las que cada uno de los alelos y genotipos individuales fueron incluidos en alguno de los 15 haplotipos se describe en el recuadro inferior derecho.

Combinaciones (n=15)	No. alelos y/o genotipos indiv.	Grupo	IL1A:c.[-949C]	IL1B:c.[315C]	IL1A:c.[-949CC]	IL1B:c.[315CC]	IL1B:c.[-583T]	IL1RN:c.215-516(86)[2]	Seleccionada
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3		X			X		X	
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3	1	X				X	X	
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4		X			X	X	X	X
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4		X	X			X	X	X
IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3			X			X	X	
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3	2		X	X			X	
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4			X	X		X	X	X
IL1A:c.[-949CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	2				X			X	
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]	2				X	X			
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3	3			X		X	X	
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]	3				X	X	X		
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3				X	X		X	
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4				X	X	X	X	X
IL1B:c.[315CC]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	2	4				X		X	
IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3					X	X	X	X
TOTAL			4	4	8	8	9	13	5

Combinaciones (n=5)	No. alelos y/o genotipos indiv.	Grupo	IL1A:c.[-949C]	IL1B:c.[315C]	IL1A:c.[-949CC]	IL1B:c.[315CC]	IL1B:c.[-583T]	IL1RN:c.215-516(86)[2]	Seleccionada
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4	1	X			X	X	X	X
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4		X	X			X	X	X
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4	2		X	X		X	X	X
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	4	3			X	X	X	X	X
IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	3	4				X	X	X	
TOTAL			2	2	2	3	5	5	4

Figura 9. Descripción de los pasos seguidos para seleccionar haplotipos en base a discriminaciones secuenciales de redundancias. En primera instancia se realizó una discriminación intra-grupal, seguida por una inter-grupal de las redundancias. En todos los casos se conservaron únicamente los haplotipos con combinaciones únicas de mayor tamaño. En total fueron seleccionados 4 haplotipos, todos ellos conformados por combinaciones de 4 alelos o genotipos individuales. Tres de los haplotipos seleccionados fueron de tipo alélico/genotípico y uno de tipo alélico.

Combinaciones seleccionadas (n=4)	Comparaciones relevantes
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949C]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315C]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP & PAG vs. PCG
IL1A:c.[-949CC]+IL1B:c.[315CC]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	PAG vs. SP & PAG vs. PCG

Tipo de combinación	No. de alelos y/o genotipos individuales	No. de combinaciones
Alélica		
	4	1
	Total alélicas	1
Alélica/genotípica		
	4 (3 alelos y 1 genotipo)	2
	4 (2 alelos y 2 genotipos)	1
	Total alélicas/genotípicas	3
	Total	4

Alelos y genotipos individuales	No. de combinaciones
Alelos	
IL1A:c.[-949C]	2
IL1B:c.[315C]	2
IL1B:c.[-583T]	4
IL1RN:c.215-516(86)[2]	4
Genotipos	
IL1A:c.[-949CC]	2
IL1B:c.[315CC]	2

Figura 10. Descripción de los 4 haplotipos seleccionados. En el recuadro superior se proporciona un listado de los haplotipos así como las comparaciones entre grupos para las cuales mostraron relevancia. En el recuadro inferior izquierdo se resume la composición de cada haplotipo, así como el número de alelos y/o genotipos individuales incluidos en cada uno. Adicionalmente, el número de ocasiones en las que cada uno de los alelos y genotipos individuales fueron incluidos en alguno de los 4 haplotipos se describe en el recuadro inferior de la derecha.

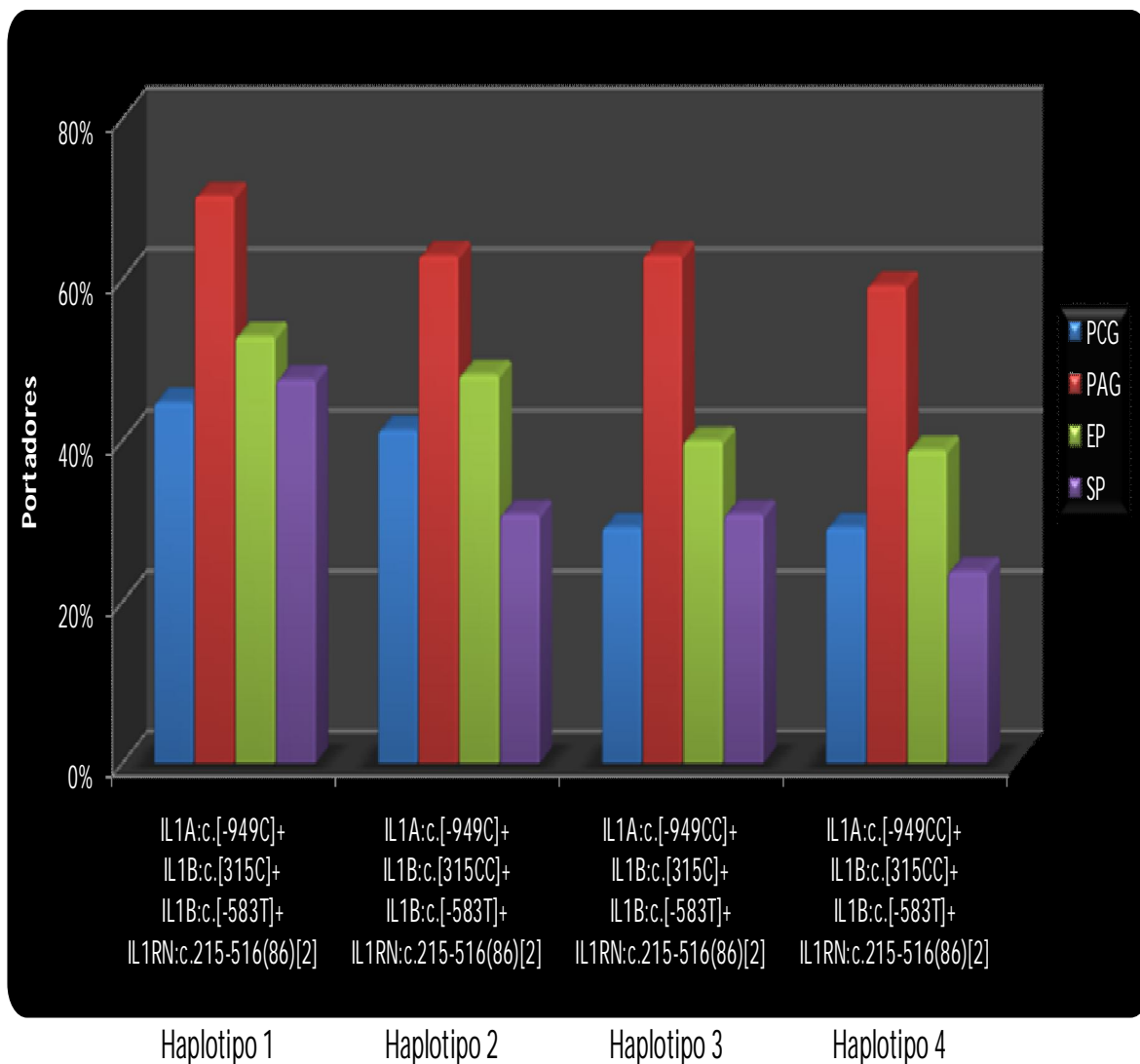
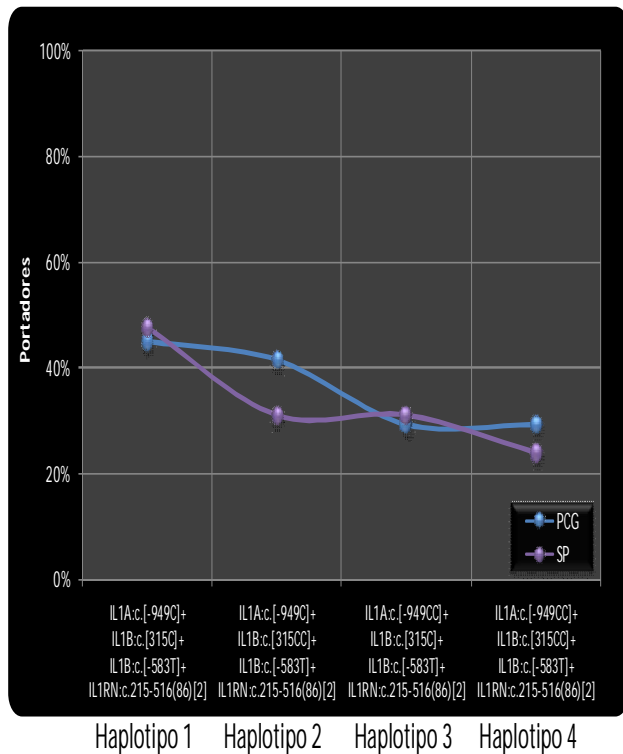
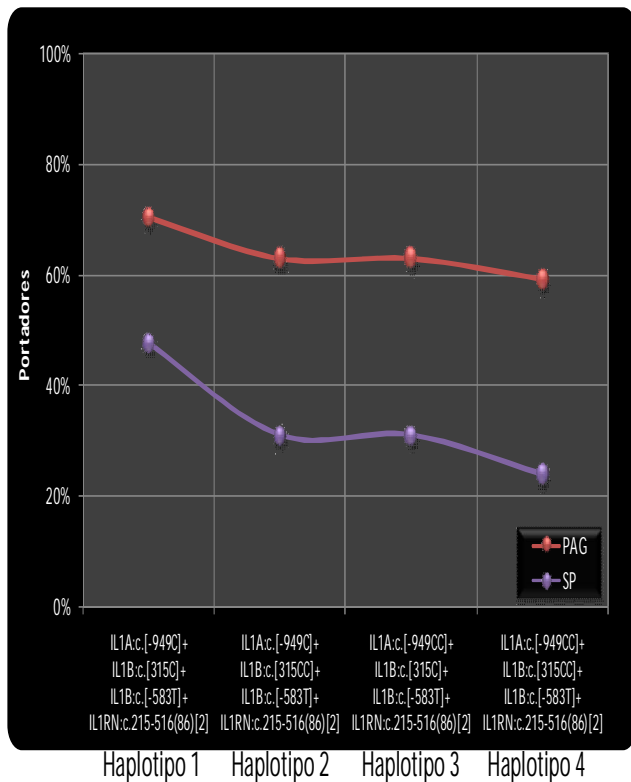


Figura 11. Distribución de las frecuencias de los 4 haplotipos seleccionados que mostraron capacidad para marcar específicamente al grupo PAG, y separarlo de los grupos SP y PGG. **PGG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PGG y PAG). **SP:** salud periodontal.



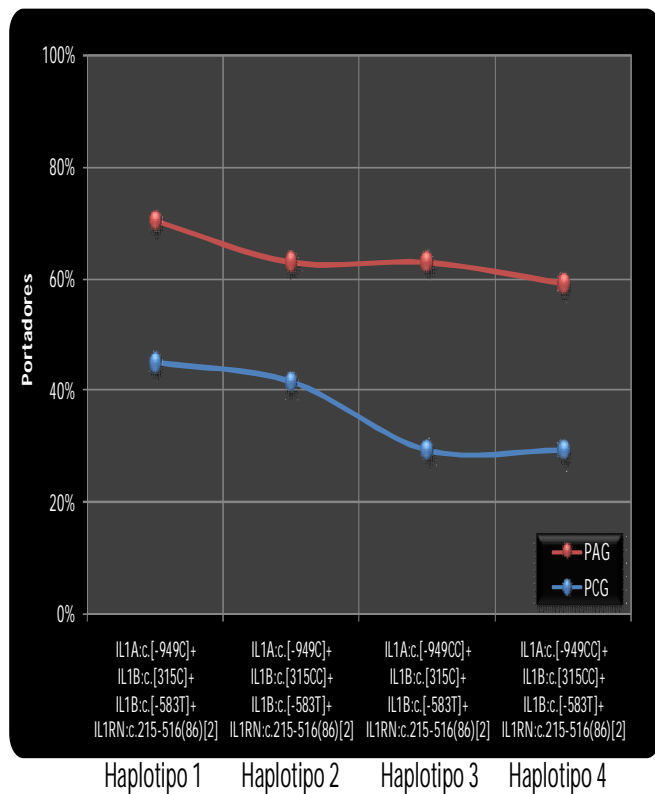
	Haplotipo 1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4
PCG vs. SP	IL1A:c.[-949C]+ IL1B:c.[315C]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1A:c.[-949C]+ IL1B:c.[315CC]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1A:c.[-949CC]+ IL1B:c.[315C]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1A:c.[-949CC]+ IL1B:c.[315CC]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]
Exp n=	58	58	58	58
Exp i=	26	24	17	17
Exp %	44.8%	41.4%	29.3%	29.3%
Con n=	42	42	42	42
Con i=	20	13	13	10
Con %	47.6%	31.0%	31.0%	23.8%
D _{max}	-2.8%	10.4%	-1.6%	5.5%
SNS	0.448	0.414	0.293	0.293
ESP	0.524	0.690	0.690	0.762
EXC	0.480	0.530	0.460	0.490
IFP	0.476	0.310	0.310	0.238
IFN	0.552	0.586	0.707	0.707
VPP	0.565	0.649	0.567	0.630
VPN	0.407	0.460	0.414	0.438
M-W (p=)	0.783	0.289	0.860	0.543
Fisher (p=)	0.840	0.304	1.000	0.650
RR	0.941	1.337	0.947	1.231
RM	0.894	1.575	0.925	1.327
IC95%	0.403	0.682	0.390	0.535
M-H (p=)	1.982	3.638	2.196	3.289
M-H (p=)	0.782	0.288	0.860	0.541

Figura 12a. Gráfica que muestra la separación que se produce entre los grupos de estudio PCG y SP con cada uno de los 4 haplotipos seleccionados. Puede observarse que la separación entre los grupos es pobre y no significativa para cualquiera de los haplotipos. El recuadro del lado derecho sintetiza las estadísticas de evaluación relativas a cada uno de los 4 haplotipos en cuanto a su habilidad para marcar específicamente a los grupos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **SP:** salud periodontal. **Exp n=:** número de sujetos incluidos en el grupo experimental. **Exp i=:** número de portadores en el grupo experimental. **Exp %=:** porcentaje de portadores en el grupo experimental. **Con n=:** número de sujetos incluidos en el grupo control. **Con i=:** número de portadores en el grupo control. **Con %=:** porcentaje de portadores en el grupo control. **D_{max}:** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental y control. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel.



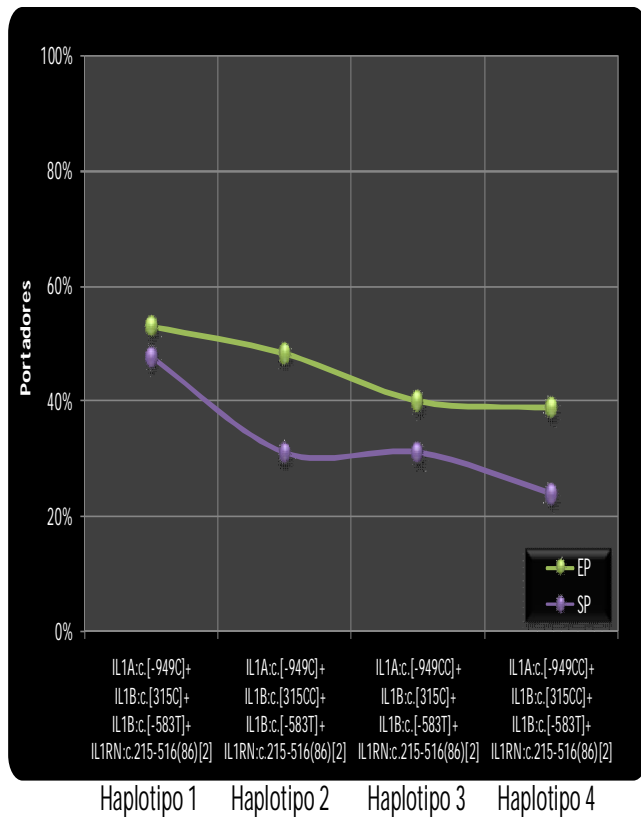
	Haplotipo 1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4
PAG vs. SP	IL1A:c.[949C]+	IL1A:c.[949C]+	IL1A:c.[949CC]+	IL1A:c.[949CC]+
	IL1B:c.[315C]+	IL1B:c.[315CC]+	IL1B:c.[315C]+	IL1B:c.[315CC]+
	IL1B:c.[583T]+	IL1B:c.[583T]+	IL1B:c.[583T]+	IL1B:c.[583T]+
	IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1RN:c.215-516(86)[2]
Exp n=	27	27	27	27
Exp i=	19	17	17	16
Exp %	70.4%	63.0%	63.0%	59.3%
Con n=	42	42	42	42
Con i=	20	13	13	10
Con %	47.6%	31.0%	31.0%	23.8%
D _{max}	22.8%	32.0%	32.0%	35.4%
SNS	0.704	0.630	0.630	0.593
ESP	0.524	0.690	0.690	0.762
EXC	0.594	0.667	0.667	0.696
IFP	0.476	0.310	0.310	0.238
IFN	0.296	0.370	0.370	0.407
VPP	0.487	0.567	0.567	0.615
VPN	0.733	0.744	0.744	0.744
M-W (p=)	0.065	0.009	0.009	0.003
Fisher (p=)	0.083	0.013	0.013	0.005
RR	1.478	2.034	2.034	2.489
RM	2.613	3.792	3.792	4.655
IC95%	0.938	1.369	1.369	1.636
	7.276	10.505	10.505	13.244
M-H (p=)	0.066	0.010	0.010	0.004

Figura 12b. Gráfica que muestra la separación que se produce entre los grupos de estudio PAG y SP con cada uno de los 4 haplotipos seleccionados. Puede observarse que la separación entre los grupos es buena y altamente significativa para cualquiera de los haplotipos. El recuadro del lado derecho sintetiza las estadísticas de evaluación relativas a cada uno de los 4 haplotipos en cuanto a su habilidad para marcar específicamente a los grupos de estudio. El recuadro punteado señala al haplotipo que demostró la mejor habilidad para marcar al grupo experimental. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **SP:** salud periodontal. **Exp n=:** número de sujetos incluidos en el grupo experimental. **Exp i=:** número de portadores en el grupo experimental. **Exp %=:** porcentaje de portadores en el grupo experimental. **Con n=:** número de sujetos incluidos en el grupo control. **Con i=:** número de portadores en el grupo control. **Con %=:** porcentaje de portadores en el grupo control. **D_{max}:** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental y control. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba *U* de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel.



	Haplotipo 1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4
PAG vs. PCG	IL1A:c.[-949C]+	IL1A:c.[-949C]+	IL1A:c.[-949CC]+	IL1A:c.[-949CC]+
	IL1B:c.[315C]+	IL1B:c.[315CC]+	IL1B:c.[315C]+	IL1B:c.[315CC]+
	IL1B:c.[-583T]+	IL1B:c.[-583T]+	IL1B:c.[-583T]+	IL1B:c.[-583T]+
	IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1RN:c.215-516(86)[2]
Exp n =	27	27	27	27
Exp i =	19	17	17	16
Exp % =	70.4%	63.0%	63.0%	59.3%
Con n =	58	58	58	58
Con i =	26	24	17	17
Con % =	44.8%	41.4%	29.3%	29.3%
D_{max}	25.5%	21.6%	33.7%	29.9%
SNS	0.704	0.630	0.630	0.593
ESP	0.552	0.586	0.707	0.707
EXC	0.600	0.600	0.682	0.671
IFP	0.448	0.414	0.293	0.293
IFN	0.296	0.370	0.370	0.407
VPP	0.422	0.415	0.500	0.485
VPN	0.800	0.773	0.804	0.788
M-W (p=)	0.029	0.065	0.003	0.009
Fisher (p=)	0.036	0.102	0.004	0.016
RR	1.570	1.522	2.148	2.022
RM	2.923	2.408	4.100	3.508
IC95%	1.103	0.941	1.563	1.352
	7.748	6.164	10.754	9.102
M-H (p=)	0.031	0.067	0.004	0.010

Figura 12c. Gráfica que muestra la separación que se produce entre los grupos de estudio PAG y PCG con cada uno de los 4 haplotipos seleccionados. Puede observarse que la separación entre los grupos es buena y significativa para cualquiera de los haplotipos. El recuadro del lado derecho sintetiza las estadísticas de evaluación relativas a cada uno de los 4 haplotipos en cuanto a su habilidad para marcar específicamente a los grupos de estudio. El recuadro punteado señala al haplotipo que demostró la mejor habilidad para marcar al grupo experimental. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **SP:** salud periodontal. **Exp n=:** número de sujetos incluidos en el grupo experimental. **Exp i=:** número de portadores en el grupo experimental. **Exp %=:** porcentaje de portadores en el grupo experimental. **Con n=:** número de sujetos incluidos en el grupo control. **Con i=:** número de portadores en el grupo control. **Con %=:** porcentaje de portadores en el grupo control. **D_{max} :** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental y control. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel.



	Haplotipo 1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4
EP vs. SP	IL1A:c.[-949C]+ IL1B:c.[315C]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1A:c.[-949C]+ IL1B:c.[315CC]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1A:c.[-949CC]+ IL1B:c.[315C]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]	IL1A:c.[-949CC]+ IL1B:c.[315CC]+ IL1B:c.[-583T]+ IL1RN:c.215-516(86)[2]
Exp n =	85	85	85	85
Exp i =	45	41	34	33
Exp % =	52.9%	48.2%	40.0%	38.8%
Con n =	42	42	42	42
Con i =	20	13	13	10
Con % =	47.6%	31.0%	31.0%	23.8%
D _{max}	5.3%	17.3%	9.0%	15.0%
SNS	0.529	0.482	0.400	0.388
ESP	0.524	0.690	0.690	0.762
EXC	0.528	0.551	0.496	0.512
IFP	0.476	0.310	0.310	0.238
IFN	0.471	0.518	0.600	0.612
VPP	0.692	0.759	0.723	0.767
VPN	0.355	0.397	0.363	0.381
M-W (p=)	0.574	0.065	0.322	0.094
Fisher (p=)	0.706	0.086	0.337	0.112
RR	1.112	1.558	1.292	1.631
RM	1.238	2.079	1.487	2.031
IC95%	0.590	0.953	0.678	0.883
M-H (p=)	2.595	4.536	3.261	4.673
	0.573	0.066	0.322	0.096

Figura 12d. Gráfica que muestra la separación que se produce entre los grupos de estudio EP y SP con cada uno de los 4 haplotipos seleccionados. Puede observarse que la separación entre los grupos es pobre y no significativa para cualquiera de los haplotipos. El recuadro del lado derecho sintetiza las estadísticas de evaluación relativas a cada uno de los 4 haplotipos en cuanto a su habilidad para marcar específicamente a los grupos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **SP:** salud periodontal. **Exp n=:** número de sujetos incluidos en el grupo experimental. **Exp i=:** número de portadores en el grupo experimental. **Exp %=:** porcentaje de portadores en el grupo experimental. **Con n=:** número de sujetos incluidos en el grupo control. **Con i=:** número de portadores en el grupo control. **Con %=:** porcentaje de portadores en el grupo control. **D_{max}:** diferencia en el porcentaje de portadores entre el grupo experimental y control. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **M-W:** prueba U de Mann-Whitney. **Fisher:** prueba exacta de Fisher. **RR:** riesgo relativo. **RM:** razón de momios. **IC95%:** intervalo de confianza para la razón de momios. **M-H:** prueba de Mantel-Haenszel.

Combinaciones con genotipo PST (n=218)	PCG vs. SP	PAG vs. SP	PAG vs. PCG	EP vs. SP
	Rango	Rango	Rango	Rango
Exp %	0 - 15.5%	0 - 14.8%	0 - 14.8%	0 - 15.3%
Con %	0 - 21.4%	0 - 21.4%	0 - 15.5%	0 - 21.4%
D_{max}	-9.4% - 1.7%	-10.3% - 5.3%	-2.7% - 6.2%	-9.7% - 2.4%
SNS	0 - 0.155	0 - 0.148	0 - 0.148	0 - 0.153
ESP	0.786 - 1	0.786 - 1	0.845 - 1	0.786 - 1
EXC	0.390 - 0.440	0.522 - 0.623	0.624 - 0.694	0.307 - 0.378
IFP	0 - 0.214	0 - 0.214	0 - 0.155	0 - 0.214
IFN	0.845 - 1	0.852 - 1	0.852 - 1	0.847 - 1
VPP	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1
VPN	0.393 - 0.424	0.579 - 0.623	0.676 - 0.697	0.306 - 0.336
RR	0 - 1.448	0 - 3.111	0 - 4.296	0 - 1.976
RM	0 - 1.464	0 - 3.280	0 - 4.560	0 - 2.025
No. combinaciones con:				
M-W ($p < 0.05$)	1	0	0	9
Fisher ($p < 0.05$)	0	0	0	0
M-H ($p < 0.05$)	0	0	0	0

Figura 13. El cuadro muestra las estadísticas de todas las combinaciones ($n=218$) que presentaron el genotipo PST™ en cada una de las 4 comparaciones entre grupos de estudio **PAG**: periodontitis agresiva generalizada. **SP**: salud periodontal. **SNS**: sensibilidad. **ESP**: especificidad. **EXC**: exactitud. **IFP**: índice de falsos positivos. **IFN**: índice de falsos negativos. **VPP**: valor predictivo positivo. **VPN**: valor predictivo negativo.

PCG vs. SP	Exp %	Con %	D_{max}	SNS	ESP	EXC	IFP	IFN	VPP	VPN	M-W ($p=$)
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315CT]+IL1B:c.[-583TT]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949T]+IL1B:c.[315TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315T]+IL1B:c.[-583TT]	0	7.1%	-7.1%	0	0.929	0.390	0.071	1	0	0.402	0.040
IL1A:c.[-949T]+IL1B:c.[315TT]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315T]+IL1B:c.[-583TT]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315T]+IL1B:c.[-583TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315CT]+IL1B:c.[-583TT]+IL1RN:c.215-516(86)[2]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315TT]+IL1B:c.[-583T]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.400	0.048	1	0	0.408	0.095

EP vs. SP	Exp %	Con %	D_{max}	SNS	ESP	EXC	IFP	IFN	VPP	VPN	M-W ($p=$)
IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[315CT]+IL1B:c.[-583TT]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[315TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1A:c.[-941T]+IL1B:c.[315TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1B:c.[315T]+IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[-583TT]	0	7.1%	-7.1%	0	0.929	0.307	0.071	1	0	0.315	0.013
IL1A:c.[-941T]+IL1B:c.[-583T]+IL1B:c.[315TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1B:c.[315T]+IL1RN:c.215-516(86)[2]+IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[-583TT]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1B:c.[315T]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[-583TT]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1RN:c.215-516(86)[2]+IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[315CT]+IL1B:c.[-583TT]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043
IL1B:c.[-583T]+IL1A:c.[-941CT]+IL1B:c.[315TT]+IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	0	4.8%	-4.8%	0	0.952	0.315	0.048	1	0	0.320	0.043

Figura 14. Resumen de las estadísticas de evaluación de 9 haplotipos que incluyen al genotipo PST™ para las comparaciones entre grupos PCG vs. SP y EP vs. SP. Los valores sombreados representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **EP:** enfermedad periodontal **SP:** salud periodontal. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo.

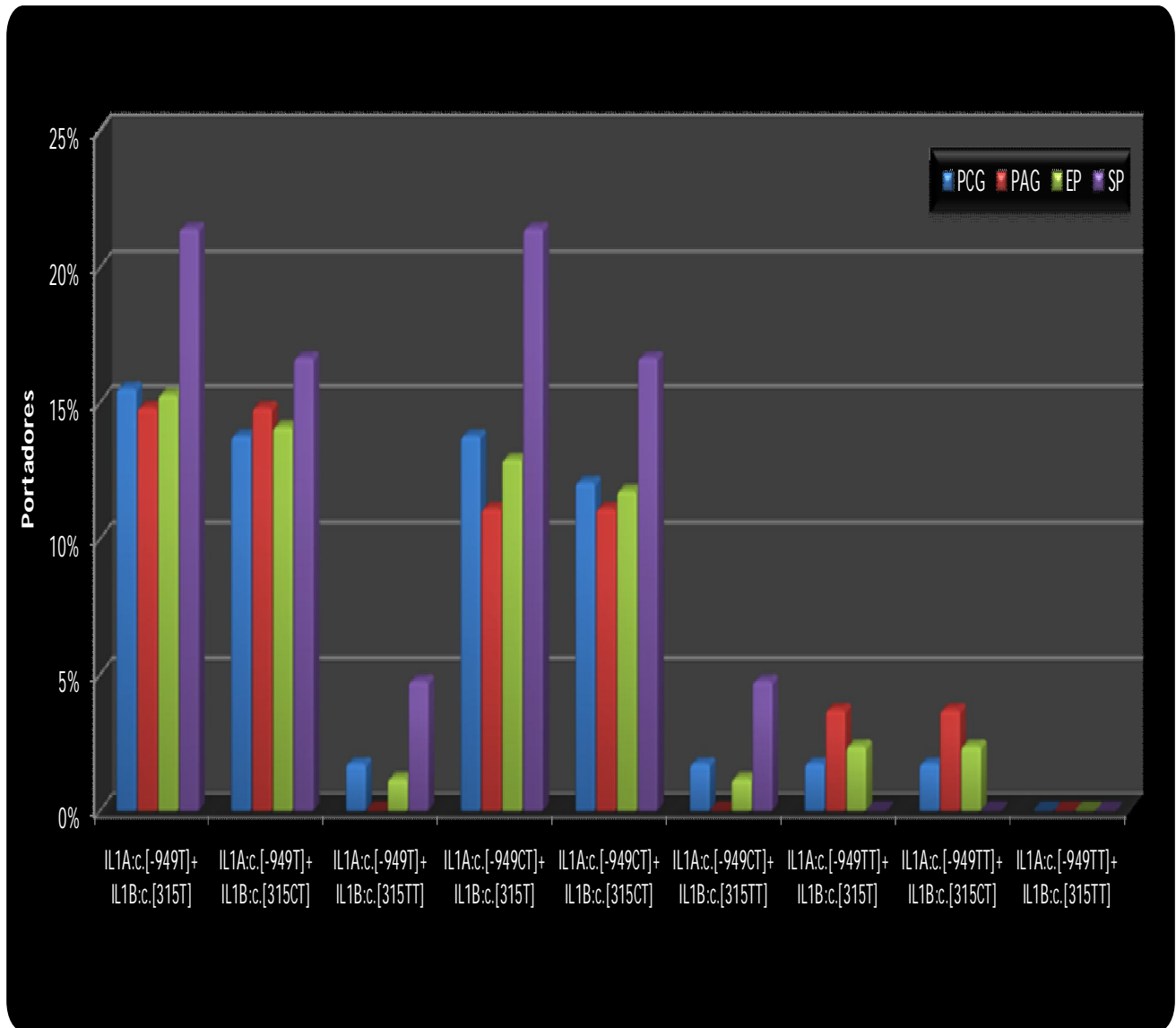


Figura 15. Distribución de las frecuencias de 9 haplotipos que presentaron el genotipo PST "puro"; es decir, aquellos en los que no se consideraron alelos y/o genotipos de otras variaciones genéticas en cada uno de los grupos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal.

	PCG	PAG	EP	SP
	%	%	%	%
IL1A:c.[-949T]+IL1B:c.[315T]	15.5%	14.8%	15.3%	21.4%
IL1A:c.[-949T]+IL1B:c.[315CT]	13.8%	14.8%	14.1%	16.7%
IL1A:c.[-949T]+IL1B:c.[315TT]	1.7%	0	1.2%	4.8%
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315T]	13.8%	11.1%	12.9%	21.4%
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315CT]	12.1%	11.1%	11.8%	16.7%
IL1A:c.[-949CT]+IL1B:c.[315TT]	1.7%	0	1.2%	4.8%
IL1A:c.[-949TT]+IL1B:c.[315T]	1.7%	3.7%	2.4%	0
IL1A:c.[-949TT]+IL1B:c.[315CT]	1.7%	3.7%	2.4%	0
IL1A:c.[-949TT]+IL1B:c.[315TT]	0	0	0	0

Combinaciones genotipo PST (n=9)	PCG vs. SP Rango	PAG vs. SP Rango	PAG vs. PCG Rango	EP vs. SP Rango
Exp %	0 - 15.5%	0 - 14.8%	0 - 14.8%	0 - 15.3%
Con %	0 - 21.4%	0 - 21.4%	0 - 15.5%	0 - 21.4%
D_{max}	-7.6% - 1.7%	-10.3% - 3.7%	-2.7% - 2.0%	-8.5% - 2.4%
SNS	0 - 0.155	0 - 0.148	0 - 0.148	0 - 0.153
ESP	0 - 1	0 - 1	0 - 0.983	0 - 1
EXC	0 - 0.430	0 - 0.623	0 - 0.682	0 - 0.370
IFP	0 - 0.214	0 - 0.214	0 - 0.155	0 - 0.214
IFN	0 - 0.983	0 - 1	0 - 1	0 - 0.988
VPP	0 - 1	0 - 1	0 - 0.500	0 - 1
VPN	0 - 0.424	0 - 0.618	0 - 0.687	0 - 0.336
RR	0 - 0.828	0 - 0.889	0 - 2.148	0 - 0.847
RM	0 - 0.800	0 - 0.870	0 - 2.192	0 - 0.822
<i>No. combinaciones con:</i>				
M-W ($p < 0.05$)	0	0	0	0
Fisher ($p < 0.05$)	0	0	0	0
M-H ($p < 0.05$)	0	0	0	0

Figura 16. Estadísticas realizadas para la evaluación de haplotipos con el genotipo PST™ “puro”. En el recuadro del lado izquierdo se presentan los porcentajes de portadores de cada haplotipo en los diferentes grupos de estudio. El recuadro del lado derecho presenta el resumen de los rangos de los diferentes indicadores estadísticos para cada comparación entre grupos de estudio. **PCG:** periodontitis crónica generalizada. **PAG:** periodontitis agresiva generalizada. **EP:** enfermedad periodontal (incluye grupos PCG y PAG). **SP:** salud periodontal. **SNS:** sensibilidad. **ESP:** especificidad. **EXC:** exactitud. **IFP:** índice de falsos positivos. **IFN:** índice de falsos negativos. **VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie

CLÍNICOS RESPONSABLES: Dra. Velia Jacobo-Soto
Dra. Argelia Almaguer-Flores
Dra. Ma. de Lourdes Márquez C
Dra. Jazmín Yunuen Moreno Borjas
Dra. Dolores Carrasco Ortiz

INSTITUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular
Div. de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología, UNAM

TELÉFONO: 5622-5565 (horas y días hábiles)

TÍTULO DEL PROYECTO: Efectos inmunológicos y clínicos de variaciones genéticas genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México (DGAPA # IN213006-3).

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en un estudio de investigación que analiza las bacterias de la boca así como las características genéticas y del sistema de defensa de las personas que padecen enfermedades de las encías.

PROPÓSITO: Usted debe entender que los objetivos del estudio son determinar la presencia y cantidad de bacterias que se encuentran en la boca de personas con diferentes tipos de enfermedades de las encías y comparar las características genéticas y la magnitud de la respuesta del sistema de defensa entre personas con y sin enfermedades de las encías.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en el estudio debe haber nacido en la República Mexicana, no debe padecer ninguna enfermedad sistémica a excepción de diabetes, debe tener por lo menos 20 dientes naturales en la boca, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado, no puede haber recibido una limpieza dental

profesional en el último mes y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Asimismo, en el caso de ser mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

Usted debe entender que su participación en este estudio de investigación requiere uno o más de los siguientes procedimientos:

- **La realización de una evaluación periodontal completa**, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas “bolsas” que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas “bolsas” en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.
- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- **La toma de un máximo de 28 muestras de placa dentobacteriana**, lo cual se realizará tomando con un instrumento dental, una muestra de la película blanquecina que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana) de todos los dientes de su boca. Este procedimiento no es doloroso aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo.
- **La toma de 1 muestra de máximo 11 ml de sangre**, lo cual se realizará siguiendo los mismos procedimientos que se llevan a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados. Dicho procedimiento consiste en colocar una liga gruesa ligeramente apretada alrededor de su brazo para facilitar la visualización de sus venas. Posteriormente, se introduce una aguja

a una vena de alguno de sus brazos y se deposita la sangre en uno o dos tubos de vidrio conforme sale de la vena. La liga y aguja serán retiradas y el sitio de punción será cubierto con un curita una vez que el clínico determine que ha dejado de sangrar. Este procedimiento puede causarle dolor o molestias principalmente en el sitio de la punción.

- **La toma de 1 muestra de células epiteliales de la mucosa bucal**, lo cual se realizará frotando un algodón sobre la superficie interna de sus mejillas, paladar, labios, encías y por debajo de la lengua durante aproximadamente 1 minuto. Este procedimiento no conlleva ninguna molestia. La muestra será colocada sobre una tarjeta de papel especial.

Usted debe entender que todos los procedimientos serán realizados en una sola visita que tendrá una duración máxima de 2 horas y que en este estudio participarán aproximadamente 500 (quinientas) personas.

Usted debe entender que su participación en el estudio no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en este estudio son mínimos. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental. La muestra de células epiteliales de la mucosa bucal no conllevan ninguna molestia y la muestra de sangre puede causarle algunas molestias menores pero no duraderas en el sitio de la punción.

Debe entender que todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo

el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

BENEFICIOS: Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas y los factores que intervienen en las enfermedades de las encías en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dichas enfermedades, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

COMPENSACIONES: Usted debe entender que no existe ninguna compensación monetaria por su participación pero que tampoco incurrirá en ningún gasto adicional.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

RENUNCIA/RETIRO: Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de este estudio decidieran no incluirle en la investigación, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

DERECHOS: Usted tiene el derecho de hacer preguntas y de que éstas le sean contestadas a su plena satisfacción. Puede hacer sus preguntas en este momento, antes de firmar la presente forma o en cualquier momento en el futuro. Si desea mayores informes acerca de su participación en este estudio de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puede contactar a cualquiera de los responsables llamando al número de teléfono que se encuentra en la parte superior de la primera página de esta forma.

ACUERDO: Al firmar en los espacios provistos a continuación usted constata que ha leído y entendido esta forma de consentimiento y que está de acuerdo con su participación en este estudio. Al terminar la visita recibirá una copia de esta forma.

_____ Nombre del Paciente	_____ Firma del Paciente	_____ Fecha (Día/mes/año)
_____ Nombre del Clínico Responsable	_____ Firma del Clínico Responsable	_____ Fecha (Día/mes/año)

ANEXO 2. INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	
Descripción de la población de estudio	77
TABLA 2.	
Descripción de las variaciones genéticas evaluadas.....	78
TABLA 3.	
Descripción de los genes en los que se localizan las variaciones evaluadas.....	79
TABLA 4.	
Descripción de los métodos empleados para la detección de variaciones genéticas	80
TABLA 5a.	
Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas comparado los grupos PCG y SP	81
TABLA 5b.	
Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas comparando los grupos PAG y SP	82
TABLA 5c.	
Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas, comparado los grupos PAG y PCG	83
TABLA 5d.	
Estadísticas de alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas, comparado los grupos EP y SP	84

ANEXO 3. INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	
Esquema de la secuencia de pasos para los análisis de datos.....	85
FIGURA 2a.	
Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1A:c.-949C>T	86
FIGURA 2b.	
Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1B:c.315C>T.....	87
FIGURA 2c.	
Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación IL1B:c.-583T>C.....	88
FIGURA 2d.	
Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variación (IL1RN:c.215-516(86)[2_6])	89
FIGURA 3.	
Gráficas de mosaico de proporción de portadores de los diferentes genotipos.	90
FIGURA 4.	
Gráfica de burbuja de los alelos y genotipos individuales de las 4 variaciones genéticas evaluadas.....	91
FIGURA 5.	
Diagrama de Venn que presenta el universo de los alelos y genotipos seleccionados	92
FIGURA 6.	
Descripción de las variables generadas de alelos y genotipos combinados	93
FIGURA 7.	
Gráfica de burbuja de los haplotipos detectados en la población de estudio	94
FIGURA 8.	
Descripción de las variables generadas de alelos y genotipos combinados	95
FIGURA 9.	
Descripción de los pasos a seguir para seleccionar haplotipos en base a discriminaciones secuenciales de redundancias	96
FIGURA 10.	
Descripción de los 4 haplotipos seleccionados	97
FIGURA 11.	
Distribución de las frecuencias de las 4 haplotipos seleccionados que mostraron capacidad para marcar los diferentes grupos.....	98
FIGURA 12a.	
Gráfica que muestra la separación que se produce en los grupos de estudio PCG y SP	99
FIGURA 12b.	
Gráfica que muestra la separación en los grupos de estudio PAG y SP.....	100

FIGURA 12c.	
Gráfica que muestra la separación que se produce entre los grupos de estudio PAG y PCG.....	101
FIGURA 12d.	
Gráfica que muestra la separación que se produce entre los grupos de estudio EP y SP)	102
FIGURA 13.	
Estadísticas de todas las combinaciones que presentaron genotipo PST	103
FIGURA 14.	
Estadísticas de evaluación de 9 haplotipos que incluyen el genotipo PST	104
FIGURA 15.	
Distribución de las frecuencias de 9 haplotipos que presentaron genotipo PST “puro”	105
FIGURA 16.	
Estadísticas para la evaluación de haplotipos con el genotipo PST “puro”	106