



Universidad Nacional Autónoma de México

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud**

**RELACIÓN ENTRE PERFILES GENÉTICOS POLIMÓRFICOS
Y PERFILES MICROBIOLÓGICOS SUBGINGIVALES EN
DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y PERIODONTITIS**

TESIS

Que para optar por el grado de
Doctora en Ciencias

P R E S E N T A:

Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández

TUTORA:

Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie

Laboratorio de Genética Molecular, DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

Dra. Gabriela E. Mercado Célis

Laboratorio de Genómica Clínica DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM.

Ciudad Universitaria, CDMX. Noviembre

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Debo la fuerza para seguir adelante a mi hermosa familia, a mi alma gemela Sergio Ramón Flores Méndez y amigos que están siempre presentes.

Agradecimientos:

A mi querida Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a mi tutora y amiga Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie y al Mtro. Arturo Fernández Pedrero, por el financiamiento para el desarrollo del presente proyecto y soporte incondicional.

A la directora de la Facultad de Odontología Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, quien fue una guía para mis estudios de posgrado, como coordinadora del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud.

En memoria de la Dra. Patricia Tato Zaldívar por su gran apoyo en el comité tutor.

A la Mtra. María de Lourdes Márquez Corona y a la Dra. América Patricia Pontigo Loyola, por el apoyo académico y soporte para el desarrollo del presente estudio, con su equipo de trabajo en el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

To my mentor Bruce J. Paster Ph.D., and Chris, Alexis, Sean, and Kit, for their academic support and hospitality during my fellowship at the Forsyth Institute, Cambridge MA.

“Si quieren vivir felices, levanten una idea en qué creer, y vivan para servirle a esa idea, porque el mundo que tendremos será el que seamos capaces de lograr.” José Mujica.

“Por mi Raza hablará el espíritu.” José Vasconcelos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	8
Susceptibilidad de las enfermedades periodontales.....	8
<i>Relación entre diabetes mellitus tipo 2 y Periodontitis</i>	9
<i>Variaciones genéticas en mediadores de la inflamación en DMT2</i>	10
Etiología de las enfermedades periodontales.....	11
<i>Descripción de la microbiota subgingival</i>	12
<i>Microbiota subgingival en diabetes mellitus tipo 2</i>	15
<i>Microbioma oral humano</i>	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
General.....	19
Particulares	19
HIPÓTESIS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	21
POBLACIÓN DE ESTUDIO	21
Criterios de selección	22
EVALUACIÓN CLÍNICA	23
Recolección de muestras.....	24
EVALUACIÓN GENÉTICA	25
Purificación de muestras de DNA de sangre para la evaluación genética	25
Purificación de DNA de células epiteliales para la evaluación genética	26
Detección de variaciones genéticas	26
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	27
Recolección y procesamiento de muestras para checkerboard.....	27
<i>Especies bacterianas y condiciones de cultivo</i>	28

<i>Purificación de DNA y preparación de sondas</i>	28
<i>Hibridaciones DNA-DNA</i>	29
<i>Detección y cuantificación de microorganismos</i>	29
Recolección y procesamiento de muestras para HOMIM.....	30
<i>Purificación de DNA y procesamiento de muestras para HOMIM</i>	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	31
PARÁMETROS CLÍNICOS Y PERIODONTALES	31
ANÁLISIS GENÉTICOS.....	32
<i>Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas</i>	32
<i>Generaciones de haplotipos</i>	33
<i>Modelo aditivo</i>	34
<i>Asociaciones del marcador aditivo con periodontitis generalizada</i>	35
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA CHECKERBOARD	35
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA HOMIM.....	36
RESULTADOS	37
EVALUACIÓN CLÍNICA.....	37
Características de la población de estudio.....	37
EVALUACIÓN GENÉTICA	38
Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas.....	38
Generaciones de haplotipos.....	39
Modelo aditivo.....	39
Asociaciones del marcador aditivo con Periodontitis generalizada	40
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	41
Proporciones individuales promedio del total de la población	41
Proporciones por complejos bacterianos del total de la población	41
Niveles promedio en grupos de sujetos con clasificación periodontal	42
Prevalencia promedio en grupos de sujetos con clasificación periodontal	42
Proporciones promedio en grupos de sujetos con clasificación periodontal.....	43
Proporciones por complejos bacterianos en grupos de sujetos con clasificación periodontal	43
Correlación de niveles de HGA1c y parámetros clínicos periodontales.....	44
Análisis de correlación microbiológica y datos evaluados en sujetos diabéticos	44

Análisis microbiológico por microarreglos del microbioma oral humano.....	45
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
TABLAS.....	65
FIGURAS.....	77
ANEXOS	96
Anexo 1. Formato de consentimiento informado	96
Anexo 2. Calibración de clínicos para estudios de investigación periodontal.....	99
Anexo 3. Descripción de los métodos empleados para la detección de variaciones genéticas	102



RESUMEN

En la actualidad no queda bien esclarecido, si el incremento en el riesgo y severidad de las enfermedades periodontales en diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), se asocia a los cambios en la microbiota subgingival. Ambas patologías son determinadas por modificadores genéticos y alteraciones microbiológicas subgingivales derivadas de las características metabólicas. A pesar de ello, no existe un marcador de susceptibilidad de riesgo genético y microbiológico bien definido para DMT2 y distintas condiciones periodontales. **Objetivo:** Determinar la asociación entre haplotipos polimórficos, para genes de 12 citocinas moduladoras de la inflamación, por medio de genotipificación y/o secuenciación, en grupos de sujetos no diabéticos y con DMT2, cada grupo con individuos sanos periodontales (SP) y con periodontitis generalizada (PG) y describir el perfil microbiológico subgingival de sujetos con misma condición sistémica y periodontal, por medio de dos técnicas de identificación molecular. **Métodos:** 189 sujetos divididos en no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con DMT2 ($n=71$) fueron seleccionados para la evaluación genética. Muestras de células epiteliales fueron recolectadas para genotipificación y/o secuenciación para las variaciones: IL1A:c.-949C>T(rs1800587), IL1B:c.315C>T(rs1143634), IL1B:c.-583T>C(rs16944), IL1RN:c.215-516(86)[2_6](rs2234663), IL6:c.-237C>G(rs1800795), IL8:c.-352A>T(rs4073), IL10:c.-627T>G(rs1800872), IL10:c.-854T>C(rs1800871), IL10:c.-1116a>G(rs1800896), IL12B:c.*159A>C(rs3212227), TNF:c.-488G>A(rs1800629) y LTA:c.-10+90A>G(rs909253). 28 muestras subgingivales fueron recolectadas de los sujetos con genotipificación y posteriormente 177 sujetos fueron seleccionados por su clasificación periodontal: SP no-DMT2 $n=63$, PG no-DMT2 $n=62$, SP DMT2 $n=13$, y PG DMT2 $n=39$, las muestras fueron procesadas para determinar niveles, cuentas y prevalencia de 40 microorganismos por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA. Adicionalmente 41 muestras subgingivales de 27 sujetos con DMT2 fueron procesadas por medio de Microarreglos del Microbioma Oral Humano (HOMIM). Se evaluaron, además, parámetros de obesidad en el total de la población y niveles de bioquímica sanguínea en diabéticos. **Resultados:** 65 de los 75 genotipos individuales y alelos, fueron positivos en la población de estudio (86.7%). 5 genotipos: (IL1A:c.[-949CC], IL1B:c.[315CC], IL1B:c.[-583TT], IL6:c.[-237GG], LTA:c.[-10+90AG]) y 1 alelo (IL8:c.[-352A]) fueron seleccionados por su asociación con DMT2. 57 haplotipos polimórficos fueron generados de las posibles combinaciones de 2 a 6 genotipos individuales y alelos seleccionados. 5 haplotipos fueron seleccionados como “candidatos” e incorporados a un modelo aditivo estadístico. Un marcador genético de riesgo para DMT2 fue identificado, que presentó asociación significativa con PG. Especies no patogénicas y especies

putativas periodontales, fueron identificadas con mayores cuentas, prevalencia y/o proporción (Prop), en los grupos con DMT2 contra los no-DMT2: *S. anginosus*, *S. oralis*, *V. parvula*, *C. ochracea*, *C. gracilis*, *S. artemidis* (Prop_p<0.001), *A. georgiae*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. constellatus*, *P. micra*, *S. noxia* (Prop_p<0.01) y *P. nigrescens* (Prop_p<0.05). 248 especies bacterianas fueron positivas para la técnica de HOMIM, con frecuencias relativas significativamente mayores en el grupo de SP DMT2 para: *Streptococcus salivarius* HOT-755 / *Streptococcus vestibularis* HOT-021 / *Streptococcus* sp. HOT-067_E34 en comparación con el grupo de PG DMT2 ($p<0.05$).

Conclusiones: Los sujetos del presente estudio, presentaron un perfil genético polimórfico con altos índices de riesgo para DMT2, asociado con PG. El perfil microbiológico subgingival de sujetos con DMT2, fue significativo para especies no patogénicas y putativas periodontales, mismo que se encontró en estrecha relación con el estado sistémico de los individuos, y no así con el perfil genético asociado a DMT2.

ABSTRACT

It remains unclear whether increased risk and severity of periodontal diseases in type-2 diabetes (T2DM) are related to changes in the subgingival microbiota. Both diseases had determined by genetic and subgingival microbial disturbances due to a metabolic condition. It is well established that endogenous factors are strongly related. However, genetic and microbial susceptibility-risk markers have not been defined in T2DM individuals with any periodontal condition. **Objective:** To determine the association between polymorphic haplotypes of 12 variations in modulatory inflammation cytokine genes, by genotyping of non-diabetic and T2DM groups, each group with periodontal health (PH) and generalized periodontitis (GP) individuals and, to describe the subgingival microbial profile of subjects with the same periodontal, systemic and metabolic condition, by two molecular techniques. Obesity had evaluated in all subjects and biochemistry tests of T2DM individuals. **Methods:** 189 subjects grouped in non-diabetic (non-T2DM $n=118$) and with T2DM ($n=71$) were selected for the genetic evaluation. Samples of epithelial cells were collected and genotyped and/or sequencing for the following variations: IL1A:c.-949C>T(rs1800587), IL1B:c.315C>T(rs1143634), IL1B:c.-583T>C(rs16944), IL1RN:c.215-516(86)[2_6](rs2234663), IL6:c.-237C>G(rs1800795), IL8:c.-352A>T(rs4073), IL10:c.-627T>G(rs1800872), IL10:c.-854T>C(rs1800871), IL10:c.-1116a>G(rs1800896), IL12B:c.*159A>C(rs3212227), TNF:c.-488G>A(rs1800629) and LTA:c.-10+90A>G(rs909253). 28 subgingival plaque samples had collected of the subjects with genetic evaluation and an additional selection of 177 subjects by their periodontal classification: PH non-T2DM $n=63$, PH T2DM $n=13$, GP non-T2DM $n=62$ and GP T2DM $n=39$, and had processed by Checkerboard DNA-DNA hybridization technique, to determine the levels, prevalence, and proportion of 40 microbial species. Additionally, 41 subgingival microbial samples, of 27 T2DM selected individuals, had evaluated by Human Oral Microbe Identification Microarray, to determine relative frequencies of 379 DNA-Probes. Blood chemistry serum levels and obesity had evaluated of T2DM individuals. **Results:** 65 of the 75 individual genotypes and alleles evaluated were detected in the study population (86.7%). 5 genotypes (IL1A:c.[-949CC], IL1B:c.[315CC], IL1B:c.[-583TT], IL6:c.[-237GG], LTA:c.[-10+90AG]) and 1 allele (IL8:c.[-352A]) were selected due to their associations with T2DM. 57 polymorphic-haplotypes made-up combinations of 2 to 6 of the individual genotypes and alleles selected. 5 haplotypes had selected as “candidates” and had incorporated into an additive statistical model. A genetic-risk marker for T2DM was identified, which exhibited a significant association with GP. Non-pathogenic and periodontal putative species of the subgingival microbiota had identified with higher levels, prevalence or

proportion (Prop) in T2DM than in non-T2DM individuals: *S. anginosus*, *S. oralis*, *V. parvula*, *C. ochracea*, *C. gracilis*, *S. artemidis* (Prop_p<0.001), *A. georgiae*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. constellatus*, *P. micra*, *S. noxia* (Prop_p<0.01) and *P. nigrescens* (Prop_p<0.05). 248 strains were positive with HOMIM, with significantly higher frequencies in PH T2DM group of *Streptococcus salivarius* HOT-755 / *Streptococcus vestibularis* HOT-021 / *Streptococcus* sp. HOT-067_E34 in comparison GP T2DM individuals ($p<0.05$). **Conclusion:** T2DM individuals of the present study had presented a genetic-risk marker that appears to be related to generalized periodontitis. The particularly subgingival microbial profile of T2DM individuals showed significant association with non-pathogenic and periodontal putative species, related to the metabolic conditions of individuals and not directly associated with the genetic profile of T2DM.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) son consideradas enfermedades inflamatorias, en donde el pobre control hiperglucémico, es un factor de riesgo que modifica el grado en el desarrollo y severidad de la periodontitis (Caton, Armitage et al. 2018, Papapanou, Sanz et al. 2018). El pobre control metabólico de un individuo diabético que incluye: hiperglucemia, dislipidemias y obesidad, contribuyen al aumento en la prevalencia y severidad de la diabetes, y son causas de mortalidad en nuestro país y a nivel mundial (IDF 2017, Sanz, Ceriello et al. 2018). Asimismo, el estilo de vida la inactividad física, una dieta alta en grasas, el tabaquismo y consumo de alcohol, son factores ambientales que contribuyen a prolongar los estados de hiperglucemia (IDF 2017).

Tanto la DMT2 como la periodontitis, son patologías determinadas por modificadores genéticos. Las variaciones genéticas que pueda presentar un individuo, son consideradas factores de riesgo endógeno para el desarrollo de cada patología, sin embargo, en la actualidad no existe un marcador de susceptibilidad genética bien definido para DMT2 o periodontitis, debido al gran número de genes y variaciones polimórficas involucrados en su desarrollo (Takashiba and Naruishi 2006, Banerjee and Saxena 2014, García-Chapa, Leal-Ugarte et al. 2017, Merino, Udler et al. 2017).

El incremento en el riesgo y severidad de las enfermedades periodontales en DMT2, se asocia a los cambios en la microbiota subgingival. A pesar de ello, se desconoce un perfil microbiológico particular para DMT2 y un fenotipo inflamatorio particular en distintas condiciones periodontales (Demmer, Breskin et al. 2017, Sanz, Ceriello et al. 2018). Esa es la razón por la cual es indispensable el conocimiento de la microbiota subgingival, considerando distintos factores modificadores en sujetos con DMT2, bajo distintas condiciones periodontales, además de conocer los factores de riesgo endógeno tanto para diabetes como para periodontitis.

Por lo tanto, el objetivo principal del presente estudio, fue el de determinar la asociación entre haplotipos polimórficos, para genes de 12 citocinas moduladoras de la inflamación, por medio de genotipificación y/o secuenciación, en grupos de sujetos no diabéticos y con DMT2, cada grupo con individuos sanos periodontales y con periodontitis generalizada, y describir el perfil microbiológico subgingival de sujetos con misma condición sistémica y periodontal, por medio de dos técnicas de identificación molecular.

ANTECEDENTES

Susceptibilidad de las enfermedades periodontales

Existen factores de susceptibilidad y riesgo, que influyen en el desarrollo y severidad de las enfermedades periodontales. Algunos factores ambientales son modificables como el tabaquismo, el estrés y la mala higiene. Otros factores endógenos son no modificables, tales como: virulencia bacteriana; susceptibilidad del huésped, defectos en leucocitos polimorfonucleares, determinadas enfermedades sistémicas como diabetes, VIH/SIDA y una gran variedad de factores de predisposición genética (Takashiba and Naruishi 2006, Banerjee and Saxena 2014, Deng, Szafranski et al. 2017, Kinane, Stathopoulou et al. 2017).

La magnitud de los procesos inflamatorios se encuentra mediada por factores genéticos como son las variaciones polimórficas. Un individuo que porta una variación genética, en comparación con otro que no la porta, expuestos al mismo grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana y a los mismos factores modificadores de susceptibilidad y riesgo ambientales, desarrollará mayor severidad en las enfermedades periodontales que si no presentara ninguna predisposición (Kornman and di Giovine 1998, Kornman and Polverini 2014, Kornman 2018).

Las enfermedades periodontales y peri-implantares, se definen actualmente como: enfermedades inflamatorias crónicas multifactoriales, relacionadas con una placa disbiótica (Caton, Armitage et al. 2018, Papapanou, Sanz et al. 2018), esta a su vez estimula respuestas inmunológicas destructivas, conduciendo a la pérdida de los tejidos de soporte del diente (Irfan, Dawson et al. 2001, Lindhe and Lang 2015). El grado de patogenicidad de la placa disbiótica se ve influenciado principalmente por la presencia y el aumento en número y proporción de bacterias consideradas “periodontopatógenas” (Moore and Moore 1994) y la disminución de bacterias compatibles con salud periodontal en un desequilibrio ecológico (Socransky and Haffajee 2005). El proceso infeccioso estimula a su vez a células del sistema inmunológico innato, principalmente por neutrófilos y granulocitos (células polimorfonucleares) que promueven un ambiente quimiotáctico y de presentación de antígenos bacterianos por macrófagos y células dendríticas que, a su vez, estimulan a Linfocitos T para a producir citocinas inflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 12 e Interleucina 17 (IL-17) (Kinane, Stathopoulou et al. 2017). Dichas citocinas tienen efecto de reclutamiento y activación sobre diversas líneas celulares de: destrucción de hueso como es la maduración de osteoclastos celulares y activación de moléculas de destrucción de tejido conectivo y ligamento

periodontal como especies reactivas del oxígeno y metaloproteinasas de matriz extracelular (Hajishengallis 2014, Lang and Lindhe 2015).

Por lo tanto, el daño tisular de los tejidos periodontales se le atribuye a la respuesta inmunológica del huésped, dónde la susceptibilidad de las enfermedades periodontales depende de diversos factores: la cronicidad de la enfermedad, la extensión y severidad en los cambios de la placa subgingival (disbiosis de la biopelícula) y la respuesta inmunológica del huésped, influenciada por factores no modificadores como: factores genéticos y factores ambientales como son el tabaquismo, el estrés y la mala higiene (acumulación de placa) (Kinane, Stathopoulou et al. 2017).

Relación entre diabetes mellitus tipo 2 y Periodontitis

La prevalencia mundial que estimó la Organización Mundial de la Salud en el año 2014 para Diabetes-Mellitus (DM), en adultos mayores de 18 años, fue del 9% (WHO 2014). México particularmente, ha sido reportado el 5° país a nivel mundial con más alta prevalencia de DM (12%) con una media prevalente del 14.4% en hombres y 13.7% en mujeres con Diabetes-Mellitus-Tipo-2 (DMT2), además de presentar la prevalencia más alta a nivel mundial en incremento de obesidad (Índice de Masa corporal, IMC: ≥ 30 kg/m²) (Barquera, Campos-Nonato et al. 2013, IDF 2017).

Existe una relación manifiesta entre infecciones bucales graves como es la periodontitis y determinadas enfermedades sistémicas como la DMT2, con sus alteraciones metabólicas como son la obesidad y las dislipidemias (Ship 1999, Sanz, Ceriello et al. 2018). Diversos autores han demostrado que la presencia de DMT2 incrementa la prevalencia, incidencia y severidad de la Periodontitis (Papapanou 1996, Taylor 2001, Mealey and Moritz 2003, Polak and Shapira 2018). La recurrencia de infecciones en diabetes es ocasionada por una alteración de la inmunidad celular y de la función fagocitaria, así como disminución de la vascularización, secundaria a la cronicidad de la hiperglucemia. Las infecciones crónicas, alteran el estado metabólico endócrino del huésped, dificultando el control de los niveles de glucosa en sangre (Rayfield, Ault et al. 1982).

Las infecciones bacterianas producen a su vez, resistencia insulínica que, al estimular la secreción de citocinas como TNF- α e IL -1 β , disminuyen la acción de la insulina sobre los tejidos (Ling, Bistran et al. 1994). Estudios *in-vivo*, administrando IL-1 β en animales de experimentación, han mostrado disminución de glucosa estimulada en la primer fase de liberación de insulina, de los islotes aislados del páncreas (Wang, Goodman et al. 1989). Sin embargo, otros estudios sugieren que TNF- α es el principal responsable de inducir resistencia tisular frente a la insulina y obesidad en DMT2, al suprimir la fosforilación del sustrato 1 del receptor para la insulina IRS-1 (Insulin

receptor sustrate-1) (Kanety, Feinstein et al. 1995), así como ser un potente inhibidor de la actividad tirosin cinasa del receptor insulínico (Hotamisligil and Spiegelman 1994). Algunos estudios han fundamentado también, una estrecha relación entre la sobre producción de citocinas como TNF e IL-1 con complicaciones cardiovasculares y dislipidemias respectivamente, en sujetos con DMT2 (Oda, Tanaka et al. 2007, Chang, Huang et al. 2009).

El inicio de la DMT2 es precedido por una reacción inflamatoria subclínica. La hiperglucemia se considera un estado proinflamatorio, que resulta en el incremento de los niveles de citocinas circulantes, por lo tanto, la hiperglucemia es causal de la activación inmunológica en DMT2 (Clark and Lee 1995). La literatura sugiere que el adecuado control de glucosa en sangre reduce considerablemente el estrés oxidativo, el perfil lipídico, los niveles de citocinas circulantes, y contribuye a la mejora en el tratamiento periodontal (Polak and Shapira 2018, Sanz, Ceriello et al. 2018). Diversos estudios sustentan que el incremento de citocinas en sujetos con DMT2 y el pobre control hiperglucémico, contribuyen a la resistencia insulínica y a la severidad de las enfermedades periodontales dónde, las anormalidades metabólicas ocasionadas por el exacerbado incremento de producción de mediadores de la inflamación (en tejido gingival) como es: TNF- α , IL-1 β , Interleucina 6 (IL-6) y Receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL), contribuyen a las alteraciones metabólicas y severidad de las enfermedades periodontales, atribuido por una parte, a los productos reactivos de la oxidación en tejido periodontal y el constante estado inflamatorio que estimula a las líneas de destrucción de tejidos de soporte del diente (He, Usui et al. 2006, Somm, Cettour-Rose et al. 2006, Atsumi, Cho et al. 2007, Polak and Shapira 2018).

Variaciones genéticas en mediadores de la inflamación en DMT2

A pesar de que la resistencia insulínica parece ser la complicación central en DMT2, la explicación del origen de dicha anormalidad y cómo es que esta lleva a otras complicaciones, aún no ha sido esclarecida. Se conoce que los niveles de marcadores en la respuesta de fase aguda en DMT2, como es el caso de proteína C-reactiva, el cortisol, así como citocinas mediadoras de la respuesta de células del sistema inmune como: TNF- α e IL-6, se encuentran incrementadas en sujetos con DMT2 en comparación con sujetos sin compromiso sistémico (Chang, Huang et al. 2009, Polak and Shapira 2018). Alrededor de 41 genes con 68 variaciones polimórficas han sido estudiadas en sujetos con DMT2 y sus complicaciones, de las cuales, a la población mexicana se les ha asociado alrededor de 20 genes que incluyen: miembro 1 de la subfamilia de transportadores ABCA (ABCA1), receptor adrenérgico beta 3 (ADRB3), Calpaína 10 (CAPN10), Calcio/Calmodulina-dependiente de

proteína cinasa ID (CDC123/CAMK1D), inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A/2B), proteína C reactiva (CRP), proteína de envoltura y motilidad celular 1 (ELMO1), proteína de la obesidad (FTO), gen Homebox (HHEX), Factor de crecimiento insulínico 2 (IGF2BP2), receptor de Insulina sustrato 1 (IRS1), Juxtaposed with another zinc finger protein 1 (JAZF1), gen del síndrome de Jervell (KCNQ1), gen LOC387761, gen neurexofirina (NXPH1), sirtuina 1 (SIRT1), gen transportador de zinc (SLC30A8), factor de transcripción 7 like 2 (TCF7L2), linfotóxina: LTA y TNF- α (García-Chapa, Leal-Ugarte et al. 2017), de dónde únicamente LTA y TNF- α pertenecen a citocinas mediadoras de la inflamación.

A nivel mundial, las variaciones más estudiadas sobre genes de citocinas implicadas en procesos inflamatorios, en DMT2 y sus complicaciones son: Interleucina 1 (IL-1), antagonista del receptor de IL-1 (IL1RA), IL-4, IL-6, IL-10, Interleucina 18 (IL-18) y TNF- α . Estudios sobre aterogénesis en sujetos con DMT2 han demostrado una estrecha relación con variaciones polimórficas de un solo nucleótido (SNP's) en TNF- α , IL-1 β y en Factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1), sin embargo, más estrechamente relacionados con hipertensión y diabetes que con la aterogénesis propiamente (Oda, Tanaka et al. 2007). Un estudio adicional reporta la estrecha relación entre polimorfismos de IL-10 y la alta susceptibilidad para DMT2, aunque sin relación alguna con sus complicaciones (Qi, Rifai et al. 2007). Por otro lado, algunos estudios muestran resultados contradictorios, ya que reportan en poblaciones con DMT2 de Taiwán y Estados Unidos de América, que no se presenta relación con SNP's de TNF- α e IL-6 respectivamente y el riesgo de padecer diabetes (Oda, Tanaka et al. 2007, Chang, Huang et al. 2009).

Estudios que reportan la asociación entre polimorfismos del gen de IL-1 α , IL-1 β y el IL1RA en sujetos con DMT2 y Periodontitis generalizada, han mostrado que no existe una asociación significativa polimórfica, entre sujetos con DMT2 y sujetos sin compromiso sistémico, con periodontitis severa, por lo que, la literatura sugiere la necesidad de evaluar variaciones polimórficas combinadas de otros genes de susceptibilidad para dicha enfermedad sistémica (Kornman and di Giovine 1998, Lopez, Valenzuela et al. 2009, Kornman 2018).

Etiología de las enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son infecciones endógenas mixtas que estimulan respuestas inmunológicas destructivas, causadas por disbiosis de la biopelícula dental, lo cual conduce a la pérdida de los tejidos de soporte del diente (Lang and Lindhe 2015, Papapanou, Sanz et al. 2018). La clasificación más actual las engloba en enfermedades y condiciones periodontales. Considerando primeramente el estado de salud periodontal, seguido de enfermedades y condiciones gingivales.

Del estado de salud periodontal, las enfermedades periodontales inician con gingivitis, dónde nos referimos al cuadro patológico con características clínicas reversibles, resultado de la inflamación gingival causada por la acumulación de microorganismos de placa subgingival, dónde, la respuesta inflamatoria puede resistir varios años sin migración del epitelio de unión ni evidencia de pérdida ósea (Armitage 2004). Posteriormente se desarrollan distintas formas de periodontitis, dónde se presenta destrucción tisular y pérdida ósea en grados variables, dependiendo del ritmo de progresión, pérdida de la inserción del epitelio de unión y bolsas periodontales >3 mm y frecuentemente con presencia de sangrado y/o supuración (Lang and Lindhe 2015). La clasificación más reciente de periodontitis, además, incluye estadios o grados de severidad y complejidad, de acuerdo con los niveles de inserción y tipo pérdida ósea o dental (Caton, Armitage et al. 2018, Papapanou, Sanz et al. 2018).

Cabe mencionar que, de acuerdo con la clasificación de Armitage de 1999 la periodontitis se subdividía en las formas, crónica y agresiva en sus formas localizada y generalizada. En la clasificación actual, se encuentra la forma de periodontitis generalizada si se considera la extensión y distribución de la enfermedad, con criterios de selección similares a los de periodontitis crónica generalizada de la clasificación de 1999. Ambas clasificaciones (1999 y 2018) incluyen formas de periodontitis asociada a manifestaciones y enfermedades sistémicas. La diabetes mellitus, es considerada una enfermedad sistémica “común” dentro de la clasificación del 2018, adicionalmente, la diabetes es considerada un factor de riesgo que modifica el grado de severidad de la periodontitis generalizada (1999, Caton, Armitage et al. 2018, Papapanou, Sanz et al. 2018).

Descripción de la microbiota subgingival

El conjunto de interacciones bacterianas, se da gracias a la formación de una biopelícula adherida a las superficies de la cavidad oral. Una biopelícula, es una formación de agregados bacterianos usualmente existentes como comunidades cercanamente asociadas, que se adhieren a una variedad de superficies naturales o artificiales, en un medio acuoso que contiene una concentración suficiente de nutrientes, para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota (Costerton, Lewandowski et al. 1994). Una de las características más importantes de dichas estructuras es la coagregación bacteriana, en la que se unen especies bacterianas que permanecen organizadas (Foster, Palmer et al. 2003). El que sean altamente organizadas, les permite vivir en una comunidad, en la cual existen especies que producen factores de crecimiento que requieren otras, y así dependen unas de otras para sobrevivir (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and

Haffajee 2005). Las comunidades de la placa dentobacteriana están compuestas por numerosos y variados tipos de bacterias yuxtapuestas en la superficie del diente (Kolenbrander 2000).

Una representación que muestra las asociaciones entre especies bacterianas que colonizan la placa dentobacteriana, es la de los complejos bacterianos de la placa subgingival (**figura 1**) en equilibrio ecológico (**figura 2**) descritas a continuación (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005):

Complejo azul: especies de *Actinomyces* exceptuando *Actinomyces odontolyticus*.

Complejo amarillo: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Complejo morado: *A. odontolyticus* y *Veillonella parvula*.

Complejo verde: *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. a y *Campylobacter concisus*.

Complejo naranja: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus* y *Eubacterium nodatum*.

Complejo rojo: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*.

Especies no-agrupadas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b y *Selenomonas noxia*.

Los dos primeros complejos agrupan especies que colonizan la placa dentobacteriana en etapas tempranas después de una limpieza profesional, y en su mayoría, son consideradas como periodonto “benéficas” o especies compatibles con la salud periodontal (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005). Algunas, como las especies de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*, predominan en la superficie dental y la interacción entre ellas y su sustrato ayuda a estabilizar la biopelícula. Dichas especies son consideradas como compatibles con salud periodontal, debido a que suelen encontrarse en proporciones elevadas en la cavidad bucal en tal estado del periodonto (Kolenbrander 2000).

La primera etapa en la formación de la placa dentobacteriana comprende adsorción de proteínas salivales, principalmente proteínas ácidas ricas en prolina, a las superficies de hidroxiapatita. La colonización primaria se da por bacterias facultativas, principalmente Gram positivas como las de los complejos azul y amarillo, mismas que se adhieren selectivamente a la

superficie dental a través de un mecanismo de adhesión bioquímico proteína-proteína entre las fimbrias de las bacterias y las proteínas salivales (Gibbons, Hay et al. 1990). En la segunda etapa de la formación de dicha biopelícula, se coagregan y multiplican cocos y bacilos tanto Gram positivos como Gram negativos (complejos morado y verde). En la tercera etapa, los receptores superficiales de dichos microorganismos permiten la posterior coagregación de especies predominantemente Gram negativas que tienen poca capacidad para adherirse directamente a la superficie dental, como son *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia* y *Corynebacterium matruchotii*, conocidos como colonizadores puente (algunos miembros del complejo naranja). La heterogeneidad de la placa dentobacteriana aumenta con el tiempo y maduración de esta. Gracias a ello, un mayor número de bacterias anaerobias estrictas Gram negativas tales como *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola* colonizan en estadios tardíos del desarrollo de la placa dentobacteriana, contribuyendo a la patogenicidad de la biopelícula (Lindhe, Karring et al. 1998, Nishihara and Koseki 2004). Los colonizadores tardíos incluyen al complejo rojo, mismo que no presenta interacciones de coagregación significativas con los colonizadores tempranos. Las especies del complejo rojo son periodontopatógenas reconocidas y se han encontrado en mayor proporción y número en zonas de infección y sangrado como son las bolsas periodontales (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005).

Se ha observado que la placa dentobacteriana que se asocia a las enfermedades periodontales está caracterizada por un grupo relativamente definido de patógenos periodontales, los cuales actúan generalmente en combinación sinérgica. Dentro de dichas especies se incluyen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *T. denticola*, entre otras (Haffajee and Socransky 1994).

Recientemente, con técnicas moleculares de hibridaciones por microarreglos y pirosecuenciación de la fracción 16S rDNA, se han descrito grupos o "Taxa" de bacterias no cultivables, estrechamente relacionados con enfermedades periodontales, que incluyen *Treponema* sp. HOT 230, TM7 HOT 437 y 349 (Griffen, Beall et al. 2012), TM7 sp. HOT 346 y 349, *Desulfobulbus* sp. HOT 041, *Treponema* sp. HOT 245, 256 y 508, TM7 sp. HOT 356 y 437, *Synergistetes* sp. HOT 360, 362 y 453, *F. nucleatum*, *Haemophilus* sp. HOT 035 y 036, *Eubacterium* sp. HOT 081, *Megaesphaera* sp. HOT 123, *Acidaminococcaceae* sp. HOT 135, 148 y *Veillonella* sp. HOT 780 (Teles, Teles et al. 2013). Dichas especies no se encuentran agrupadas en ningún complejo bacteriano, sin embargo, se ha considerado que participan en la progresión de las enfermedades periodontales.

Microbiota subgingival en diabetes mellitus tipo 2

Por mucho tiempo se había establecido que la composición de la microflora periodontal de sujetos con DMT2 era similar a la encontrada en sujetos con periodontitis sin compromiso sistémico, esto siempre y cuando el control metabólico de los sujetos diabéticos se mantuviera adecuado (Zambon, Reynolds et al. 1988, Novaes Junior, Gonzalez Gutierrez et al. 1997, D'Aiuto, Gkrantias et al. 2018). Desde 1988 se analizaron aislados de placa dentobacteriana subgingival de sujetos con Periodontitis sin compromiso sistémico y sujetos con DMT2. Ambos grupos mostraron alta prevalencia y proporción de especies como *P. gingivalis* y *P. intermedia* (Zambon, Reynolds et al. 1988). Mientras que pasados estudios no encontraron diferencias significativas al comparar muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos con DMT2 y un adecuado control metabólico en sujetos sin compromiso sistémico (Tervonen and Oliver 1993, Novaes Junior, Gonzalez Gutierrez et al. 1997, Collin, Uusitupa et al. 1998, Yuan, Chang et al. 2001), estudios más recientes continuaron enfatizando la posible participación de patógenos reconocidos como: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y *A. actinomycetemcomitans* como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal en sujetos con DMT2 y pobre control metabólico. A pesar de que son estudios dónde no se han incluido pacientes sanos periodontales para su descripción microbiológica (Li, Liu et al. 2013, D'Aiuto, Gkrantias et al. 2018).

Otros estudios, analizaron la prevalencia de especies periodontopatógenas de placa dentobacteriana subgingival en sujetos con DMT2 y control metabólico variable. La prevalencia más alta obtenida fue para *P. gingivalis* (28%) y *F. nucleatum* (21%). En estos resultados reportaron no haber encontrado relación con el pobre control metabólico y la prevalencia de alguna especie en particular (Tervonen, Oliver et al. 1994). Otro estudio, reportó no haber encontrado diferencias en la detección de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia*, entre sujetos con DMT2 y sujetos no diabéticos con periodontitis generalizada (Collin, Uusitupa et al. 1998). En otro estudio muy similar, se presentó la alta prevalencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *E. corrodens* en sujetos con DMT2 (Yuan, Chang et al. 2001).

Estudios que comienzan a mostrar las primeras diferencias subgingivales entre sujetos no-DMT2 y con DMT2, observan a especies de *Capnocytophaga* tales como: *C. ochracea* y *Capnocytophaga granulosa*, como patógenos predominantes en la placa dentobacteriana subgingival de sujetos con DMT2 (Ciantar, Gilthorpe et al. 2005). Sin embargo, *P. gingivalis* sigue siendo uno de los patógenos predominantes, en una población de adultos Japoneses con enfermedad periodontal y DMT2 (Ojima, Takeda et al. 2005). Otro estudio sobre análisis

microbiológico e inmunológicos de enfermedad periodontal en sujetos Hispanoamericanos con DMT2, reportó que, en general son similares las especies periodontopatógenas encontradas en los sitios con periodontitis de sujetos con y sin DMT2, a pesar de que los sitios con periodontitis de DMT2 resultaron con una alta prevalencia de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *Campylobacter* sp. Lo cual corroboraron con los resultados inmunológicos donde especies de *P. gingivalis* y *C. rectus* se encontraron más prevalentes en placa dentobacteriana subgingival de sujetos con DMT2 y periodontitis (Ebersole, Holt et al. 2008).

Estudios más recientes de secuenciación por clonación y pirosecuenciación de la fracción 16S rDNA, han encontrado frecuencias relativas significativamente mayores en pacientes con DMT2 en clonas totales de *TM7*, *Aggregatibacter*, *Neisseria*, *Gemella*, *Eikenella*, *Selenomonas*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Veillonella* y *Streptococcus* y, bajas frecuencias en los géneros *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Synergistetes*, *Tannerella* y *Treponema*, a diferencia de individuos no diabéticos (Casarin, Barbagallo et al. 2013), así como alta prevalencia de especies como *F. nucleatum*, *V. parvula*, *E. corrodens*, *Veillonella dispar* (Casarin, Barbagallo et al. 2013) y *T. forsythia*, significativamente mayores en sujetos con DMT2 en comparación con no-DMT2, sin embargo, esta última sólo en sitios con enfermedad periodontal (Zhou, Rong et al. 2013). Con dichos resultados, podemos concluir que no hay claridad de un perfil microbiológico específico con el cuál se pueda distinguir a individuos con DMT2, independientemente de su condición sistémica, e inclusive, hasta la actualidad no se ha podido comprobar la disbiosis de la microbiota subgingival relacionada con el pobre control metabólico en sujetos con DMT2, ni un perfil microbiológico específico para dichos individuos (Polak and Shapira 2018, Sanz, Ceriello et al. 2018).

Microbioma oral humano

Los microorganismos que se encuentran en la cavidad oral humana conforman la microflora o microbioma oral humano, refiriéndose a una comunidad ecológica comensal, simbiótica y microorganismos potencialmente patógenos que comparten un espacio corporal. Cada sitio en la cavidad oral humana tiene un perfil microbiano distintivo, que incluye diversos microorganismos, incluyendo aquellos cultivables y no cultivables (Chen, Yu et al. 2010). La cavidad oral, alberga un ecosistema compuesto por más de 700 especies bacterianas que interactúan entre ellas y con el hospedero (Paster, Boches et al. 2001, Chen, Yu et al. 2010). Particularmente, de los 771 grupos o "Taxa" de especies bacterianas identificadas en la base de datos del microbioma oral humano (HOMD), el 30% de estas especies son no cultivables (Escapa, Chen et al. 2018). Adicionalmente,

dentro de esta gran diversidad bacteriana, alrededor de 400 especies se han podido detectar en surco gingival (Chen, Yu et al. 2010). Es probable que el segmento sin cultivar de la microbiota albergue especies patógenas, así como benéficas, sin embargo, cada sitio en la cavidad oral comprende un perfil microbiano distintivo que se ve modificado en relación con el equilibrio ecológico que se mantiene en un estado de salud, así como el encontrado en un estado de enfermedad. Es de destacar, el hecho de que tanto las especies cultivables como no cultivables, se encuentran implicadas en el equilibrio del estado de salud de un individuo, así como en diversos padecimientos e infecciones intraorales tales como gingivitis, periodontitis, infecciones endodóncicas, caries dental y radicular, halitosis y peri-implantitis. Dichas patologías se encuentran estrechamente relacionadas con la descripción de la placa dentobacteriana subgingival, gracias a la formación de la biopelícula dental (Paster, Olsen et al. 2006, Chen, Yu et al. 2010). Tanto en gingivitis como en periodontitis, la etiología principal es el desequilibrio de la microbiota subgingival (Socransky and Haffajee 2005, Teles, Teles et al. 2013); en caries, la biopelícula de la placa dental es la responsable del ambiente acidogénico y del desequilibrio ecológico, favorables para la desmineralización del diente (Struzycka 2014); y en infecciones endodóncicas, las biopelículas formadas desde el conducto pulpar necrótico, hasta el periápice, son las responsables del fracaso de tratamientos y recurrencia de infecciones (Jhajharia, Parolia et al. 2015); la relevancia de estudiar perfiles microbiológicos de biopelículas dentales tanto para condiciones de salud como de distintas patologías, buscan la descripción de la microbiota, para que en un futuro, se puedan proporcionar tratamientos más adecuados para dichas infecciones, y no sólo de un pequeño grupo de especies relacionadas con la patología, sino del mayor número de especies posibles identificar dentro de cada técnica de identificación molecular (Marsh 2006, Duran-Pinedo, Chen et al. 2014).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La calidad de los procesos inflamatorios se encuentra mediada por factores genéticos, lo cual resulta con diferencias en la predisposición y susceptibilidad a enfermedades, tales como la periodontitis y la DMT2 de manera individual. Las variaciones genéticas como son las polimórficas para determinadas citocinas mediadoras de la inflamación, han sido ampliamente estudiadas para diferentes poblaciones con periodontitis a nivel mundial (Chen, Zhang et al. 2016, Kornman 2018). Asimismo, se han estudiado variaciones polimórficas de diversos genes de citocinas para poblaciones de sujetos mexicanos mestizos e indígenas (Caffesse, De LaRosa et al. 2002, Pérez-Soria, García-Lee et al. 2008), e inclusive con un posible marcador genético para periodontitis agresiva (García-Lee 2009), no así, para poblaciones con DMT2 y periodontitis, dónde, es poca la información sobre la asociación entre variaciones polimórficas de genes de citocinas mediadoras de la inflamación. Estudios sobre variaciones polimórficas de citocinas en DMT2, han determinado que dichas variaciones pueden ser una herramienta que determinen factores de alto riesgo para procesos inflamatorios como es en la DMT2, esto siempre y cuando, sean evaluados de manera conjunta en forma de haplotipos (Takashiba and Naruishi 2006, Banerjee and Saxena 2014). A pesar de ello, no hay estudios de sujetos con DMT2 y periodontitis que corroboren una relación evidente en la población mexicana.

Por otro lado, la severidad de las enfermedades periodontales, a pesar de tener factores de susceptibilidad endógena y ambiental, va a tener características particulares reflejadas en la microbiota subgingival de cada individuo, referente a su etiología. Particularmente la diabetes mellitus, es reconocida una enfermedad sistémica común y por lo tanto, un factor de riesgo para el desarrollo de su severidad. Es de suma importancia describir el perfil microbiológico subgingival que caracterice a sujetos con DMT2 y distintas condiciones periodontales y sistémicas, ya que, en la mayoría de la literatura, la microbiota relacionada con diabetes, se ha estudiado en condiciones de periodontitis y en muy pocos estudios en salud periodontal, considerando factores metabólicos que alteren la microbiota como son el pobre control metabólico, dislipidemias, obesidad y predisposición genética.

OBJETIVOS

General

Determinar la asociación entre haplotipos polimórficos para genes de 12 citocinas moduladoras de la inflamación, por medio de genotipificación y/o secuenciación, en grupos de sujetos no diabéticos y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), cada grupo con individuos sanos periodontales (SP) y con periodontitis generalizada (PG), y describir el perfil microbiológico subgingival de sujetos con misma condición sistémica y periodontal, por medio de dos técnicas de identificación molecular.

Particulares

- Describir las características clínicas generales y periodontales del total de los sujetos de estudio (N=189), por medio de clínicos calibrados para estudios de investigación periodontal, con la finalidad de agruparlos en sujetos no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$), para posteriormente realizar la selección de sujetos con salud periodontal y con periodontitis generalizada: SP no-DMT2 $n=63$, PG no-DMT2 $n=62$, SP DMT2 $n=13$, y PG DMT2 $n=39$, y describir las características clínicas, periodontales y tipos de obesidad, además en sujetos con DMT2, hemoglobina glucosilada (HGA1c), perfil lipídico y variables propias de diabetes y su correlación con las características clínicas periodontales.
- Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de 12 variaciones polimórficas de citocinas mediadoras de la inflamación: IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C, IL1RN:c.215-516(2_6), IL6:c.-237C>G, IL8:c.-352A>T, IL10:c.-627T>G, IL-10:c.-854T<C, IL10:c.-1116a>G, IL2B:c.*159A>C, TNF:c.-488G>A, LTA:c.-10+90A>G, de la población total de estudio (N=189), en grupos de sujetos sistémicamente sanos: no-DMT2 $n=118$, y con DMT2 $n=71$, por medio de técnica de genotipificación y/o secuenciación.
- Determinar las asociaciones entre haplotipos polimórficos de las 12 variaciones polimórficas de citocinas mediadoras de la inflamación, en grupos de sujetos sistémicamente sanos: no-DMT2 $n=118$, y con DMT2 $n=71$, por medio de un modelo aditivo de agrupación, para variaciones genéticas y análisis de correlación múltiple y posteriormente, determinar la asociación de los sujetos con condición de salud periodontal y periodontitis generalizada positivos para el marcador de riesgo de DMT2.

- Describir los perfiles microbiológicos subgingivales de los grupos de estudio: no diabéticos ($n=118$) y diabéticos ($n=71$) y posterior a su selección, de sujetos con salud periodontal y con periodontitis generalizada: SP no-DMT2 $n=63$, PG no-DMT2 $n=62$, SP DMT2 $n=13$, y PG DMT2 $n=39$, por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA, y presentar análisis de correlación múltiple para grupos de sujetos con misma condición sistémica (no-DMT2 vs. DMT2, SP y PG) y con misma condición periodontal (SP vs. PG, no-DMT2 y DMT2).
- De los sujetos con diabetes mellitus tipo 2, con condiciones de salud periodontal y periodontitis generalizada (SP DMT2 $n=13$ y PG DMT2 $n=39$) separarlos en grupos de sujetos con distintos niveles de hemoglobina glucosilada en: HGA1c $\leq 8\%$ y $>8\%$ y analizar la correlación de los distintos parámetros de bioquímica sanguínea con las características clínicas periodontales y el perfil microbiológico.
- Realizar análisis de comparación entre las variables de los grupos de diabetes con condiciones de salud periodontal y periodontitis generalizada (SP DMT2 $n=13$ y PG DMT2 $n=39$) y el perfil microbiológico por técnica de Checkerboard por medio de pruebas de coeficiente correlación.
- Describir la microbiota de placa dentobacteriana subgingival de 41 sitios mesio-vestibulares o disto-vestibulares, sanos periodontales (NI >2 mm): $n=25$ y con Periodontitis (NI <5 mm): $n=16$, de 27 sujetos con diabetes mellitus tipo 2, con condiciones de salud periodontal y periodontitis generalizada (SP DMT2 $n=13$ y PG DMT2 $n=14$), por medio de la técnica de Identificación por Microarreglos del Microbioma Oral Humano (HOMIM), y determinar niveles promedio (de las frecuencias relativas 1-5) de señales positivas en HOMIM, además de la correlación de la frecuencia relativa de cada especie, con los parámetros clínicos periodontales evaluados: niveles de inserción, profundidad de bolsa, sangrado al sondeo y supuración.

HIPÓTESIS

Se podrá determinar la asociación entre haplotipos polimórficos, para genes de 12 citocinas moduladoras de la inflamación, mediante un modelo aditivo de agrupación, para variaciones genéticas que indique el índice de riesgo para DMT2 y periodontitis generalizada en los sujetos de estudio y se describirá el perfil microbiológico subgingival de sujetos con misma condición sistémica y periodontal, por medio de dos técnicas de identificación molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio de tipo transversal y de casos y controles, en un total de 189 sujetos de estudio que fueron evaluados por medio de una historia clínica con fines de investigación (**anexo 1**), dónde se registraron los datos clínicos generales y se recolectaron datos clínicos periodontales, para poder realizar una posterior clasificación de sujetos sanos periodontales y con periodontitis generalizada. Se recolectó de cada sujeto de estudio muestras de: células epiteliales para la evaluación genética, muestras de placa dentobacteriana subgingival para el análisis microbiológico y muestras de sangre periférica para análisis de bioquímica sanguínea.

El propósito y naturaleza del estudio, incluyendo el tipo y procedimientos específicos para el registro de mediciones clínicas y recolección de muestras, fueron explicados a cada sujeto potencial de estudio. Los sujetos recibieron copia de la forma de consentimiento informado en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio **anexo 1**. Se pidió a los sujetos que firmaran dicha forma, con lo cual establecieron su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar.

Estudio aprobado por el comité de Ética de la División de Estudios de Posgrado (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), de dónde provinieron los sujetos no diabéticos, de individuos que se reciben por primera vez para su atención dental. Los sujetos con DMT2, provinieron de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, de la Clínica de promoción para la prevención, detección y atención integral al paciente diabético, municipio Santiago de Anaya Hidalgo, México.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el diagrama de la **figura 3** se describe el diseño y la agrupación de la población de estudio. La población consistió en un total de 189 sujetos agrupados en: no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$) (criterios de selección especificados en la **tabla 1**), de quienes se evaluaron genes de 12 citocinas moduladoras de la inflamación, por medio de genotipificación y/o secuenciación y de quienes se realizó un análisis microbiológico exploratorio por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA (**figura 3**).

Posteriormente se seleccionaron sujetos de estudio de acuerdo con la clasificación de salud periodontal y periodontitis generalizada (considerando la extensión y distribución) (Caton, Armitage et al. 2018), restando un total de 177 sujetos ordenados en 4 grupos: SP no-DMT2 $n=63$, PG no-

DMT2 $n=62$, SP DMT2 $n=13$, y PG DMT2 $n=39$. Los sujetos que no clasificaron (NC $n=12$) para ninguna de las anteriores clasificaciones, y los sujetos fumadores se descartaron para el posterior análisis microbiológico. Los 4 grupos de estudio fueron analizados microbiológicamente por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA y se presentó análisis de comparaciones múltiples para grupos de sujetos con misma condición sistémica (no-DMT2 vs. DMT2, SP y PG) y con misma condición periodontal (SP vs. PG, no-DMT2 y DMT2) (**figura 3**).

Se seleccionaron adicionalmente 27 sujetos de estudio con DMT2 (SP $n=13$ y PG $n=14$), para describir la microbiota de placa dentobacteriana subgingival de 41 sitios mesio-vestibulares o disto-vestibulares, sanos periodontales (NI >2 mm): $n=25$ y con Periodontitis (NI <5 mm): $n=16$, por medio de la técnica de Identificación por Microarreglos del Microbioma Oral Humano (HOMIM), y determinar niveles promedio (de las frecuencias relativas 1-5) de señales positivas en HOMIM. Así mismo, a los sujetos con DMT2 se les evaluaron muestras de bioquímica sanguínea para determinar los niveles séricos de glucosa en sangre (para su inclusión), hemoglobina glicosilada (HGA1c) y el perfil lipídico de: lípidos totales (LT), triglicéridos totales (TT) colesterol totales (CT), lípidos de baja y alta densidad (LDL y HDL) (**figura 3**).

Los sujetos fueron evaluados por clínicos calibrados en cursos con alcance de las Normas ISO:9001:2008 y 2015 en el Laboratorio certificado de Genética Molecular, de la DEPeI, UNAM, para la toma de muestras y recolección de datos clínicos microbiológicos y periodontales, con valores aceptables dentro de los siguientes criterios: medidas con variabilidad baja (89.9-71%), variabilidad alta (11.0-29.9%), variabilidad promedio (0.11-0.29%) y reproducibilidad promedio (89.9-71.0%) en sondaje periodontal de profundidad de bolsa y niveles de inserción promediando doble sondaje periodontal del mismo examinador en un mismo paciente (**ver anexo 2**).

Criterios de selección

Los criterios de selección de los sujetos de estudio se describen en la **tabla 1**. Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron mexicanos por nacimiento con ascendencia de padres y por lo menos dos abuelos mexicanos. Además, todos los sujetos fueron individuos mayores de 25 años, en buen estado de salud general y presentaron por lo menos 20 dientes naturales en boca. Los criterios de selección para los sujetos sanos periodontales es que contaran con ≤ 4 sitios con niveles de inserción $\div 3-4$ mm y ningún sitio con niveles de inserción ≥ 5 mm. Para los sujetos clasificados con periodontitis generalizada, es que contaran con ≥ 8 sitios con niveles de inserción ≥ 5 mm y $\geq 30\%$ de sitios con niveles de inserción ≥ 5 mm. Para la clasificación no se consideró estadios o grados de

complejidad y severidad, únicamente extensión y distribución de la clasificación más actual (Caton, Armitage et al. 2018).

Los criterios de exclusión comprendieron a todas aquellas mujeres que presentaran embarazo o lactancia, aquellos posibles participantes que hubieran tomado cualquier clase de antimicrobiano sistémico en los tres meses previos a su evaluación para el estudio, y que presentaran condiciones sistémicas, que pudieran influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal tales como, VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades intestinales y enfermedades autoinmunes. Para los sujetos no diabéticos con glucosa en ayuno mínimo de 10H <100mg/dl. Los sujetos con DMT2 fueron diagnosticados con por lo menos un año previo a la inclusión del estudio, mediante glucosa en ayuno mínimo de 10H <126mg/dl y mediante niveles de Hemoglobina glucosilada (HGA1c) \geq 6.5%. Ningún sujeto con DMT2 era insulino-dependiente o lo fue alguna vez. Ningún sujeto con concentraciones de glucosa superiores a 200mg/dl al momento de la evaluación clínica fue considerado para el estudio, ver **tabla 1**.

EVALUACIÓN CLÍNICA

De cada sujeto se llenó una historia clínica médica que incluyó: edad, género, estatura, peso, presión sanguínea y su estado de fumador. Los sujetos fueron clasificados por su Índice de Masa Corporal (kg-peso/m²_estatura) en: sobrepeso (IMC: 25.0-29.9%); obesidad I (IMC: 30.0-34.9%); obesidad II (IMC: 35.0-39.9%) y obesidad III (IMC: \geq 40.0%). Se preguntó antibioticoterapia reciente y específicamente para los sujetos con DMT2: tiempo desde su diagnóstico y reciente tratamiento bajo hipoglucemiantes.

Todas las mediciones clínicas fueron tomadas de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura (Haffajee, Socransky et al. 1983), en una sola visita y registradas de 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes en la boca de cada sujeto de estudio excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios por sujeto dependiendo del número de dientes faltantes) Los parámetros clínicos fueron recopilados por sitio y en el siguiente orden:

1. Acumulación de placa (AP: ausencia 0/ presencia 1)
2. Enrojecimiento gingival (EG: ausencia 0/ presencia 1)
3. Profundidad de bolsa (PB: mm)
4. Nivel de inserción (NI: mm)
5. Sangrado al sondeo (SS: ausencia 0/ presencia 1)
6. Supuración al sondeo (SUP: ausencia 0/ presencia 1)

La profundidad de bolsa y el nivel de inserción se registraron al mm más cercano utilizando una sonda periodontal “Carolina del Norte” (UNC) de 15mm de longitud con marcas en intervalos de 1mm y marcas distintivas en los intervalos de 5mm (Hu-Friedy, Chicago, IL). Estas medidas fueron registradas dos veces por el mismo clínico y el promedio de las dos mediciones se utilizó para el análisis de datos de acuerdo con la literatura (Haffajee, Socransky et al. 1983). Los parámetros clínicos de acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración se evaluaron en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) o ausencia (0) (**tablas 2 y 3**). La acumulación de placa se evaluó sin revelador, con la punta de la sonda, calificando únicamente la placa supragingival presente por sitio. El enrojecimiento gingival se consideró del margen gingival considerando si el área interproximal se encontraba inflamada, la valoración positiva de presencia la calificó el clínico evaluador con la comparación de los sitios sanos y no inflamados para su comparación. El sangrado al sondeo y la supuración se evaluaron al tiempo del sondeo, considerando presencia positiva por cuadrante (Haffajee, Socransky et al. 1983, Armitage 2004).

Recolección de muestras

Para el análisis genético se obtuvieron las muestras de DNA de dos fuentes: la primera fue a partir de un banco de sujetos de estudio a los cuales se recolectaron 3 mL de sangre periférica total en un tubo vacutainer de 6 mL que contenía 0.4 mL de solución de citrato ácido de dextrosa (ACD); y la segunda fue a partir de muestras epiteliales de mucosa bucal, obtenidas de pacientes de recién ingreso al estudio por medio de tarjetas MiniCard FTA®.

Para el análisis microbiológico por Checkerboard, se aisló y secó con rollos de algodón el área oral de muestreo. Se retiró la placa supragingival con cureta Gracey (Hu-Friedy) para la toma de las muestras de placa subgingival, por medio de curetas Gracey estériles, de sitios mesio-vestibulares de un máximo de 28 dientes por individuo y colocadas en tubos para microcentrifugación de 1.5mL con 100µl de amortiguador TE pH 7.6 (10mM_Trís-HCl, 1mM_EDTA, pH 7.6), dispersadas y mezcladas con 100µl de 0.5M_NaOH. Además, se recolectaron muestras de sitios mesio/disto-vestibulares con la misma metodología para el análisis microbiológico por Microarreglos del Microbioma Oral Humano.

Se recolectaron 5mL de sangre periférica sólo de los sujetos con DMT2 con ayuno mínimo de 10h. La sangre fue recolectada en tubos Vacutainer con heparina sódica (Becton, Dickinson y Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Los tubos fueron manipulados por inversión y procesados para determinar

la bioquímica sanguínea que incluyó niveles en suero de HGA1c y perfil lipídico completo con: niveles de lípidos totales (LT), triglicéridos séricos totales (TT), colesterol sérico total (CT), lípidos de baja densidad (LDL: Low density lipids), lípidos de alta densidad (HDL: High density lipids) e índice aterogénico periférico (LDL/HDL).

EVALUACIÓN GENÉTICA

Se evaluaron las frecuencias alélicas y genotípicas de 12 variaciones polimórficas de citocinas mediadoras de la inflamación: IL1A:c.-949C<T, IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C, IL1RN:c.215-516(2_6), IL6:c.-237C>G, IL8:c.-352A>T, IL10:c.-627T>G, IL-10:c.-854T<C, IL10:c.-1116a>G, IL2B:c.*159A>C, TNF:c.-488G>A, LTA:c.-10+90A>G. En las **tablas 2a y 2b** se describen a detalle las variaciones, se señala la nomenclatura actual con sus especificaciones respectivas en la base del National Center for Biotechnology Information, NCBI por sus siglas en inglés. Cada una de las variaciones tienen un código de identificación (ID) para poder rastrearlas en el NCBI, un símbolo para localizarlas, un nombre oficial y universal, la posición cromosómica correspondiente y datos de posición de inicio, de fin y del codón de inicio, que son de utilizad para identificarlas por medios moleculares. Dichas variaciones pueden encontrarse con distintos sinónimos en la literatura, además de la clase de variación polimórfica (de tipo SNP o VNTR) en la que se clasifica cada una y si son consideradas de tipo codificante o no-codificante en el genoma. Datos importantes que deben considerarse de dichas variaciones son: el alelo que presenta, es decir el nucleótido “raro” o cambiante, y por lo tanto el alelo que es considerado ancestral. Este último dato es relevante ya que dependiendo de la población en la que se localiza cada una de las frecuencias alélicas, relacionadas con patologías en particular, es posible que las abundancias favorezcan al alelo ancestral y no al alelo cambiante. Las técnicas que se utilizaron para poder realizar la genotipificación y/o secuenciación se describen en la **anexo 3**.

Purificación de muestras de DNA de sangre para la evaluación genética

Una alícuota de 200 µl fue procesada inmediatamente para la extracción y purificación de DNA genómico, el resto de la sangre fue almacenada en crioviales a -80°C. La extracción y purificación de DNA se realizó utilizando el kit QIAamp™ DNA Blood Mini (Quiagen 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 un espectofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). El resto de la muestra de DNA fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento para la identificación de las variaciones genéticas.

Purificación de DNA de células epiteliales para la evaluación genética

Las muestras de células epiteliales fueron tomadas con un hisopo aplicador estéril (WHATMAN®) y transferidas a una tarjeta MiniCard FTA® (Purification reagent WHATMAN®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra se dejó secar durante al menos una hora. Se obtuvieron discos de 2mm de diámetro utilizando un Uni-Core punch estéril (WHATMAN®). Cada disco fue colocado individualmente en un tubo para PCR de 0.2 mL. Se agregó 200 µl de reactivo de purificación FTA® (WHATMAN®) a cada tubo para el procesado, 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 reacciones individuales de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando los métodos que se describen en el **anexo 3**. Las reacciones de PCR se realizaron 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). Las reacciones consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 4min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento de primers durante 1 min a las temperaturas que se indican en el **anexo 3**, y extensión a 72°C durante 1 min, después de lo cual se realizó una extensión final a 72°C durante 10 min. Todos los primers fueron diseñados 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 posibles genotipos de cada variación, y un control negativo sin template 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), corridos 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 min 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).

La secuenciación de los fragmentos fue realizada en los laboratorios de QIAGEN Genomic Services (Sequencing services, QIAGEN Str. 1, Hilden, Alemania) y los electroferogramas fueron analizados utilizando el programa Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia).

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Recolección y procesamiento de muestras para checkerboard

Las evaluaciones microbiológicas mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky, Smith et al. 1994) se realizaron con la recolección de 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival de los sitios mesiobucales de todos los dientes excluyendo los terceros molares, de todos los sujetos de estudio (**ver figura 3**).

Después de secar y aislar el área de muestreo con rollos de algodón, la placa supragingival fue eliminada con una cureta Gracey (Hu-Friedy). Las muestras de placa subgingival se tomaron utilizando curetas Gracey estériles y colocadas en tubos para microcentrifugación de 1.5 mL que contenían 100µl de buffer TE pH 7.6 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Se agregaron 100µl de NaOH (0.5 M, Sigma) a cada tubo y las muestras fueron dispersadas. Los tubos fueron hervidos durante 10min. y el pH neutralizado con 800µl de acetato de amonio (5M, Sigma). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un Minislot-30, concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron en mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas.

El empleo de la técnica de “checkerboard” permitió la identificación de 40 especies bacterianas (**tabla 3**) en cada una de las muestras de placa dentobacteriana de cada sujeto de estudio en un mismo experimento. Asimismo, fue posible cuantificar de los niveles (cuentas bacterianas x 10^5), proporción (porcentaje del total de las cuentas de las sondas DNA) y prevalencia (porcentaje de sitios colonizados), de cada una de las 40 cepas de referencia empeladas para la elaboración de sondas de DNA (**tabla 3**).

Los datos microbiológicos obtenidos de cada sujeto de estudio incluyeron 3 matrices de datos (niveles, prevalencia y proporción), cada una con un total de 1,120 posibles puntos de información (40 sondas de DNA x 28 muestras) (**figura 4**).

Especies bacterianas y condiciones de cultivo

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA comprende especies bacterianas representativas de cada complejo bacteriano (Socransky and Haffajee 2005) se encuentra en la **tabla 3**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del ATCC (American Type Culture Collection). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido (17g - *Mycoplasma* agar base, 5 mL - solución stock de Hemina, 500 mL - agua destilada UV/UF, 5 mL - vitamina K, 25 mL - sangre de carnero desfibrinada) a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente en agar base sin enriquecimiento). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *Campylobacter* sp.: agar enriquecido suplementado en la superficie con 0.5 mL de formato (60 mg/ mL) - fumarato (60 mg/ mL); *T. denticola*: caldo para *Mycoplasma* suplementado con glucosa (1 mg/ mL), niacinamida (400µg/ mL), tetrahidrocloreto de esparmina (150µg/ mL), isobutirato de sodio (20µg/ mL), L-cisteína (1 mg/ mL), pirofosfato de tiamina (5µg/ mL) y suero bovino (0.5%).

Purificación de DNA y preparación de sondas

El crecimiento después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 mL que contenían 1 mL de buffer TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación a 3,500 rpm en buffer TE durante 10min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 seg. y lisadas a 37°C durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ mL, Sigma) para las especies Gram negativas, o con una mezcla enzimática que contenía 15 mg/ mL de lisozima (Sigma) y 5 mg/ mL de Achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 8.0) para las especies Gram positivas. El DNA fue aislado y purificado utilizando una técnica estándar previamente descrita (Smith, Socransky et al. 1989).

La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260nm y 280nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 40 especies bacterianas (**tabla 3**) mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1 µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita (Feinberg and Vogelstein 1983).

Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25 mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5 mg/ mL de RNA de levadura (Roche). La membrana con DNA fijado de las cepas aisladas fue colocada en un Miniblotter-45 (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación con los canales de hibridación. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45 (**figura 4**). Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20 ng/ mL en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2 mg/ mL de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas una noche a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detectaran un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20min, cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

Detección y cuantificación de microorganismos

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en buffer bloqueador que contiene 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Merck-Roche) utilizando la modificación previamente descrita (Engler-Blum, Meier et al. 1993).

Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star®) a 37°C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35min. Las películas fueron reveladas siguiendo el procedimiento estándar y posteriormente fueron fotografiadas con cámara Digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Con ayuda de un sistema digital de fotodocumentación (DigiDoc. BioRad (CE)) se enviaron a un programa (Quantity One. BioRad (CE)), en el cual se detectaron y analizaron las señales obtenidas en los checkerboards (**figura 4**).

Recolección y procesamiento de muestras para HOMIM

Las muestras de placa dentobacteriana subgingival para el análisis microbiológico por medio de la técnica de Identificación por Microarreglos del Microbioma Oral Humano, provinieron sitios mesio-vestibulares o disto-vestibulares, sanos periodontales (NI>2mm): $n=25$ y con Periodontitis (NI<5mm): $n=16$, de sujetos con diabetes mellitus tipo 2, con condiciones de salud periodontal y periodontitis generalizada (SP DMT2 $n=13$ y PG DMT2 $n=14$) (**ver figura 3**).

Se evaluaron 41 muestras de placa subgingival de 27 sujetos seleccionados para determinar frecuencias relativas de hasta 379 sondas impresas en microarreglos a base de oligonucleótidos de la fracción 16S rDNA, diseñados con la extensión de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA. para distintos “Taxa” de especies bacterianas cultivables y no cultivables de la cavidad oral, por medio de la técnica de Identificación por Microarreglos del Microbioma Oral Humano.

Purificación de DNA y procesamiento de muestras para HOMIM

Las muestras fueron recolectadas en 150 μ l de buffer TE (Epicentre[®]) y congeladas a -20°C hasta su purificación por medio de la metodología extracción de DNA modificada (Instituto Forsyth Cambridge, MA), con el kit MasterPure™ (Epicentre[®]). Las muestras fueron desecadas y enviadas al Instituto Forsyth para su posterior procesamiento.

La técnica de HOMIM consistió en la “captura-inversa” de sondas de oligonucleótidos de rDNA (entre 18-20pb) sintetizadas en la Universidad del Estado de Michigan con el equipo GeneMachinesOmniGrid Arrayer, elaboradas con la adición de un amino terminal en (C6) 5’ del oligonucleótido y cinco Timidinas espaciadoras, lo cual le permitió hibridizar un oligonucleótido teñido con gran afinidad. Las sondas fueron impresas en las laminillas de cristal recubiertas con aldehído (Schott-Nexterion Slides AL).

Los genes correspondientes a la fracción 16S rDNA fueron amplificados del DNA purificado de las muestras microbiológicas a evaluar, con PCR múltiplex utilizando un primer de inicio y dos de fin “universales” para la fracción 16SRNA. Se requirió de 2 μ l de DNA genómico, previamente purificado de la muestra original MasterPure™ (Epicentre[®]), para posteriormente realizar dos rondas de amplificación. El primer PCR se realizó con el fin de asegurarse que se tenían las amplificaciones deseadas, se corrió un gel de agarosa al 1%. El producto final del PCR#1 fue sometido a una primera purificación con QIAquick PCR Purification Kit.

Las muestras fueron teñidas en un segundo PCR con Cy3-dCTP (Cyanine-dye labeled nucleotide triphosphates). Los productos teñidos se purifican utilizando QIAGEN Supplementary

Protocol para fragmentos previamente teñidos. Los amplicones fueron hibridizados con las sondas impresas en laminillas de cristal (Paster and Dewhirst 2009).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

PARÁMETROS CLÍNICOS Y PERIODONTALES

Del total de los sujetos de estudio (N=189), agrupados en sujetos no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$), se realizó un análisis estadístico descriptivo de los parámetros generales: edad, género, estatura, peso, porcentaje de grasa corporal y fumadores actuales, así como de los parámetros clínicos periodontales tales como: número de dientes faltantes, profundidad de bolsa promedio (mm), niveles de inserción promedio (mm), número de dientes con niveles de inserción con ≥ 5 mm, porcentajes de sitios con acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración, los cuales se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM) y rango. Los datos clínicos fueron comparados entre grupos de no-DMT2 y DMT2 utilizando la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney (**tabla 4**).

Posteriormente se seleccionaron sujetos de estudio de acuerdo con la clasificación de salud periodontal y periodontitis generalizada (considerando extensión y distribución) (Caton, Armitage et al. 2018), restando un total de 177 sujetos, mismos que fueron ordenados en 4 grupos: SP no-DMT2 $n=63$, PG no-DMT2 $n=62$, SP DMT2 $n=13$, y PG DMT2 $n=39$. Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los parámetros generales: edad, género, Índice de Masa Corporal, porcentaje de peso IMC:25.0-29.9% y porcentaje de Obesidad (IMC: ≥ 30). Para los dos grupos con DMT2 se describió, además, el tiempo desde su diagnóstico, reciente tratamiento farmacológico para DMT2 (hipoglucemiantes), los niveles en suero de HGA1c y perfil lipídico completo con: niveles de lípidos totales, triglicéridos séricos totales, colesterol sérico total, lípidos de baja densidad, lípidos de alta densidad e índice aterogénico periférico. Se realizó análisis de Kruskal Wallis para la comparación entre grupos de no diabetes y DMT2 y entre grupos de salud periodontal y periodontitis generalizada. Para las comparaciones de las variables de los grupos de diabetes (SP DMT2 y PG DMT2), contra las variables clínicas y periodontales y microbiológicas, se utilizó la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney, prueba de coeficiente correlación (CC) y Rho de Spearman (**tabla 5**).

Los sujetos que no clasificaron por no entrar en ninguno de los criterios para SP o PG (tabla 1), además de los sujetos fumadores, fueron descartados para la descripción clínica presentada en la **tabla 5**.

ANÁLISIS GENÉTICOS

Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las 12 variaciones genéticas evaluadas, fueron calculadas para la población total de estudio (N=189) dividida por grupos de sujetos no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$). Mediante conteos directos se determinaron las frecuencias de las variaciones de genotipos y alelos individuales. La proporción (%) de portadores para cada alelo y genotipo en cada grupo de estudio, fue calculada dividiendo la frecuencia ($i=$) entre el número de sujetos ($n=$) incluidos en cada grupo ($i=/n=$). Todas las variaciones genéticas positivas para la población fueron de tipo Single Nucleotide Polimorfism (SNP), por lo que los sujetos tuvieron la posibilidades de presentar únicamente dos alelos (ejemplo: A y T); de ahí que, la posibilidad de genotipos en todos los casos fue de 3 para cada variación (A/A: homocigoto para el alelo A “ancestral”; A/T: heterocigoto; y T/T: homocigoto para el alelo T “cambiante”).

Se calcularon las diferencias en % de portadores de cada alelo y genotipo individual entre el grupo experimental (DMT2) y el grupo control (no-DMT2), lo cual llamamos la diferencia máxima. Así mismo, se evaluó la habilidad de cada alelo y genotipo individual para marcar los grupos experimentales en las comparaciones de los dos grupos de estudio, mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad, exactitud, índice de falsos positivos, índice de falsos negativos, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. La sensibilidad se consideró como proporción de portadores del alelo o genotipo en cuestión al grupo experimental (% de verdaderos positivos, ($i=1$ exp)) y fue calculada como: ($i=1$ exp) / $n=exp$. La especificidad representó la proporción de no-portadores en el grupo control (% de verdaderos negativos). La exactitud fue calculada como: ($i=exp$) + ($i=0$ con) / $n=exp$ + $n=con$. Los índices de falsos positivos y negativos se definieron 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, ($i=con$)). Los valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron calculados como: ($i=1$ exp)/($n=1$ exp + $i=1$ con) y ($i=0$ exp)/($n=0$ exp + $i=1$ con) respectivamente (García-Lee 2009).

La significancia de las diferencias en la frecuencia de portadores de cada alelo individual y genotipo entre grupos de no-DMT2 y DMT2, se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (**figuras 5a y 5b**) y se buscaron asociaciones de alelos y genotipos individuales con cada grupo, utilizando prueba exacta de Fisher. Se estimó el índice del riesgo relativo mediante la prueba

Mantel-Haenszel y las probabilidades de riesgo por Razón de Momios del % de portadores de las variaciones, utilizando intervalos de confianza al 95% (**tablas 6a y 6b**).

De los resultados obtenidos, se realizó la selección de aquellos genotipos y/o alelos individuales que presentaran significancia con la prueba U de Mann-Whitney $p < 0.05$, Razón de Momios > 1.5 , exactitud > 0.5 , e índice de falsos negativos < 0.5 . La selección de los genotipos y alelos individuales se realizó con el objetivo de descartar aquellos que no mostraran relevancia como marcadores de grupos de estudio específicos, ni en cuanto a su papel en la susceptibilidad o riesgo a las enfermedades periodontales estudiadas. Esto con la finalidad de elevar la eficiencia de los análisis que se llevaron a cabo en las siguientes fases de selección. De la selección de los alelos y genotipos individuales, se generaron variables que identificaran a los portadores de las combinaciones de 2, 3, 4, 5 y 6 genotipos y/o alelos individuales, de quienes se presentó la frecuencia, la proporción de los portadores, la diferencia máxima entre grupos, así como la exactitud e índice de falsos negativos (**tabla 7**).

Generaciones de haplotipos

Las variables generadas fueron de tres tipos, alélicas: combinaciones que incluyeron en su composición únicamente a los alelos seleccionados, genotípicas: combinaciones que incluyeron en su composición únicamente a los genotipos seleccionados y, alélicas/genotípicas: combinaciones que incluyeron en su composición tanto a los alelos como a los genotipos seleccionados.

Para las 57 combinaciones de 2, 3, 4, 5 y 6 de genotipos y/o alelos individuales, surgieron generaciones de haplotipos de las cuales se determinó las frecuencias de portadores. Se calculó tanto la frecuencia como la proporción de portadores de haplotipos y la diferencia máxima entre los grupos de estudio de no diabetes (no-DMT2 $n=118$) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$). Se evaluó la habilidad de cada haplotipo para marcar al grupo experimental (DMT2) con la diferencia máxima entre grupos, sensibilidad, exactitud e índice de falsos negativos. La significancia de las diferencias en la frecuencia de portadores de cada generación de haplotipos, entre grupos de no-DMT2 y DMT2, se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney y se buscaron asociaciones de las posibles combinaciones con cada grupo, utilizando prueba exacta de Fisher. Se estimó el índice del riesgo relativo mediante la prueba Mantel-Haenszel y las probabilidades de riesgo por Razón de Momios del % de portadores de las variaciones, utilizando intervalos de confianza al 95% (**figura 5**).

Basados en los análisis estadísticos anteriores, se realizó una selección de haplotipos en 2 fases. En la primera fase de selección, se consideraron combinaciones que cumplieran con cada uno de los siguientes criterios: porcentaje de portadores <25%, diferencia máxima >30, prueba U de Mann-Whitney $p < 0.05$, Razón de Momios >4, exactitud >0.65 e índice de falsos negativos <0.5. En la segunda fase de selección, se llevó a cabo una discriminación de combinaciones basados en las redundancias de alelos y genotipos individuales dentro de los haplotipos. Se consideraron únicamente 5 combinaciones no redundantes conformadas por el mayor número de alelos y genotipos individuales (**figura 6**).

Modelo aditivo

Los 5 haplotipos seleccionados fueron tomados como una plantilla de opciones (perfil genético) que fueron consideradas dentro de un modelo aditivo, mediante un modelo aplicado con anterioridad (García-Lee 2009), para analizar la información genética, que permitió identificar las combinaciones de (haplotipos) de alelos y genotipos individuales de diferentes variaciones que pudiera asociarse y separar a los grupos de estudio. Dicho modelo fue aplicado a la población total ($N=189$), separados en grupos de no diabetes (no-DMT2 $n=118$) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$), encontrándose las frecuencias relativas acumuladas. Se estableció un punto de corte en el nivel donde se logró la máxima separación entre grupos. Este modelo aditivo fue aplicado a todos los posibles perfiles genéticos utilizando las combinaciones seleccionadas. Cada perfil fue evaluado para determinar las frecuencias de portadores en el nivel de exigencia (punto de corte). El estadístico de Kolmogorov-Smirnov (D_{KS}) se utilizó como punto de corte para medir la separación entre las probabilidad acumulada o en su defecto entre las frecuencias relativas acumuladas, establecido, mediante conteos directos y se calculó tanto la proporción de portadores en cada grupo de estudio, como la diferencia máxima, de acuerdo con las descripciones anteriores (**figura 6**).

Las frecuencias de portadores de cada perfil fueron evaluadas y comparadas estadísticamente. La significancia de las diferencias en la frecuencia de portadores de cada perfil entre los grupos de estudio fue calculada utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Así mismo, se evaluó la habilidad de cada perfil para marcar al grupo DMT2, mediante el cálculo de sensibilidad, exactitud, índices de falsos positivos e índice de falsos negativos. Adicionalmente, se buscó asociaciones de cada perfil genético con los grupos de estudio utilizando la prueba Fisher. Se estimó el índice del riesgo relativo mediante la prueba Mantel-Haenszel y las probabilidades de riesgo por Razón de Momios del % de portadores de las variaciones, utilizando intervalos de confianza al 95%

tomando en consideración al conjunto de análisis estadísticos anteriores, se identificó el perfil genético con el mayor poder, menor error y más elevada capacidad para separar y marcar específicamente al grupo DMT2 (**figura 6**).

Asociaciones del marcador aditivo con periodontitis generalizada

Tomando en consideración al conjunto de análisis estadísticos anteriores, se identificó el perfil genético con el mayor poder, menor error y más elevada capacidad para separar y marcar a los sujetos con DMT2. Aplicando las frecuencias de portadores del modelo aditivo, este fue evaluado y comparado estadísticamente para los sujetos de estudio con periodontitis generalizada y con salud periodontal (**tabla 8**). Se buscaron asociaciones del marcador con los grupos de estudio y se estimó el índice del riesgo relativo mediante la prueba Mantel-Haenszel y las probabilidades de riesgo por Razón de Momios del % de portadores del marcador. Se evaluó la habilidad del modelo para marcar los grupos experimentales de salud periodontal y periodontitis generalizada, en las comparaciones de los dos grupos de sujetos de estudio, mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad, exactitud, índice de falsos positivos, índice de falsos negativos, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA CHECKERBOARD

La composición de la placa dentobacteriana subgingival en cada sujeto de estudio fue determinada calculando las cuentas absolutas de cada una de las 40 especies bacterianas evaluadas en cada muestra de manera individual.

Los análisis exploratorios microbiológicos, compararon la composición microbiológica del total de la población $N=189$, entre sujetos de cada grupo de estudio no-DMT2 $n=118$, y con DMT2 $n=71$. Los datos microbiológicos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) de la proporción (porcentaje del total de las cuentas de las sondas DNA) calculada para cada especie bacteriana en cada muestra, promediado para cada sujeto de estudio y después promediado entre los sujetos de cada grupo. Las diferencias entre grupos fueron determinadas utilizando las pruebas no-paramétricas U de Mann-Whitney, ajustando las significancias para comparaciones múltiples como se ha descrito con anterioridad (Socransky and Haffajee 1991).

Los análisis microbiológicos evaluaron la composición microbiológica de los 177 sujetos de estudio con clasificación periodontal. Con comparaciones entre grupos de estudio con salud periodontal (no diabéticos y diabéticos) SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$ y con periodontitis generalizada (no diabéticos y diabéticos) PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$. Los datos

microbiológicos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) de los niveles (cuentas bacterianas $\times 10^5$), proporción (porcentaje del total de las cuentas de las sondas DNA) y prevalencia (porcentaje de sitios colonizados), cada uno calculado para cada especie bacteriana en cada muestra, promediado para cada sujeto de estudio y después promediado entre los sujetos de cada grupo. Las diferencias entre grupos fueron determinadas utilizando las pruebas no-paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, según el caso, ajustando las significancias para comparaciones múltiples como se ha descrito con anterioridad (Socransky and Haffajee 1991).

Se realizaron análisis de correlación por medio de Rho de Spearman, para obtener valores de correlación y valores de Rho, de los 177 sujetos de estudio con clasificación periodontal de los cuatro grupos de estudio: SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$ comparados con todos los parámetros clínicos generales, clínicos periodontales y propios de diabetes los grupos de estudio, para analizar la correlación con los datos microbiológicos analizados por grupos de estudio.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA HOMIM

Los microarreglos se analizaron por medio del escáner Axon 4000B y analizaron con GenePix4000 Pro-Software. Las laminillas fueron colocadas en el escáner, protegidas de la luz y escaneadas a una longitud de onda de 532 nm, para visualizar Cy3-dCTP. La potencia del PMT (Photo Multiplet Tube) del escáner fue ajustada al 100%, con una intensidad media de escaneo inicialmente, para visualizar cada microarreglo y posteriormente cada uno analizado particularmente, calculando la intensidad donde se obtuvieron mejores lecturas del software, así el ruido de fondo se redujo con la lectura de cada señal. Las imágenes fueron importadas al software George Chen para los futuros análisis.

Los resultados que se obtuvieron de los análisis fueron la presencia o ausencia de microorganismos particulares, y una semi-cuantificación de estos, provenientes de la intensidad y el tamaño de las señales. Los resultados fueron calculados para cada especie bacteriana en cada muestra y promediados por grupos de estudio (SP y PG) para analizar coeficientes de correlación y posteriormente con las variables clínicas periodontales por medio de MEV 4 (Multiple Array Viewer) Software. Las comparaciones entre grupos de se realizaron con la prueba estadística de Wilcoxon y posteriormente con ajuste de comparaciones múltiples FDR-Benjamini-Hochberg y para las asociaciones entre sitios SP y con PG con PGA (Principal Component PGA).

RESULTADOS

EVALUACIÓN CLÍNICA

Características de la población de estudio

Se realizó un estudio de tipo transversal y de casos y controles en un total de 189 sujetos de estudio agrupados en: no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$). Las características generales y periodontales de la población se expresan como valores de media, más menos el error estándar de la media (EEM) y rangos mínimos y máximos de las medias. Las diferencias significativas encontradas para cada uno de los parámetros fueron utilizando las pruebas de Kruskal Wallis y prueba U de Mann-Whitney ajustada para comparaciones múltiples, con intervalos de confianza al 95% (IC95%). Las comparaciones entre grupos no-DMT2 y DMT2, mostraron diferencias significativas en los parámetros generales como: edad, género, estatura y % de fumadores actuales ($p<0.001$). Y para las comparaciones en los parámetros periodontales en niveles de inserción promedio (mm), % de sitios con acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración ($p<0.001$). Todas significativamente mayores en sujetos con DMT2 (**tabla 4**).

Estos sujetos a su vez fueron clasificados en salud periodontal y periodontitis generalizada (considerando la extensión y distribución) (Caton, Armitage et al. 2018). Los sujetos que no clasificaron en ninguna de las anteriores clasificaciones fueron descartados para el posterior análisis microbiológico, restando un total de 177 sujetos de estudio (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$). Se muestran las características clínicas generales, periodontales de los sujetos de estudio y las propias de la población de sujetos con DMT2 en la **tabla 5**. Las diferencias significativas para las comparaciones entre no-DMT2 vs. DMT2 y SP vs. PG fueron en el parámetro de edad ($p<0.001$). Y para las comparaciones entre no-DMT2 vs. DMT2 para número de dientes faltantes ($p<0.01$), enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración ($p<0.001$), con medias mayores para los grupos de sujetos con DMT2. Para las comparaciones entre SP y PG tanto en grupos de no-DMT2 y DMT2, las medias fueron mayores para sujetos con PG en comparación con los SP, con diferencias significativas en todos los parámetros clínicos periodontales ($p<0.001$) con excepción de enrojecimiento gingival (No significativa: NS) No se encontraron diferencias significativas en las comparaciones de parámetros propios de los sujetos diabéticos, en ninguna de las comparaciones con la prueba U de Mann Whitney, únicamente con los resultados prueba de coeficiente correlación (CC) y Rho de Spearman, para las comparaciones entre grupos SP y con PG

DMT2, el tratamiento farmacológico para diabetes (%) presentó diferencias significativas con mayor correlación para periodontitis generalizada (CC:0.216 y Rho: 0.007) (**tabla 5**).

EVALUACIÓN GENÉTICA

Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las 12 variaciones genéticas evaluadas: IL1A:c.-949C>T, IL1B:c.315C>T, IL1B:c.-583T>C, IL1RN:c.215-516(2_6), IL6:c.-237C>G, IL8:c.-352A>T, IL10:c.-627T>G, IL-10:c.-854T<C, IL10:c.-1116a>G, IL2B:c.*159A>C, TNF:c.-488G>A, LTA:c.-10+90A>G, fueron calculadas para la población total de estudio (N=189) dividida por grupos de sujetos no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$).

La proporción (%) de portadores para cada alelo y genotipo en cada grupo de estudio se presenta en las **tablas 6a y 6b**. Se representa la frecuencia (i) y porcentaje de portadores positivos $\%(i)$, la diferencia máxima en % de portadores entre grupos (D_{max}), exactitud (EXC), índices de falsos negativos (IFN), significancia de las diferencias entre grupos realizada para la prueba estadística U de Mann Whitney, la significancia de la asociación con la prueba exacta de Fisher, la probabilidad del riesgo relativo mediante la prueba Mantel-Haenszel y las probabilidades de riesgo por Razón de Momios del % de portadores de las variaciones, utilizando intervalos de confianza al 95%.

De las doce variaciones evaluadas, once fueron polimorfismos de tipo SNP, por lo tanto, presentaron tres genotipos y 2 alelos individuales para cada una, lo que resultó en un total de 55 variaciones individuales. Únicamente la variación para el gen de IL1RN, por ser polimorfismos en el número de repetición en tandem (VNTR), presentó 5 alelos y 15 genotipos individuales; sumándolas con las anteriores, se obtuvo total de 75 variaciones individuales (**tablas 6a y 6b**).

De dichas variaciones, ocho genotipos: IL1RN:c.215-516(86)[3]+[4], IL1RN:c.215-516(86)[6]+[4], IL1RN:c.215-516(86)[2]+[6], IL1RN:c.215-516(86)[5]+[5], IL1RN:c.215-516(86)[5]+[3], IL1RN:c.215-516(86)[5]+[6], IL1RN:c.215-516(86)[3]+[3], IL1RN:c.215-516(86)[3]+[6] y IL1RN:c.215-516(86)[6]+[6], así como un alelo: IL1RN:c.215-516(86)[6], no fueron detectados en la población de estudio; con lo cual sumó un total de 65 genotipos y alelos individuales positivos para la población de estudio; de los cuales 17 mostraron significancia al realizar las comparaciones entre grupos no-DMT2 y DMT2 con la prueba estadística U de Mann Whitney (**figuras 5 a y 5b y tablas 6a y 6b**).

La distribución con diferencias significativas en el % de portadores para cada genotipo y/o alelo, que se destacaron por ser mayores en sujetos con DMT2 fueron: genotipos homocigotos para

el alelo ancestral: IL1A:c.[-949CC] ($p<0.001$), IL1B:c.[315CC] ($p<0.001$), IL1B:c.[-583TT] ($p<0.001$); para el alelo variante: IL6:c.[-237GG] ($p<0.01$) e IL8:c.[-352TT] ($p<0.05$) y heterocigoto: LTA:c.[-10+90AG] ($p<0.01$). Estas variaciones presentaron diferencia máxima >10 , índice de falsos negativos <0.5 y Razón de Momios >1 . Otra variación que mostró alta proporción de portadores en DMT2 aunque sin significancia entre grupos no-DMT2 y DMT2, fue: TNF:c.[-488GG] (94.4%) (**Figura 5b**) con índice de falsos negativos <0.06 y Razón de Momios >1 (**tabla 6b**).

Generaciones de haplotipos

De los genotipos y alelos individuales de los portadores positivos con diferencias significativas para las comparaciones entre sujetos no-DMT2 y con DMT2 (U de Mann Whitney) se seleccionaron 6 que contaran además con las siguientes características: significancia en al menos 4 de los 5 criterios evaluados en las pruebas estadísticas, considerando los siguientes puntos de corte: U de Mann Whitney <0.05 , diferencia máxima >10 , exactitud >0.5 , índice de falsos negativos <0.5 y Razón de Momios >1.5 . Los 6 genotipos y alelos individuales seleccionados tuvieron porcentaje de frecuencias positivas mayores para los sujetos con DMT2 al compararlos con las frecuencias de los sujetos no-DMT2 (**tabla 7**).

Resultaron 57 posibles combinaciones de 2, 3, 4, 5 y 6 de genotipos y/o alelos individuales, que surgieron de las generaciones de haplotipos, de las cuales se determinó las frecuencias de portadores. Se seleccionaron a su vez 5, basados en la selección de 2 fases. En la primera fase de selección, se consideraron combinaciones que cumplieran con cada uno de los siguientes criterios: porcentaje de portadores $<25\%$, diferencia máxima >30 , prueba U de Mann-Whitney $p<0.05$, Razón de Momios >4 , exactitud >0.65 e índice de falsos negativos <0.5 . En la segunda fase de selección, se llevó a cabo una discriminación de combinaciones basados en las redundancias de alelos y genotipos individuales dentro de los haplotipos. Las 5 combinaciones fueron no redundantes conformadas por el mayor número de alelos y genotipos individuales: 1. IL1A:c.[-949CC] + IL1B:c.[315CC] + IL1B:c.[-583TT] + IL6:c.[-237GG]; 2. IL1A:c.[-949CC] + IL1B:c.[315CC] + IL6:c.[-237GG] + IL8:c.[-352A]; 3. IL1A:c.[-949CC] + IL1B:c.[315CC] + IL6:c.[-237GG] + LTA:c.[-10+90AG]; 4. IL1B:c.[315CC] + IL1B:c.[-583TT] + IL6:c.[-237GG] + IL8:c.[-352A] y; 5. IL1B:c.[315CC] + IL6:c.[-237GG] + IL8:c.[-352A] + LTA:c.[-10+90AG] (**figura 6**).

Modelo aditivo

Los 5 haplotipos seleccionados fueron tomados como una plantilla de opciones como un perfil genético, que fueron considerados dentro de un modelo aditivo. Se estableció un punto de corte

considerada la diferencia máxima en el nivel donde se logró la máxima separación entre grupos de no diabetes (no-DMT2 $n=118$) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$). Este modelo aditivo fue aplicado a todos los posibles perfiles genéticos utilizando las combinaciones seleccionadas. La diferencia máxima (Dks) entre los grupos de estudio por sus frecuencias relativas acumuladas se observan en la **figura 6**. El grupo de sujetos con DMT2 resultó con mayor número de frecuencias relativas acumuladas para una o más de las combinaciones de los 5 haplotipos. Las características estadísticas que se observaron para dicho modelo, se encuentran descritas en la **figura 6**: con frecuencia de portadores (i) >58 para el grupo con DMT2, diferencia máxima de 46.1, especificidad de 87, sensibilidad de 82, exactitud de 0.82, índice de falsos negativos de 0.18, índice de falsos positivos de <0.13 , U de Mann Whitney <0.001 , prueba exacta de Fisher <0.001 , Razón de Momios de 8.7 y prueba Mantel-Haenszel <0.001 . En la gráfica de la figura 6, se puede observar el % de la proporción de frecuencias relativas acumuladas para cada grupo (no-DMT2 y DMT2), así como la diferencia máxima que existe entre grupos al presentar uno o más de las combinaciones de haplotipos. El cuadro que se presenta en el extremo inferior derecho de la misma figura presenta las frecuencias relativas acumuladas (FRA) que se observan al aplicar el modelo aditivo. El punto de corte fue establecido en donde se produjo la máxima separación, con 1 o más haplotipos con FRA de 0.356 % para sujetos no-DMT2 y 0.817 para los sujetos con DMT2 y Dks de 0.461, entre grupos de no-DMT2 y DMT2, queriendo decir que los sujetos portadores del modelo aditivo (con 1 o más combinaciones de haplotipos) presenta 8.07 veces más el riesgo (Razón de momios) de presentar DMT2.

Asociaciones del marcador aditivo con Periodontitis generalizada

A los sujetos de estudio seleccionados de acuerdo con la clasificación de salud periodontal y periodontitis generalizada, se les examinó si eran portadores del modelo aditivo para buscar la asociación con su estado periodontal. En la **tabla 9** se describe el número total de portadores del marcador aditivo con ausencia o presencia (0/1), para sujetos sanos periodontales no-DMT2 ($n=12$) y con DMT2 ($n=31$) y con periodontitis generalizada no-DMT2 ($n=45$) y con DMT2 ($n=73$). El grupo de sujetos con PG DMT2 fue presentó mayor número de sujetos (37) portadores del marcador que los sujetos con PG no-DMT2 (27), con Razón de momios de 7.9, es decir las veces que presenta el riesgo el grupo de PG en comparación con los sujetos sanos periodontales de portar el marcador. Así mismo, reporta sensibilidad de 0.82, especificidad de 0.63, exactitud de 0.70, índice de falsos positivos de 0.37 e índice de falsos negativos de 0.18, lo cual quiere decir la alta exactitud del

marcador para Periodontitis, a pesar de que fue probado en un número de casos bajo, adicional a que los sujetos con SP mostraron un número menor de portadores del marcador a diferencia de los sujetos con PG de ambos grupos principales de estudio para no-DMT2 (13) y para DMT2 (9).

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Proporciones individuales promedio del total de la población

El presente análisis microbiológico de proporciones individuales y proporciones por complejos bacterianos se consideró exploratorio ya que incluye al total de la población (189 sujetos) organizada en dos grupos principales de no-DMT2 ($n= 118$) y de DMT2 ($n=71$), sin considerar el estado periodontal de los individuos. En la **tabla 9 y figura 6**, se describe la proporción promedio de especies individuales de las 40 cepas bacterianas identificadas, ordenadas por complejos bacterianos y posteriormente en orden alfabético. Todas las especies fueron identificadas en todos los sujetos de estudio. Las dos especies que tuvieron mayor proporción fueron *Actinomyces naeslundii* (8.7% en no-DMT2 y 6.8% en DMT2) y *C. matruchotii* (8.5% no-DMT2 y 6.9% DMT2) para ambos grupos de estudio. Especies patógenas reconocidas como *P. gingivalis* (7.6% no-DMT2 y 3.3% DMT2), *T. denticola* (2.2% no-DMT2 y 1.5% DMT2), *T. forsythia* (5.3% no-DMT2 y 3.7% DMT2) y *A. actinomycescomitans* (0.8% no-DMT2 y 0.4% DMT2) presentaron mayor proporción en sujetos no-DMT2 que los sujetos con DMT2, a pesar de no presentar diferencias significativas. Particularmente 22 de las 40 especies evaluadas tuvieron proporciones promedio mayores en sujetos con DMT2, 18 de ellas con diferencias estadísticamente significativas: *Actinomyces georgiae* ($p<0.05$); *Streptococcus anginosus* ($p<0.001$), *S. gordonii* ($p<0.05$), *S. intermedius* ($p<0.001$), *S. mitis* ($p<0.001$), *S. oralis* ($p<0.001$), *S. sanguinis* ($p<0.01$), *V. parvula* ($p<0.05$), *C. ochracea* ($p<0.001$), *C. sputigena* ($p<0.05$), *C. gracilis* ($p<0.001$), *P. micra* ($p<0.001$), *P. nigrescens* ($p<0.001$), *S. constellatus* ($p<0.001$), *S. noxia* ($p<0.001$), *N. mucosa* ($p<0.001$), *Propionibacterium acnes* ($p<0.001$), *Prevotella melaninogenica* ($p<0.05$) y *Selenomonas artemidis* ($p<0.001$) (**tabla 9, figura 6**).

Proporciones por complejos bacterianos del total de la población

En la **figura 8** se muestran las proporciones promedio del análisis exploratorio por complejos bacterianos de la población total de 189 sujetos de estudio no-DMT2 ($n= 118$) y DMT2 ($n=71$). Después de realizar correcciones para comparaciones múltiples, las diferencias entre sujetos no-DMT2 y DMT2 mostraron proporciones significativamente mayores en los complejos: amarillo (*Streptococcus* sp.) ($p<0.001$), morado (*V. parvula* y *A. naeslundii* 1) ($p<0.05$) y naranja (patógenos putativos) ($p<0.05$) con mayor proporción para los sujetos diabéticos. Independientemente de la

agrupación de especies “otros”, el complejo predominante en no-DMT2 fue el de *Actinomyces* sp. y el de especies patógenas putativas del complejo naranja para el grupo de DMT2. Las proporciones para el complejo rojo fueron mayores en no-DMT2 que en DMT2 (15.0 % y 8.4 % respectivamente), a pesar de no ser diferencias significativas.

Niveles promedio en grupos de sujetos con clasificación periodontal

Los niveles totales promedio de los 177 sujetos de estudio con clasificados periodontal para salud y periodontitis generalizada (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$) se muestran en la **figura 9**. El grupo de sujetos que presentó mayores cuentas totales promedio fue el de PG DMT2 (349.25×10^5), seguido de los sujetos SP DMT2 (268.01×10^5), y los grupos PG no-DMT2 (133.16×10^5) y SP no-DMT2 (128.77×10^5). Las diferencias entre las comparaciones por grupos no-DMT2 y DMT2 fueron significativas para SP y PG con cuentas bacterianas mayores para los grupos de DMT2 ($p<0.001$). Las diferencias entre las comparaciones de SP y PG fueron significativamente mayores para el grupo de PG DMT2 ($p<0.01$) y en SP DMT2 (NS) con la prueba de Kruskal Wallis posterior a la corrección para comparaciones múltiples.

Las cuentas bacterianas de las 40 especies individuales, agrupadas por complejos bacterianos se muestran en la tabla 10 con las significancias de la comparación entre grupos de sujetos no-DMT2 y DMT2 y en la **figura 10** con las significancias de la comparación entre grupos de sujetos SP y PG, con la prueba de Kruskal Wallis posterior al ajuste por comparaciones múltiples. Las diferencias entre las comparaciones por grupos no-DMT2 y DMT2 fueron significativas para 37 de las 40 especies evaluadas. En condiciones de SP con cuentas bacterianas mayores para el grupo SP-DMT2 en 36 especies y para el grupo de PG-DMT2 con cuentas mayores en las 40 especies (**tabla 10**). Las comparaciones entre grupos de SP y PG mostraron sólo una diferencia significativa, con cuentas bacterianas mayores para la especie de *P. gingivalis* ($p<0.001$) (**figura 10**).

Prevalencia promedio en grupos de sujetos con clasificación periodontal

La prevalencia promedio de las 40 especies individuales evaluadas (agrupadas por complejos bacterianos) de los 177 sujetos de estudio con clasificados periodontal para salud (SP $n=63$ no-DMT2 y SP DMT2 $n=13$) y periodontitis generalizada (PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$) se muestran en las gráficas emparentadas de la **figura 11**. Las comparaciones entre no-DMT2 y DMT2 no tuvieron diferencias significativas en grupos de SP. A diferencia de las comparaciones entre grupos de PG, donde 35 de las 40 especies evaluados fueron más prevalentes en PG DMT2. Las especies que no tuvieron diferencias significativas fueron: *C. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. matruchotii*, *Eubacterium*

saburreum y *Porphyromonas endodontalis*. En las comparaciones entre grupos con SP y PG, las diferencias significativas fueron en las especies: *P. intermedia*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* ($p < 0.001$) con mayor prevalencia en el grupo de PG no-DMT2 (prueba de Kruskal Wallis con corrección para comparaciones múltiples) (**figura 11**).

Proporciones promedio en grupos de sujetos con clasificación periodontal

La proporción promedio de las 40 especies agrupadas por complejos bacterianos, de la población de 177 sujetos de estudio clasificados en SP y PG (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$) se muestran en la **figura 12**. Derivado de las comparaciones entre grupos no-DMT2 y DMT2, se pudo observar diferencias mayormente significativas para los grupos de DMT2 (SP y PG) en *A. georgiae* ($p < 0.01$), en seis de las siete especies de *Streptococcus* evaluadas: *S. anginosus*, *S. oralis* ($p < 0.001$), *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. sanguinis* y *S. constellatus* ($p < 0.01$), en comparación con los sujetos no-DMT2 (SP y PG), así como en especies como: *V. parvula* ($p < 0.001$) del complejo morado, *C. ochracea* ($p < 0.001$) del complejo verde y *C. gracilis* ($p < 0.001$), *P. micra* ($p < 0.01$) y *P. nigrescens* ($p < 0.05$) del complejo naranja, y en *S. noxia* ($p < 0.01$) y *S. artemidis* ($p < 0.001$) con proporciones particularmente mayores para el grupo de PG DMT2 (prueba de Kruskal Wallis con corrección para comparaciones múltiples). Cabe mencionar que las especies patógenas reconocidas del complejo rojo mostraron proporciones menores en sujetos del grupo con PG DMT2 en comparación con el grupo de PG no-DMT2, a pesar de no haber mostrado diferencias significativas. Por otro lado, para las comparaciones entre grupos de sujetos con SP y PG, las diferencias encontradas fueron únicamente para las comparaciones entre grupos no-DMT2. Se observaron proporciones significativamente mayores en las especies: *A. naeslundii* ($p < 0.001$) para los sujetos SP no-DMT2, y menores proporciones en este mismo grupo de *P. intermedia* ($p < 0.05$) y *P. gingivalis* ($p < 0.001$) (**figura 12**) en comparación con el de PG no-DMT2.

Proporciones por complejos bacterianos en grupos de sujetos con clasificación periodontal

En la **figura 13** se muestran las proporciones promedio por complejos bacterianos de la población de 177 sujetos de estudio con clasificados periodontal para salud (SP $n=63$ no-DMT2 y SP DMT2 $n=13$) y periodontitis generalizada (PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$). Al comparar grupos de sujetos no-DMT2 y con DMT2, no se encontraron diferencias significativas en SP, aunque los complejos de *Actinomyces* sp. (SP no-DMT2 24.1% y DMT2 20.5% y PG no-DMT2 18.5% y DMT2 13.7%) y rojo (SP no-DMT2 10.6% y DMT2 6.1% y PG no-DMT2 17.8% y DMT2 9.2%) se encontraron

en menor proporción en DMT2 y en mayor proporción el resto de los complejos principalmente el amarillo (SP no-DMT2 11.1% y DMT2 13.6% y PG no-DMT2 7.9% y DMT2 14.0%). En PG las diferencias encontradas fueron proporciones mayores de los complejos amarillo (PG no-DMT2 7.9% y DMT2 14.0%), morado (PG no-DMT2 5.6% y DMT2 7.4%) y naranja (PG no-DMT2 18.0% y DMT2 22.7%) ($p<0.001$) en PG DMT2 y el complejo rojo (PG no-DMT2 17.8% y DMT2 9.2%) ($p<0.05$) con menor proporción en el grupo de PG DMT2 comparado con el grupo de PG no-DMT2. Para las comparaciones entre SP y PG, las diferencias en los grupos con DMT2 no fueron significativas, sin embargo, fue mayor la proporción del complejo naranja en PG DMT2 (16.1 y 27.7%, SP DMT2 y PG DMT2 respectivamente). En el caso de los grupos no-DMT2, se observaron altas proporciones de los complejos rojo ($p<0.01$) y naranja ($p<0.05$) así como disminución en la proporción del complejo de *Actinomyces* ($p<0.01$) en el grupo de PG no-DMT2 en comparación con el de SP no-DMT2 (prueba de Kruskal Wallis con corrección para comparaciones múltiples) (**Figura 13**).

Correlación de niveles de HGA1c y parámetros clínicos periodontales

Los sujetos con diabetes mellitus tipo 2, con condiciones de salud periodontal y periodontitis generalizada (SP DMT2 $n=13$ y PG DMT2 $n=39$) se separaron de acuerdo con los niveles de hemoglobina glucosilada, considerado un adecuado control: HGA1c $\leq 8\%$ y pobre control glicémico: HGA1c $>8\%$. En la **figura 14** se describen las diferencias presentes en las características clínicas periodontales como: profundidad de bolsa, niveles de inserción, placa, enrojecimiento, sangrado al sondeo y supuración, de los grupos de sujetos SP DMT2 y con PG DMT2, en relación con los distintos niveles de hemoglobina glucosilada. Las comparaciones entre sujetos SP DMT2 con buen y mal control de HGA1c, no mostraron diferencias significativas, a diferencia de las comparaciones en los sujetos con PG DMT2 dónde se encontraron medias mayores para profundidad de bolsa y sangrado al sondeo, los cuales que son parámetros estrechamente relacionados con periodontitis.

Análisis de correlación microbiológica y datos evaluados en sujetos diabéticos

La comparación de los distintos niveles de HGA1c con las características microbiológicas de los grupos de estudio, no mostraron diferencias significativas, así como en otras características de perfiles lipídicos evaluadas en sujetos con DMT2 por medio de análisis de correlación (CC) y Rho de Spearman. Para todos los parámetros clínicos, generales y propios de diabetes, las asociaciones con los datos microbiológicos encontradas para cuentas totales, cuentas, prevalencia y proporciones individuales así como proporciones por complejos, marcaron diferencias significativas únicamente

en los parámetros de lípidos de baja densidad con pobre control (HDL \leq 45) relacionado con altas proporciones de *V. parvula* y *A. viscosus* (CC: 0.31 Rho: 0.034 y CC: 0.30, Rho: 0.036 respectivamente) y pobre control para triglicéridos totales (TT \geq 150) relacionado con altas proporciones de *T. forsythia* (CC: 0.31 **Rho: 0.033**). El resto de las especies y de los parámetros de bioquímica sanguínea y de obesidad no mostraron diferencias significativas.

Análisis microbiológico por microarreglos del microbioma oral humano

La **figura 15** es una gráfica de calor que representa los resultados derivados del análisis para la técnica de HOMIM, realizada para las 41 muestras de placa subgingival de sitios mesio-vestibulares o disto-vestibulares, sanos periodontales (NI $>$ 2mm): $n=25$ y con Periodontitis (NI $<$ 5mm): $n=16$, de 27 sujetos con diabetes mellitus tipo 2, con condiciones de salud periodontal y periodontitis generalizada (SP DMT2 $n=13$ y PG DMT2 $n=14$) de primeros molares superiores o inferiores. Se obtuvo identificación microbiológica positiva para 248 de hasta 329 sondas de rDNA bacterianas presentes en las muestras de los sujetos de estudio. La gráfica de la **figura 16** muestra la descripción en el eje de las "X", de las muestras con un código de identificación numérico, las iniciales del nombre del sujeto de estudio, la clasificación de SP (PH) y PG (CP), así como las características de los sitios sanos (H) o enfermos (D). En el eje de las "Y" se representan las especies identificadas, mismas que se muestran en la **tabla 11**.

Los resultados obtenidos de las señales positivas en los microarreglos fueron normalizadas y transformadas en niveles de intensidad con valor de 0 para las señales negativas y valores de 2-5 correspondientes a los distintos valores de intensidad de las frecuencias relativas. Los niveles promedio calculados para cada sonda bacteriana y promediados entre las muestras de cada grupo de estudio se muestran en la **tabla 11**. Las sondas bacterianas que tuvieron niveles promedio con valores >2 son resaltadas en color verde en la tabla 11. Para el grupo de sujetos SP DMT2, las especies con mayores niveles fueron: *C. concisus* HOT-575 / *C. rectus* HOT-748_X36 (Nivel 2.16), *C. gracilis* HOT-623_Q04 (Nivel 2.2), *Fusobacterium* Cluster_AE01 (Nivel 3.08), *Haemophilus parainfluenzae* HOT-718_W79 (Nivel 2.2), *Rothia dentocariosa* HOT-587 / *Rothia mucilaginosa* HOT-681_E52 (Nivel 2.2), *S. constellatus* HOT-576 / *S. intermedius* HOT-644_F48 (Nivel 2.4). Únicamente 3 sondas tuvieron niveles >2 para ambos grupos de diabetes (SP y PG): *S. anginosus* HOT-543 / *S. gordonii* HOT-622_F49 (Niveles: SP 3.36 y PG 2.92); *S. oralis* HOT-707/ *Streptococcus* sp. HOT-064_F46 (Niveles: SP 3.16 y PG 2.33) y *Gemella haemolysans* HOT-626_AG51 (Niveles: SP 2.48 y 2.13 PG).

De las pruebas estadísticas utilizando el Software MEV 4 (Multiple Array Viewer), se determinaron comparaciones entre grupos de SP y PG DMT2. Las diferencias significativas entre los grupos fueron únicamente en una sonda bacteriana correspondiente a: *Streptococcus salivarius* HOT-755 / *Streptococcus vestibularis* HOT-021 / *Streptococcus* sp. HOT-067_E34, con mayor frecuencia relativa en el grupo de SP DMT2 en comparación con el grupo de PG DMT2 (Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$ después del ajuste de comparaciones FDR-Benjamini-Hochberg) (**figura 16**).

En las comparaciones provenientes de las muestras separadas por las distintas características clínicas periodontales, se observaron únicamente diferencias significativas al comparar sujetos de estudio con y sin sangrado al sondeo (SAS y no SAS, respectivamente) en cuatro sondas bacterianas: 1. SR1[G-1] sp. HOT-345,874_AC72; 2. *C. concisus* HOT-575/ *C. rectus* HOT-748_X36; 3. *R. dentocariosa* HOT-587/ *R. mucilaginosus* HOT-681_E52; 4. *Rothya mucilaginosus* HOT-681_AB63. Las sondas 1, 2 y 4 con mayor frecuencia en sitios con SAS y la 3 en sitios no SAS. Se describió la formación de “Clusters” diferenciando sujetos de estudios con distintas características clínicas periodontales, no mostrando significancia en ninguna especie bacteriana con la única excepción mencionada con anterioridad (Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$ después del ajuste de comparaciones FDR-Benjamini-Hochberg) (**figura 17**).

Para las asociaciones entre sitios con distintos NI, separándolos en grupos de ≤ 3 mm de los grupos SP DMT2 y PG DMT2 y un último grupo de NI ≥ 5 mm en PG DMT2. Se generó la gráfica de Análisis de Componentes Principales (PGA), dónde se buscaron agrupaciones de los sitios dependiendo de las características microbiológicas de las 248 sondas detectadas en los microarreglos. Los resultados obtenidos fueron una distribución separada de los grupos de ≤ 3 mm SP DMT2 correspondiente a sitios sanos (H), del grupo de ≥ 5 mm PG DMT2 correspondiente a sitios enfermos (D) (**figura 18**), o cual corrobora la agrupación clínica de los sitios evaluados con salud y con periodontitis.

DISCUSIÓN

De la población total de estudio (N=189), las diferencias encontradas en las características clínicas generales y periodontales de grupos de no diabetes y diabetes, no afectaron el grueso de los resultados genéticos, ni microbiológicos exploratorios. Las comparaciones de los parámetros periodontales de sujetos no diabéticos (no-DMT2 $n=118$) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 $n=71$), mostraron diferencias significativas en las características clínicas periodontales como: niveles de inserción promedio, % de sitios con acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración, lo cual reflejó las diferencias periodontales inmersas en los sujetos de estudio, ya que los grupos tanto para no-DMT2 como para DMT2, comprendieron individuos con criterios de selección para SP, PG y un grupo de sujetos no clasificados (que no se entraban dentro de ninguna de los dos anteriores clasificaciones) (**tabla 4**).

La población seleccionada con clasificación periodontal para salud y periodontitis generalizada, mostraron diferencias periodontales acordes con la clasificación más actual, considerando la extensión, distribución de la periodontitis y DMT2 como factor de riesgo adicional (Papapanou, Sanz et al. 2018). No fueron considerados los grados de severidad y complejidad, ya que, cuando se diseñó el presente estudio se contaba con la clasificación anterior, dónde, se tomó a la periodontitis crónica generalizada como criterio inicial de selección (1999). Con los criterios de selección establecidos para los sujetos con periodontitis del presente estudio, se cuenta con la adecuación de periodontitis generalizada, de acuerdo con la nueva clasificación, sin embargo, para futuros estudios, consideraremos subclasificarlos de acuerdo con grados de severidad y complejidad para contar con información suplementaria respecto a la progresión de la periodontitis (Papapanou, Sanz et al. 2018) (**tabla 1 y tabla 5**).

Las diferencias en la “ n ” de cada grupo clínico, separado por su estado periodontal y sistémico (SP no-DMT2 $n=63$, PG no-DMT2 $n=62$, SP DMT2 $n=13$, y PG DMT2 $n=39$) no representó problemas para el análisis microbiológico del presente estudio, ya que las muestras recolectadas de placa subgingival, fueron tomadas de boca completa, es decir un sitio por diente de cada sujeto de estudio, además de haber sido tomada con técnica estandarizada de cureta de acuerdo con la literatura (Tanner and Goodson 1986). Para el análisis microbiológico de los sujetos con clasificación periodontal, la única variable que se eliminó de la población subclasificada ($n=177$) (además de la no clasificación periodontal), fue la de fumadores actuales, ya que no se encuentra bien definido en la literatura si el efecto del tabaquismo modifica la flora subgingival o no, sin embargo es

considerado un factor de riesgo para las enfermedades periodontales (Haffajee and Socransky 2001, Gomes, Nonnenmacher et al. , Guglielmetti, Rosa et al. 2014`, Papapanou, Sanz et al. 2018).

En las comparaciones entre las características clínicas periodontales de los sujetos de estudio, los grupos de DMT2 presentaron medias significativamente mayores de: acumulación de placa, sangrado al sondeo y supuración contra los no-DMT2 (SP y PG). Como lo reporta la literatura, el sangrado al sondeo y la supuración, son indicadores de inflamación, alto riesgo y severidad de las enfermedades periodontales en DMT2 (Cutler, Machen et al. 1999, Sanz, Ceriello et al. 2018), sin embargo, los parámetros clínicos periodontales que determinan pérdida de tejidos de soporte dental (profundidad de bolsa y niveles de inserción) (Armitage 2004), fueron menores en los grupos de DMT2 que en los sujetos no diabéticos. Las diferencias encontradas entre SP y PG de ambas condiciones sistémicas (no-DMT2 y DMT2) fueron las esperadas, basadas en la clasificación de los sujetos de estudio (Papapanou, Sanz et al. 2018). Independientemente de ello, las características entre grupos de diabetes (SP DMT2 y PG DMT2) fueron lo más homogéneas posibles para la evaluación microbiológica, lo cual fue positivo para los resultados del presente estudio, ya que no se presentaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros propios de diabetes (**tablas 5**).

En la evaluación genética del total de la población (N=189), cuatro de las frecuencias alélicas y genotípicas para las variaciones evaluadas, mostraron una distribución mayor para el alelo ancestral en sujetos con DMT2 y por arriba del 50%: IL1A:c.[-949CC] (84%, $p<0.001$), IL1B:c.[315CC] (98%, $p<0.001$), IL1B:c.[-583TT] (54.9% $p<0.001$) y IL8:c.[-352A] (%, $p<0.05$). Y para el alelo variante únicamente dos variaciones: LTA:c.[-10+90AG] (60.6%, $p<0.01$) e IL6:c.[-237GG] (88.7% $p<0.01$) (**tablas 6a y 6b y figuras 5a y 5b**). Particularmente, el genotipo IL1B:c.[-583TT] fue la única variación polimórfica cuyos resultados de portador como alelo ancestral se encuentra en reportes previos en la literatura, dónde se identifica como una variación predominante en una población Chilena con DMT2 (Lopez, Valenzuela et al. 2009). El presente resultado puede indicar que posiblemente el alelo ancestral para dichas modificaciones pueda estar implicado más con DMT2 que con los sujetos diabéticos del presente estudio, sin embargo, fue necesario indagar en la combinación de dichas variaciones para poder establecer índices de riesgo mayores. En los estudios de variaciones genéticas humanas, lo que se pretende resolver es: 1. Cuáles son los factores ambientales que determinan determinadas patologías (como son las enfermedades periodontales) y 2.Cuál es la constitución genética de los individuos dentro de las poblaciones (Solari and Roubicek 2014), por tal motivo, se analizaron nuestros resultados, comparándolos con los de otras poblaciones.

Consideramos relevante que, ocho genotipos y un alelo para la variación del gen variante IL1RN:c.215-516(86), no se presentara en ninguno de los 189 sujetos evaluados. En la literatura no se encuentran reportes que se asocien con DMT2, no así para Periodontitis, ya que algunas de las variaciones de este gen han sido previamente relacionadas con sujetos de origen Caucásico con periodontitis (Kornman, Pankow et al. 1999). Así mismo, los resultados para la variación TNF:c.[-488G>A] no concuerdan con los resultados de un estudio similar, dónde se evalúa a una población Taiwanesa, reportando que el alelo variante se encontró relacionado con individuos que presentaron DMT2 y altos niveles de glucosa (Lutfiyya, Sikka et al. 2009). Asimismo, para las variaciones: IL10:c.[-627T>G] e IL10:c.[-854T>C], nuestros resultados no concuerdan con los de un previo estudio, que reporta una estrecha relación entre los alelos variantes de IL10:c.[-627T>G] y DMT2, lo cual no se asoció en la población diabética del presente estudio (**tablas 6a y 6b**). Profundizando más en los reportes de variaciones polimórficas para poblaciones con DMT2, nos damos cuenta de la necesidad de ampliar con futuras investigaciones, el estudio de variaciones polimórficas para IL-4:c.[-34T>C] e IL-4:c.[-589T>C] ya que son genes variantes que se han encontrado estrechamente asociados con DMT2 (Lutfiyya, Sikka et al. 2009, Ho, Shiau et al. 2010).

La literatura reporta resultados controversiales en las variaciones polimórficas de citocinas relacionadas con DMT2 de distintas poblaciones. Mientras que en poblaciones Afro-Caribeñas la variación de IL6:c.[-237C] se reportó con una prevalencia de 4.45% en sujetos con DMT2 (Fishman, Faulds et al. 1998), en Hindúes Gujarati se reportó con un 13.85% (Fishman, Faulds et al. 1998), y en Españoles Caucásicos con un 62%. Diversos estudios sostienen que, específicamente el genotipo IL6:c.[-237CC] o ancestral, tiene estrecha relación con el incremento insulínico, en comparación con el alelo variante: IL6:c.[-237G] (Fernandez-Real, Broch et al. 2000, Shen, Arnett et al. 2008). Contradictoriamente, en los resultados del presente estudio, la variación homocigota del alelo variante IL6:c.[-237GG] se encontró con mayor proporción en sujetos con DMT2 (60.6%, $p<0.01$) y para la variación del genotipo heterocigoto (IL6:c.[-237CG]) con mayor proporción en sujetos no-DMT2 (25.6%, $p<0.05$) (**figura 5a**). Este último resultado fue concordante con un reporte dónde el genotipo IL6:c.[-237GG] se encontró asociado con sujetos diabéticos (DMT2) (Vozarova, Fernandez-Real et al. 2003), lo cual corrobora que, el ser portador de la variación polimórfica: IL6:c.[-237GG], influye en la susceptibilidad y riesgo de sujetos con DMT2 dependiendo de la población que se esté evaluando.

Otra variación genética que presentó mayor proporción en sujetos con DMT2 del presente estudio, fue la del genotipo heterocigoto: LTA:c.[-10+90AG] (60.6%, $p<0.01$), misma que no fue

reportada con asociación para DMT2 en sujetos taiwaneses (**figura 5**) (Yoshioka, Yoshida et al. 2006).

Para las variaciones de los genes de IL1A, IL1B e IL1RN, la asociación en sujetos con distintos tipos de periodontitis y DMT2, no fue relevante para el estudio mencionado previamente de la población Chilena, ya que, no encontraron asociación con DMT2, sin embargo, los genotipos IL1A:c.-889TT (RM=2.9) e IL1B:c.[-583CC] (RM=2.10), sí mostraron asociación significativa para periodontitis (Lopez, Valenzuela et al. 2009). La variación IL1B:c.[-583CC] ya había sido asociada en un estudio pasado, con periodontitis y DMT2 en una población Afro-Caribeña (Fishman, Faulds et al. 1998), concordante con el presente estudio, dónde presenta una proporción significativamente mayor para sujetos con DMT2 (RM=2.8, **Tabla 7**), además de la asociación con PG ya que este genotipo fue uno de los seleccionados para el modelo aditivo evaluado en nuestra población de estudio.

Tomando en conjunto la evidencia que reporta la literatura, sobre la asociación de variaciones polimórficas de citocinas moduladoras de la inflamación y DMT2, se decidió proceder a la búsqueda de un conjunto de variaciones, altamente asociadas con los sujetos diabéticos del presente estudio, considerando el mayor índice de riesgo con el grupo de sujetos con DMT2 y presentadas como una plantilla en generaciones de haplotipos que conformaron el modelo aditivo matemático presentado en el presente estudio. El modelo aditivo se compone por uno o más de los haplotipos seleccionados, con una RM de 8.07 para DMT2 entre otras significancias estadísticas (**figura 6**). De esta manera, es posible reportar la asociación de un marcador positivo para DMT2 y con mayor índice de riesgo para periodontitis, que para salud periodontal (RM=7.9 y 4.9 respectivamente) (**tabla 8**). El valor principal de dichos resultados es el de proporcionar un marcador predictivo, que permita indagar en las asociaciones, no sólo para variaciones polimórficas de manera individual, sino para generaciones de haplotipos que pudieran presentar un panorama más amplio de susceptibilidad y riesgo para presentar DMT2 y periodontitis generalizada. El diseño del modelo fue utilizado en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, dónde se pudo distinguir un marcador genético predictivo para sujetos con periodontitis agresiva de la clasificación de Armitage de 1999 (1999), en una población mexicana de sujetos sin compromiso sistémico (García-Lee 2009), sin embargo la aplicación del modelo en la población con DMT2 es novedoso.

En la evaluación microbiológica del presente estudio, nuestros resultados sugieren que, mientras la placa subgingival de sujetos con DMT2 presenta las mismas especies que los sujetos no-DMT2, por medio de la técnica de Checkerboard, y la presencia de 248 distintas "Taxa" por medio de la técnica de HOMIM, con especies identificadas en el microbioma oral humano (Chen, Yu et al.

2010, Escapa, Chen et al. 2018), en los análisis microbiológicos del grupo de sujetos con DMT2 del presente estudio, se observaron mayores cuentas totales promedio e individuales, así como mayor prevalencia en el total de las especies evaluadas (tanto en salud como en periodontitis generalizada). Dichos resultados concuerdan con estudios previos en la literatura dónde se reportan niveles y/o prevalencias mayores en especies identificadas en sujetos con DMT2 (Casarin, Barbagallo et al. 2013, Silva-Boghossian, Orrico et al. 2014). Sin embargo, ningún reporte previo ha incluido un gran número de muestras analizadas microbiológicamente tanto en sujetos sanos periodontales como en sujetos con periodontitis y particularmente, la diferenciación de sitios sanos con sitios enfermos de un mismo individuo como se presenta en el presente estudio.

Durante muchos años se había establecido, el concepto de que la microbiota subgingival entre sujetos no-DMT2 y con DMT2 era similar (Zambon, Reynolds et al. 1988, Collin, Uusitupa et al. 1998, Mealey 1999, Yuan, Chang et al. 2001). Adicionalmente, los primeros estudios microbiológicos de sujetos con DMT2, se enfocaron en evaluar especies patógenas principales que pudieran ser las causantes de la severidad de las enfermedades periodontales en dicha condición sistémica, además de sólo considerar en pasados estudios, a sujetos con periodontitis, dejando a un lado la condición de salud periodontal. Particularmente, algunos de los reportes pasados, han sugerido una microbiota característica en Periodontitis de sujetos tanto no diabéticos como con DMT2, que incluye especies patógenas como: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. corrodens* y *Treponema denticola* (Novaes Junior, Gonzalez Gutierrez et al. 1997, Collin, Uusitupa et al. 1998, Yuan, Chang et al. 2001). Los resultados del presente estudio no son concordantes con dichos resultados, ya que hemos determinado un número de especies que incluyen tanto compatibilidad con salud periodontal como: *A. georgiae*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *V. parvula* y *Gemella haemolysans* HOT-626 y especies patógenas putativas como: *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *S. artemidis*, *S. noxia*, *P. micra* y *P. nigrescens* detectadas con mayores cuentas y proporción en sujetos con DMT2, considerando ambas técnicas de identificación microbiana molecular (**tablas 10 y 12**).

Los resultados del presente estudio sugieren, una microbiota particular para sujetos con DMT2, común para sujetos tanto sanos periodontales como con periodontitis generalizada (**figuras 12 y 13**). Lo que resulta aún más particular, es que en las comparaciones microbiológicas exploratorias comparando a la población total de estudio (N=189) en grupos de sujetos sistémicamente sanos: no-DMT2 $n=118$, y con DMT2 $n=71$, pudimos observar el mismo perfil microbiológico en el grupo de DMT2, considerando que se encontraban mezclados los sujetos con

distinta condición periodontal, dónde las proporciones promedio por complejos bacterianos y, las proporciones de especies bacterianas individuales (**figuras 7 y 8**), predominaron en el complejo amarillo y el complejo naranja. Algunos estudios ya habían identificado niveles elevados de *S. sanguinis*, *S. oralis* y *S. intermedius* (Hintao, Teanpaisan et al. 2007) y prevalencia elevada de *P. nigrescens* y *C. rectus* en sitios con enfermedad periodontal de sujetos con DMT2 (Hintao, Teanpaisan et al. 2007, Ebersole, Holt et al. 2008). Recientes estudios a base de identificación molecular, por secuenciación de especies del HOMD, han identificado alta predominancia de especies de: *Veillonella* sp.(Casarin, Barbagallo et al. 2013), *Campylobacter* sp.(Tam, Hoffmann et al. 2018) y, *Capnocytophaga* sp.(Casarin, Barbagallo et al. 2013), en placa subgingival de sujetos con periodontitis y DMT2, e inclusive alta prevalencia de *P. micra* y *Prevotella* sp. en placa subgingival de sujetos con resistencia insulínica (Demmer, Breskin et al. 2017), concordante con los resultados del presente estudio.

En la actualidad, no se ha reportado en la literatura un perfil microbiológico similar al reportado en nuestras comparaciones, e inclusive asociando a alguna enfermedad sistémica en particular. Lo más cercano que pudimos asociar a este perfil, son reportes previos de la microbiota de sujetos con periodontitis refractaria dónde dos perfiles microbiológicos o “clusters” describieron tener una mayor proporción en especies de *Streptococcus*, y elevadas proporciones de especies patógenas putativas del complejo naranja (Socransky, Smith et al. 2002). Sin embargo, podemos decir que hacen falta futuros estudios que ayuden a esclarecer el entendimiento de la similitud entre los perfiles de estos individuos con periodontitis refractaria y los sujetos con DMT2 y factores de riesgo adicional que altere su estado metabólico, esto incluye estudios que evalúen la obesidad y el perfil microbiológico de los sujetos con DMT2 como factores de riesgo considerados de forma independiente (Maciel, Feres et al. 2016, Tam, Hoffmann et al. 2018). Lo que podemos especular, es que la disbiosis en la biopelícula por una microflora más “simple” en sujetos con DMT2, se encuentran estrechamente relacionadas con deficiencias inmunológicas que pueden llevar a los cambios de la microbiota subgingival en dichos individuos, y por su puesto en su estado metabólico, como se ha reportado recientemente en la literatura (Hong, Furtado Araujo et al. 2015, Demmer, Breskin et al. 2017).

Así mismo, en la búsqueda más particular de un mayor número especies con la técnica de HOMIM, en relación con sitios sanos y sitios con enfermedad periodontal de sujetos con DMT2 sanos periodontales y con periodontitis, sólo se encontró una diferencia significativa entre grupos, para la sonda: *Streptococcus salivarius* HOT-755 / *Streptococcus vestibularis* HOT-021 /

Streptococcus sp. HOT-067_E34. Con lo cual podemos corroborar la similitud de la flora bajo distintas condiciones periodontales (SP y PG), excepto por los tres “Taxa” de *Streptococcus* que presentaron frecuencias significativamente mayores en sujetos sanos periodontales con DMT2 del presente estudio (**figura 16**).

En cuanto a las características microbiológicas por sitio sanos y con periodontitis, se considera hubiera enriquecido en el presente estudio, el análisis de un mayor número de muestras, con la finalidad de establecer la asociación de especies del microbioma oral humano con los parámetros clínicos periodontales, como el resultado de especies putativas de *Campylobacter* sp. con sangrado al sondeo (**figura 17**); además de poder corroborar la diferencia en la distribución de microbiota subgingival entre sitios sanos y enfermos de sujetos con periodontitis generalizada de sujetos con DMT2, ya que el análisis de PGA mostró únicamente una distribución distinta entre sitios sanos del grupo de salud periodontal y sitios enfermos de periodontitis generalizada de los sujetos con DMT2 evaluados (**figura 18**). De las especies asociadas con el parámetro clínico de sangrado al sondeo: SR1[G-1] sp. HOT-345,874_AC72; *C. concisus* HOT-575/ *Campylobacter rectus* HOT-748_X36; y *R. mucilaginosa* HOT-681_AB63, la especie 345 de SR1 es de reciente identificación en el ser humano, identificada como una especie no cultivable de la cavidad oral, sin embargo, en la actualidad no se le ha encontrado asociación a alguna patología específica (Chen, Yu et al. 2010). El caso de las especies de *Campylobacter*, son especies patógenas putativas que pueden estar involucradas en el desarrollo de las enfermedades periodontales (Figuras 1 y 2), y el caso de *R. mucilaginosa*, es una especie considerada patógena oportunista asociado a bacteriemia e infecciones severas respiratorias (Ramos, Mateo et al. 2014), aunque no se le ha encontrado asociación con infecciones en cavidad oral.

Cada vez con mayor frecuencia, diversos estudios reportan la baja prevalencia de especies del complejo rojo como: *Porphyromonas* sp. y *Tanerella* sp. en la microbiota de sujetos con DMT2 y periodontitis (Sardi, Duque et al. 2011, Casarin, Barbagallo et al. 2013, Castrillon, Hincapie et al. 2013, Zhou, Rong et al. 2013). En el presente estudio, a pesar de no haber sido significativas las diferencias entre grupos no-DMT2 y DMT2 para la proporción especies patógenas periodontales de manera individual, las proporciones para el complejo rojo fueron mayores para el grupo de periodontitis generalizada y DMT2 en comparación al grupo PG no-DMT2. Estudios similares de reciente aparición, ya habían reportado resultados comparando la composición de placa subgingival de sujetos no-DMT2 y con DMT2 con periodontitis severa, por medio de secuenciación de la fracción 16S rDNA (Casarin, Barbagallo et al. 2013). En este estudio confirmaron la disminución en la

prevalencia de especies patógenas reconocidas y patógenas putativas tales como: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Eubacterium* sp. y *Treponema* sp. En sujetos con DMT2 en comparación a los no-DMT2. En un estudio similar, el complejo rojo también fue identificado en bajas frecuencias, en sujetos con PG DMT2 en comparación a PG no-DMT2, y específicamente *P. gingivalis* fue asociado a periodontitis en únicamente sujetos no-DMT2 (Castrillon, Hincapie et al. 2013).

Las características de la microbiota de los sujetos no diabéticos del presente estudio, concuerdan con la literatura reportada, dónde tanto en prevalencia como en proporción, las especies patógenas del complejo rojo se encuentran con promedios mayores para PG en comparación a SP, proporcional a la disminución de especies de *Actinomyces*, lo cual es considerado como el perfil clásico de periodontitis (Ximenez-Fyvie, Haffajee et al. 2000, Socransky and Haffajee 2005) inclusive en la población mexicana (Ximenez-Fyvie, Almaguer-Flores et al. 2006), no así para los grupos de DMT2 dónde las diferencias microbiológicas encontradas fueron mínimas.

A pesar de que no es claro si los niveles de HGA1c y las dislipidemias contribuyen en la disbiosis de la microbiota oral de sujetos con DMT2 (Allen, Matthews et al. 2011, Polak and Shapira 2018, Tam, Hoffmann et al. 2018), la asociación con la severidad de la periodontitis y altos niveles de HGA1c, lípidos de baja densidad, colesterol total y triglicéridos totales se encuentra bien establecida (D'Aiuto, Gkrantias et al. 2018, Dhir, Wangnoo et al. 2018). La única evidencia encontrada en nuestros resultados es la de sujetos con pobre control de hemoglobina glucosilada (HGA1c>8%), que se encuentra altamente relacionada con la presencia de sitios con sangrado al sondeo, así como elevados promedios de profundidad de bolsa, esto en el grupo de periodontitis generalizada y DMT2. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura dónde, HGA1c es el único elemento al que se le ha encontrado relación con parámetros clínicos de periodontitis (Loe 1993, Tsai, Hayes et al. 2002, Karima, Kantarci et al. 2005). Adicionalmente, de los parámetros evaluados en los sujetos diabéticos del presente estudio, el único que presentó correlación positiva para periodontitis en DMT2, fue el de tratamiento farmacológico para DM (%) (**tabla 3**), queriendo decir que tanto el pobre control hipoglicémico aunado a la carencia de tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes se encuentra estrechamente asociado con los sujetos con periodontitis y DMT2.

Por otro lado, no hay evidencia clara que compruebe que la microflora subgingival se modifique por alteraciones en niveles alterados de HGA1c, lípidos totales, triglicéridos totales, colesterol total, lípidos de baja y alta densidad. Algunos reportes no han podido establecer la relación entre distintos niveles de HGA1c (Makiura, Ojima et al. 2008, Casarin, Barbagallo et al. 2013), glucosa en plasma y triglicéridos totales (Ma, Pan et al. 2010), con los cambios

microbiológicos subgingivales, similar a los resultados del presente estudio. La única excepción fue la alta proporción de tres especies con las dislipidemias de: lípidos de baja densidad ($HDL \leq 45$) correlacionado con *V. parvula* y *A. viscosus* (CC: 0.31 Rho: 0.034 y CC: 0.30, Rho: 0.036 respectivamente) y, triglicéridos totales ($TT \geq 150$) relacionado con altas proporciones de *T. forsythia* (CC: 0.31 Rho: 0.033). Siendo esta última relevante por ser una especie periodontopatógena, sin embargo, con los resultados de correlación microbiológica y distintos parámetros de la bioquímica sanguínea, no podemos definir en qué momentos la especie patógena *T. forsythia* deja de ser predominante en los sujetos con DMT2 del presente estudio.

Finalmente, para los análisis de correlación entre los sujetos portadores del modelo aditivo propuesto como marcador para DMT2 y asociado a periodontitis generalizada, no se encontró un perfil microbiológico particular asociado al marcador genético, esto fue analizando las proporciones por especies bacterianas individuales por medio de la técnica de Checkerboard. Una posibilidad de no haber encontrado la asociación es que los sujetos con DMT2 al portar un perfil microbiológico similar entre grupos de sujetos sanos periodontales y con periodontitis generalizada, corroborado con dos técnicas de identificación molecular, la eficacia del modelo aditivo podría ser específica de para sujetos con periodontitis generalizada. Con lo que, se podría hipotetizar que las diferencias que encontremos microbiológicas no dependerán de las características genéticas de los individuos. La microbiota de los sujetos con DMT2 por sí sola, es una característica de las condiciones metabólicas y sistémicas que comparten por presentar DMT2. Por otro lado, las características genéticas de los individuos portadores del marcador son características endógenas que pueden llevar a estos individuos a la severidad y progresión de la periodontitis aunado a su condición de diabetes.

CONCLUSIONES

El uso del modelo aditivo tiene mayor exactitud que la asociación de cada variación polimórfica de manera individual, o a cada generación de haplotipos, con lo cual podemos sugerir que se ha identificado un posible marcador de riesgo para DMT2, que además se relaciona con la periodontitis generalizada de dichos individuos.

Por otro lado, los resultados microbiológicos nos proporcionaron información descriptiva de las características etiológicas que prevalecen en los sujetos con DMT2, lo que denominamos un perfil microbiológico propio de DMT2, con predominio en cuentas, prevalencia y proporción de *Streptococcus* sp., especies del complejo morado y predominio en especies patógenas putativas

independientemente de la condición periodontal. Por otro lado, lo caracteriza la disminución de especies periodontopatógenas del complejo rojo.

En cuanto al pobre control metabólico de los sujetos de estudio, ningún nivel de los elementos en sangre evaluados con excepción de HGA1c, tienen asociación con las características clínicas periodontales relacionadas con progresión y establecimiento de la periodontitis en los sujetos con DMT2. EL pobre control de HGA1c, tiene una estrecha relación con la periodontitis, al encontrarse asociada a los parámetros clínicos periodontales de profundidad de bolsa y sangrado al sondeo.

Como alcances para un futuro estudio, sería conveniente ampliar el análisis de variaciones polimórficas, por ejemplo, el agregar variaciones genéticas como: IL-4:c.[-34T>C] e IL-4:c.[-589T>C]. Y en el análisis microbiológico, el analizar un mayor número de muestras tanto de sitios sanos como de sitios con periodontitis en distintos grados de severidad y complejidad, de acuerdo con la nueva clasificación, para el análisis de un mayor número de especies considerando las variables de hemoglobina glucosilada, obesidad y perfil lipídico de los individuos tanto para sujetos no diabéticos como diabéticos.

Para concluir, los sujetos del presente estudio presentaron un perfil genético polimórfico, con índices de riesgo para DMT2, asociado con periodontitis generalizada. El perfil microbiológico subgingival de sujetos con DMT2, fue significativo para especies no patógenas y putativas periodontales, mismo que se encontró en estrecha relación con el estado metabólico de los individuos, y no así para el perfil genético asociado a diabetes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allen, E. M., J. B. Matthews, O. H. DJ, H. R. Griffiths and I. L. Chapple (2011). "Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis." J Clin Periodontol **38**(10): 894-901.
2. Armitage, G. C. (2004). "The complete periodontal examination." Periodontol 2000 **34**: 22-33.
3. Atsumi, T., Y. R. Cho, L. Leng, C. McDonald, T. Yu, C. Danton, E. G. Hong, R. A. Mitchell, C. Metz, H. Niwa, J. Takeuchi, S. Onodera, T. Umino, N. Yoshioka, T. Koike, J. K. Kim and R. Bucala (2007). "The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation." J Immunol **179**(8): 5399-5406.
4. Banerjee, M. and M. Saxena (2014). "Genetic polymorphisms of cytokine genes in type 2 diabetes mellitus." World journal of diabetes **5**(4): 493.
5. Barquera, S., I. Campos-Nonato, C. Aguilar-Salinas, R. Lopez-Ridaura, A. Arredondo and J. Rivera-Dommarco (2013). "Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy." Global Health **9**: 3.

6. Caffesse, R. G., M. R. De LaRosa, M. G. De LaRosa and L. F. Mota (2002). "Prevalence of interleukin 1 periodontal genotype in a Hispanic dental population." Quintessence international **33**(3).
7. Casarin, R. C., A. Barbagallo, T. Meulman, V. R. Santos, E. A. Sallum, F. H. Nociti, P. M. Duarte, M. Z. Casati and R. B. Goncalves (2013). "Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis." J Periodontal Res **48**(1): 30-36.
8. Castrillon, C. A., J. P. Hincapie, F. L. Yepes, N. Roldan, S. M. Moreno, A. Contreras and J. E. Botero (2013). "Occurrence of red complex microorganisms and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with diabetes." J Investig Clin Dent.
9. Caton, G., G. Armitage, T. Berglundh, I. Chapple, S. Jepsen, K. Kornman, B. Mealey, P. N. Papapanou, M. Sanz and M. Tonetti (2018). "A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification." J Clin Periodontol **45 Suppl 20**: S1-S8.
10. Ciantar, M., M. Gilthorpe, S. Hurel, H. Newman, M. Wilson and D. Spratt (2005). "*Capnocytophaga* spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus." J Periodontol **76**(2): 194-203.
11. Clark, C. M., Jr. and D. A. Lee (1995). "Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus." N Engl J Med **332**(18): 1210-1217.
12. Collin, H. L., M. Uusitupa, L. Niskanen, V. Kontturi-Narhi, H. Markkanen, A. M. Koivisto and J. H. Meurman (1998). "Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus." J Periodontol **69**(9): 962-966.
13. Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber and G. James (1994). "Biofilms, the customized microniche." J Bacteriol **176**(8): 2137-2142.
14. Cutler, C. W., R. L. Machen, R. Jotwani and A. M. Iacopino (1999). "Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia." J Periodontol **70**(11): 1313-1321.
15. Chang, Y., C. Huang and M. Shiao (2009). "Cytokines, Metabolism, and Type 2 Diabetes Mellitus." J Biomed Lab Sci **21**(4): 112-117.
16. Chen, D., T.-I. Zhang and X. Wang (2016). "Association between polymorphisms in interleukins 4 and 13 genes and chronic periodontitis in a Han Chinese population." BioMed research international **2016**.
17. Chen, T., W. H. Yu, J. Izard, O. V. Baranova, A. Lakshmanan and F. E. Dewhirst (2010). "The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information." Database (Oxford) **2010**: baq013.
18. D'Aiuto, F., N. Gkraniias, D. Bhowruth, T. Khan, M. Orlandi, J. Suvan, S. Masi, G. Tsakos, S. Hurel, A. D. Hingorani, N. Donos, J. E. Deanfield and T. Group (2018). "Systemic effects of periodontitis treatment in patients with type 2 diabetes: a 12 month, single-centre, investigator-masked, randomised trial." Lancet Diabetes Endocrinol **6**(12): 954-965.
19. Demmer, R. T., A. Breskin, M. Rosenbaum, A. Zuk, C. LeDuc, R. Leibel, B. Paster, M. Desvarieux, D. R. Jacobs, Jr. and P. N. Papapanou (2017). "The subgingival microbiome, systemic inflammation and insulin resistance: The Oral Infections, Glucose Intolerance and Insulin Resistance Study." J Clin Periodontol **44**(3): 255-265.

20. Deng, Z.-L., S. P. Szafranski, M. Jarek, S. Bhujra and I. Wagner-Döbler (2017). "Dysbiosis in chronic periodontitis: key microbial players and interactions with the human host." Scientific reports **7**(1): 3703.
21. Dhir, S., S. Wangnoo and V. Kumar (2018). "Impact of Glycemic Levels in Type 2 Diabetes on Periodontitis." Indian J Endocrinol Metab **22**(5): 672-677.
22. Duran-Pinedo, A. E., T. Chen, R. Teles, J. R. Starr, X. Wang, K. Krishnan and J. Frias-Lopez (2014). "Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis." The ISME journal **8**(8): 1659.
23. Ebersole, J. L., S. C. Holt, R. Hansard and M. J. Novak (2008). "Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes." J Periodontol **79**(4): 637-646.
24. Engler-Blum, G., M. Meier, J. Frank and G. A. Muller (1993). "Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations." Anal Biochem **210**(2): 235-244.
25. Escapa, I. F., T. Chen, Y. Huang, P. Gajare, F. E. Dewhirst and K. P. Lemon (2018). "New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract." mSystems **3**(6).
26. Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.
27. Fernandez-Real, J. M., M. Broch, J. Vendrell, C. Gutierrez, R. Casamitjana, M. Pugeat, C. Richart and W. Ricart (2000). "Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity." Diabetes **49**(3): 517-520.
28. Fishman, D., G. Faulds, R. Jeffery, V. Mohamed-Ali, J. Yudkin, S. Humphries and P. Woo (1998). "The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis." J Clin Invest **102**(7): 1369-1376.
29. Foster, J., R. Palmer and P. Kolenbrander (2003). "Human oral cavity as a model for the study of genome-genome interactions." Biol Bull **204**(2): 200-204.
30. García-Chapa, E. G., E. Leal-Ugarte, V. Peralta-Leal, J. Durán-González and J. P. Meza-Espinoza (2017). "Genetic epidemiology of type 2 diabetes in Mexican mestizos." BioMed research international **2017**.
31. García-Lee, V. (2009). Distribución de variaciones genéticas en los genes IL6, IL8, IL10, IL12B, TNF y LTA en sujetos mexicanos con periodontitis crónica y agresiva generalizadas. Tesis de Maestría, Universidad nacional Autónoma de México.
32. Gibbons, R. J., D. I. Hay, W. C. d. Childs and G. Davis (1990). "Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces." Arch Oral Biol **35**(Suppl): 107S-114S.
33. Gomes, S. C., C. Nonnenmacher, C. Susin, R. V. Oppermann, R. Mutters and R. A. Marcantonio (2008). "The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction." J Periodontol **79**(12): 2297-2304.

34. Griffen, A. L., C. J. Beall, J. H. Campbell, N. D. Firestone, P. S. Kumar, Z. K. Yang, M. Podar and E. J. Leys (2012). "Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing." *ISME J* **6**(6): 1176-1185.
35. Guglielmetti, M. R., E. F. Rosa, D. S. Lourencao, G. Inoue, E. F. Gomes, G. De Micheli, F. M. Mendes, R. D. Hirata, M. H. Hirata and C. M. Pannuti (2014). "Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction." *J Periodontol* **85**(10): 1450-1457.
36. Haffajee, A. D. and S. S. Socransky (1994). "Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases." *Periodontol 2000* **5**: 78-111.
37. Haffajee, A. D. and S. S. Socransky (2001). "Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles." *J Clin Periodontol* **28**(4): 283-295.
38. Haffajee, A. D., S. S. Socransky and J. M. Goodson (1983). "Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity." *J Clin Periodontol* **10**(3): 257-265.
39. Hajishengallis, G. (2014). "Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response." *Trends Immunol* **35**(1): 3-11.
40. He, J., I. Usui, K. Ishizuka, Y. Kanatani, K. Hiratani, M. Iwata, A. Bukhari, T. Haruta, T. Sasaoka and M. Kobayashi (2006). "Interleukin-1alpha inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Endocrinol* **20**(1): 114-124.
41. Hintao, J., R. Teanpaisan, V. Chongsuvivatwong, C. Ratarasan and G. Dahlen (2007). "The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus." *Oral Microbiol Immunol* **22**(3): 175-181.
42. Ho, K.-T., M.-Y. Shiao, Y.-H. Chang, C.-M. Chen, S.-C. Yang and C.-N. Huang (2010). "Association of interleukin-4 promoter polymorphisms in Taiwanese patients with type 2 diabetes mellitus." *Metabolism* **59**(12): 1717-1722.
43. Hong, B. Y., M. V. Furtado Araujo, L. D. Strausbaugh, E. Terzi, E. Ioannidou and P. I. Diaz (2015). "Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics." *PLoS One* **10**(5): e0127077.
44. Hotamisligil, G. S. and B. M. Spiegelman (1994). "Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link." *Diabetes* **43**(11): 1271-1278.
45. IDF (2017). *Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation.
46. "International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions." (1999). *Ann Periodontol* **4**(1): i, 1-112.
47. Irfan, U., D. Dawson and N. Bissada (2001). "Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives." *J Int Acad Periodontol* **3**(1): 14-21.
48. Jhajharia, K., A. Parolia, K. V. Shetty and L. K. Mehta (2015). "Biofilm in endodontics: a review." *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* **5**(1): 1.
49. Kanety, H., R. Feinstein, M. Z. Papa, R. Hemi and A. Karasik (1995). "Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1." *J Biol Chem* **270**(40): 23780-23784.

50. Karima, M., A. Kantarci, T. Ohira, H. Hasturk, V. L. Jones, B. H. Nam, A. Malabanan, P. C. Trackman, J. A. Badwey and T. E. Van Dyke (2005). "Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis." J Leukoc Biol **78**(4): 862-870.
51. Kinane, D. F., P. G. Stathopoulou and P. N. Papapanou (2017). "Periodontal diseases." Nature Reviews Disease Primers **3**: 17038.
52. Kolenbrander, P. E. (2000). "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems." Annu Rev Microbiol **54**: 413-437.
53. Kornman, K. and P. Poverini (2014). "Clinical application of genetics to guide prevention and treatment of oral diseases." Clinical genetics **86**(1): 44-49.
54. Kornman, K. S. (2018). "Contemporary approaches for identifying individual risk for periodontitis." Periodontology 2000 **78**(1): 12-29.
55. Kornman, K. S. and F. S. di Giovine (1998). "Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis." Ann Periodontol **3**(1): 327-338.
56. Kornman, K. S., J. Pankow, S. Offenbacher, J. Beck, F. di Giovine and G. W. Duff (1999). "Interleukin-1 genotypes and the association between periodontitis and cardiovascular disease." J Periodontal Res **34**(7): 353-357.
57. Lang, N. P. and J. Lindhe (2015). Clinical periodontology and implant dentistry, 2 Volume Set, John Wiley & Sons.
58. Li, C., J. Liu, L. Tan, N. Yu, L. Lin, F. Geng, D. Zhang and Y. Pan (2013). "The sociodemographic characteristics, periodontal health status, and subgingival microbiota of patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: a case-control study in a Chinese population." J Periodontol **84**(8): 1058-1066.
59. Lindhe, J., T. Karring and P. Lang (1998). Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Copenhagen, Munksgaard.
60. Lindhe, J. and P. Lang (2015). Clinical periodontology and implant dentistry, Chichester, West Sussex, England, Wiley Blackwell.
61. Ling, P. R., B. R. Bistran, B. Mendez and N. W. Istfan (1994). "Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat: relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake." Metabolism **43**(3): 279-284.
62. Loe, H. (1993). "Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus." Diabetes Care **16**(1): 329-334.
63. Lopez, N. J., C. Y. Valenzuela and L. Jara (2009). "Interleukin-1 gene cluster polymorphisms associated with periodontal disease in type 2 diabetes." J Periodontol **80**(10): 1590-1598.
64. Lutfiyya, M. N., A. Sikka, S. Mehta and M. S. Lipsky (2009). "Comparison of US accredited and non-accredited rural critical access hospitals." Int J Qual Health Care **21**(2): 112-118.
65. Ma, L., Y. P. Pan and J. Q. Zhang (2010). "[Study of putative periodontal pathogens colonies in type 2 diabetes with chronic periodontitis]." Shanghai Kou Qiang Yi Xue **19**(6): 611-615.

66. Maciel, S. S., M. Feres, T. E. Goncalves, G. S. Zimmermann, H. D. da Silva, L. C. Figueiredo and P. M. Duarte (2016). "Does obesity influence the subgingival microbiota composition in periodontal health and disease?" J Clin Periodontol **43**(12): 1003-1012.
67. Makiura, N., M. Ojima, Y. Kou, N. Furuta, N. Okahashi, S. Shizukuishi and A. Amano (2008). "Relationship of Porphyromonas gingivalis with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment." Oral Microbiol Immunol **23**(4): 348-351.
68. Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. BMC Oral health, BioMed Central.
69. Mealey, B. (1999). "Diabetes and periodontal diseases." J Periodontol **70**(8): 935-949.
70. Mealey, B. L. and A. J. Moritz (2003). "Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium." Periodontol 2000 **32**: 59-81.
71. Merino, J., M. S. Udler, A. Leong and J. B. Meigs (2017). "A decade of genetic and metabolomic contributions to type 2 diabetes risk prediction." Current diabetes reports **17**(12): 135.
72. Moore, W. E. and L. V. Moore (1994). "The bacteria of periodontal diseases." Periodontol 2000 **5**: 66-77.
73. Nishihara, T. and T. Koseki (2004). "Microbial etiology of periodontitis." Periodontol 2000 **36**: 14-26.
74. Novaes Junior, A. B., F. Gonzalez Gutierrez, M. F. Grisi and A. B. Novaes (1997). "Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part II--Microbiological analysis using the BANA test." Braz Dent J **8**(1): 27-33.
75. Oda, K., N. Tanaka, T. Arai, J. Araki, Y. Song, L. Zhang, A. Kuchiba, T. Hosoi, T. Shirasawa, M. Muramatsu and M. Sawabe (2007). "Polymorphisms in pro- and anti-inflammatory cytokine genes and susceptibility to atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases." Hum Mol Genet **16**(6): 592-599.
76. Ojima, M., M. Takeda, H. Yoshioka, M. Nomura, N. Tanaka, T. Kato, S. Shizukuishi and A. Amano (2005). "Relationship of periodontal bacterium genotypic variations with periodontitis in type 2 diabetic patients." Diabetes Care **28**(2): 433-434.
77. Papapanou, P. N. (1996). "Periodontal diseases: epidemiology." Ann Periodontol **1**(1): 1-36.
78. Papapanou, P. N., M. Sanz, N. Buduneli, T. Dietrich, M. Feres, D. H. Fine, T. F. Flemmig, R. Garcia, W. V. Giannobile, F. Graziani, H. Greenwell, D. Herrera, R. T. Kao, M. Kerschull, D. F. Kinane, K. L. Kirkwood, T. Kocher, K. S. Kornman, P. S. Kumar, B. G. Loos, E. Machtei, H. Meng, A. Mombelli, I. Needleman, S. Offenbacher, G. J. Seymour, R. Teles and M. S. Tonetti (2018). "Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions." J Periodontol **89 Suppl 1**: S173-S182.
79. Paster, B., S. Boches, J. Galvin, R. Ericson, C. Lau, V. Levanos, A. Sahasrabudhe and F. Dewhirst (2001). "Bacterial diversity in human subgingival plaque." J Bacteriol **183**(12): 3770-3783.
80. Paster, B. J. and F. E. Dewhirst (2009). "Molecular microbial diagnosis." Periodontol 2000 **51**: 38-44.

81. Paster, B. J., I. Olsen, J. A. Aas and F. E. Dewhirst (2006). "The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites." Periodontol 2000 **42**: 80-87.
82. Pérez-Soria, A., V. García-Lee, A. P. Rodríguez-Hernández, D. Carrasco-Ortíz, I. Madrigal-Escalera, A. P. Póntigo-Loyola, M. L. Márquez-Corona and L. A. Ximénez-Fyvie (2008). Distribution of Polymorphic Genotypes in Indigenous and Non-Indigenous Mexican Populations. IADR 86th General Session & Exhibition. Troronto, Ontario.
83. Polak, D. and L. Shapira (2018). "An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes." J Clin Periodontol **45**(2): 150-166.
84. Qi, L., N. Rifai and F. B. Hu (2007). "Interleukin-6 receptor gene variations, plasma interleukin-6 levels, and type 2 diabetes in U.S. Women." Diabetes **56**(12): 3075-3081.
85. Ramos, J. M., I. Mateo, I. Vidal, E. M. Rosillo, E. Merino and J. Portilla (2014). "[Infection due to *Rothia mucilaginosa*. A respiratory pathogen?]." Enferm Infecc Microbiol Clin **32**(5): 306-309.
86. Rayfield, E. J., M. J. Ault, G. T. Keusch, M. J. Brothers, C. Nechemias and H. Smith (1982). "Infection and diabetes: the case for glucose control." Am J Med **72**(3): 439-450.
87. Sanz, M., A. Ceriello, M. Buysschaert, I. Chapple, R. T. Demmer, F. Graziani, D. Herrera, S. Jepsen, L. Lione, P. Madianos, M. Mathur, E. Montanya, L. Shapira, M. Tonetti and D. Vegh (2018). "Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology." J Clin Periodontol **45**(2): 138-149.
88. Sardi, J. C., C. Duque, G. A. Camargo, J. F. Hofling and R. B. Goncalves (2011). "Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis--a pilot study." Arch Oral Biol **56**(10): 1098-1105.
89. Shen, J., D. K. Arnett, P. Perez-Martinez, L. D. Parnell, C. Q. Lai, J. M. Peacock, J. E. Hixson, M. Y. Tsai, R. J. Straka, P. N. Hopkins and J. M. Ordovas (2008). "The effect of IL6-174C/G polymorphism on postprandial triglyceride metabolism in the GOLDN studyboxes." J Lipid Res **49**(8): 1839-1845.
90. Ship, J. A. (1999). Clinician's guide to oral health in geriatric patients. The American Academy of Oral Medicine. A. R. Mohammad: 39.
91. Silva-Boghossian, C. M., S. R. Orrico, D. Goncalves, F. O. Correa and A. P. Colombo (2014). "Microbiological changes after periodontal therapy in diabetic patients with inadequate metabolic control." Braz Oral Res **28**(1).
92. Smith, G. L., S. S. Socransky and C. Sansone (1989). ""Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms." Oral Microbiol Immunol **4**(3): 141-145.
93. Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (1991). "Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment." J Periodontal Res **26**(3 Pt 2): 195-212.
94. Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). "Periodontal microbial ecology." Periodontol 2000 **38**: 135-187.

95. Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." J Clin Periodontol **25**(2): 134-144.
96. Socransky, S. S., C. Smith and A. D. Haffajee (2002). "Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease." J Clin Periodontol **29**(3): 260-268.
97. Socransky, S. S., C. Smith, L. Martin, B. J. Paster, F. E. Dewhirst and A. E. Levin (1994). ""Checkerboard" DNA-DNA hybridization." Biotechniques **17**(4): 788-792.
98. Solari, A. J. and R. Roubicek (2014). Genética humana : fundamentos y aplicaciones en medicina, Argentina, Editorial Médica Panamericana.
99. Somm, E., P. Cettour-Rose, C. Asensio, A. Charollais, M. Klein, C. Theander-Carrillo, C. E. Juge-Aubry, J. M. Dayer, M. J. Nicklin, P. Meda, F. Rohner-Jeanrenaud and C. A. Meier (2006). "Interleukin-1 receptor antagonist is upregulated during diet-induced obesity and regulates insulin sensitivity in rodents." Diabetologia **49**(2): 387-393.
100. Strużycka, I. (2014). "The oral microbiome in dental caries." Pol J Microbiol **63**(2): 127-135.
101. Takashiba, S. and K. Naruishi (2006). "Gene polymorphisms in periodontal health and disease." Periodontology 2000 **40**(1): 94-106.
102. Takashiba, S. and K. Naruishi (2006). "Gene polymorphisms in periodontal health and disease." Periodontol 2000 **40**: 94-106.
103. Tam, J., T. Hoffmann, S. Fischer, S. Bornstein, J. Grassler and B. Noack (2018). "Obesity alters composition and diversity of the oral microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus independently of glycemic control." PLoS One **13**(10): e0204724.
104. Tanner, A. and J. Goodson (1986). "Sampling of microorganisms associated with periodontal disease." Oral microbiology and immunology **1**(1): 15-20.
105. Taylor, G. W. (2001). "Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective." Ann Periodontol **6**(1): 99-112.
106. Teles, R., F. Teles, J. Frias-Lopez, B. Paster and A. Haffajee (2013). "Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology." Periodontol 2000 **62**(1): 95-162.
107. Teles, R., F. Teles, J. Frias-Lopez, B. Paster and A. Haffajee (2013). "Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology." Periodontology 2000 **62**(1): 95-162.
108. Tervonen, T. and R. C. Oliver (1993). "Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis." J Clin Periodontol **20**(6): 431-435.
109. Tervonen, T., R. C. Oliver, L. F. Wolff, J. Bereuter, L. Anderson and D. M. Aepli (1994). "Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus." J Clin Periodontol **21**(6): 375-379.
110. Tsai, C., C. Hayes and G. W. Taylor (2002). "Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population." Community Dent Oral Epidemiol **30**(3): 182-192.
111. Vozarova, B., J. M. Fernandez-Real, W. C. Knowler, L. Gallart, R. L. Hanson, J. D. Gruber, W. Ricart, J. Vendrell, C. Richart, P. A. Tataranni and J. K. Wolford (2003). "The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians." Hum Genet **112**(4): 409-413.

112. Wang, Y., M. Goodman, J. Lumerman, K. E. Sussman, R. Dahl, K. J. Lafferty and B. Draznin (1989). "In vivo administration of interleukin-1 inhibits glucose-stimulated insulin release." Diabetes Res Clin Pract **7**(3): 205-211.
113. WHO (2014). Global Status Report on noncommunicable diseases. Switzerland, World Health Organization Library Cataloguing in Publication Data: 280.
114. Ximenez-Fyvie, L. A., A. Almaguer-Flores, V. Jacobo-Soto, M. Lara-Cordoba, L. O. Sanchez-Vargas and E. Alcantara-Maruri (2006). "Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health." J Periodontol **77**(3): 460-471.
115. Ximenez-Fyvie, L. A., A. D. Haffajee and S. S. Socransky (2000). "Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis." J Clin Periodontol **27**(10): 722-732.
116. Yoshioka, K., T. Yoshida, T. Umekawa, Y. Takakura, A. Kogure, H. Toda and T. Yoshikawa (2006). "Association study of the 804C/A and 252A/G polymorphisms in the lymphotoxin-alpha gene for microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients." Horm Metab Res **38**(11): 773-775.
117. Yuan, K., C. J. Chang, P. C. Hsu, H. S. Sun, C. C. Tseng and J. R. Wang (2001). "Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction." J Periodontal Res **36**(1): 18-24.
118. Zambon, J. J., H. Reynolds, J. G. Fisher, M. Shlossman, R. Dunford and R. J. Genco (1988). "Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus." J Periodontol **59**(1): 23-31.
119. Zhou, M., R. Rong, D. Munro, C. Zhu, X. Gao, Q. Zhang and Q. Dong (2013). "Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing." PLoS One **8**(4): e61516.

TABLAS

Tabla 1. Criterios de selección para la clasificación de sujetos por su estado de salud periodontal.

Grupo	No. de dientes	Edad	Clasificación	Otros criterios
SP no-DMT2				Mexicanos por nacimiento con ascendencia de padres y por lo menos 2 abuelos mexicanos.
SP DMT2			≤4 sitios con NI ÷ 3-4 mm y 0 sitios con NI ≥5 mm	Sin tratamiento periodontal previo.
PG no-DMT2	≤20	≥25		Sin embarazo o en lactancia. Sin enfermedades sistémicas- No-DMT2: glucosa en ayuno ≤100mg/dl.
PG DMT2			≥8 sitios con NI ≥5 mm ≥30% sitios con NI ≥5mm	DMT2: glucosa en ayuno ≤126mg/dl, no insulino dependientes. Sin toma de antibióticos (3 meses previo a la evaluación microbiológica).

SP: salud periodontal; **PG:** periodontitis generalizada; **No-DMT2:** no diabéticos; **DMT2:** diabetes mellitus tipo 2. **NI:** niveles de inserción.

Tabla 2a. Descripción de las variaciones genéticas.

	IL1A:c.-949C>T	IL1B:c.315C>T	IL1B:c.-583T>C	IL1RN:c.215-516ATCCTGGGGAAAG TGAGGGAAATATGGACATCACATGG AACACATCCAGGAGACTCAGGCCTC TAGGAGTAACTGGGTAGTGTGC(2_6)	IL6:c.-237C>G	IL8:c.-352A>T
Gen:						
ID en NCBI	3552	3553	3553	3557	3569	3576
Versión (Build)	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3
Símbolo	IL1A	IL1B	IL1B	IL1RN	IL6	IL8
Nombre oficial	Interleucina 1, alfa	Interleucina 1, beta	Interleucina 1, beta	Interleucina 1, antagonista del receptor (isoforma 1, precursor)	Interleucina 6	Interleucina 8
Localización	chr2q14	chr2q14	chr2q14	chr2q14.2	chr7p21	chr4q13-q21
Posición de inicio	113247963	113303808	113303808	113591941	22733343	74825139
Posición de terminación	113259442	113310827	113310827	113608064	22738145	74828297
Posición codón de inicio	113257818	113310277	113310277	113606919	22737717	74827045
Tamaño (kbp)	11.48	7.02	7.02	16.12	4.80	3.16
Variación:						
ID de referencia en NCBI dbSNP (rs#)	rs1800587	rs1143634	rs16944	rs2234663	rs1800795	rs4073
ID del Lab. GM UNAM en NCBI dbSNP (ss#)	NA	104807662	104831320	NA	NA	104828688
Sinónimos	IL1A-889	IL1B+3953 IL1B+3954	IL1B-511	IL1RN int2 IL1RN_STR (int 2) IL1RN (86bp VNTR) IL1RN:c.215-516(86)[2_6]	IL6-174	IL8-251
Clase	SNP	SNP	SNP	VNTR	SNP	SNP
Tipo	No-codificante	Codificante (sinónima)	No-codificante	No-codificante	No-codificante	No-codificante
Localización	Exón 1 (5'UTR)	Exón 5 (+14)	5' cercana al gen	Intrón 2 (isoforma 1) Intrón 4 (isoforma 2)	5' cercana al gen	5' cercana al gen
Posición en cromosoma	113,259,431	113,306,861	113,311,338	113,604,577	22,733,170	74,824,888
Posición en contig	2,250,883	2,298,313	2,302,790	2,596,029	22,255,603	3,113,034
Posición en mRNA	12	402	NA	NA	NA	NA
Posición en codón	NA	3	NA	NA	NA	NA
Posición en proteína	NA	105	NA	NA	NA	NA
Aminoácidos	NA	Phe>Phe	NA	NA	NA	NA
Secuencia 5' (30bp)	AAATCTTTA ATAATAGTAA CCAGGCAACA	TGTGCTCCAC ATTCAGAAC CTATCTTCTT	CAGAGGCTCC TGCAATTGAC AGAGAGCTCC	GCAACACTCT TATTGACCTG GAGCACAGGT (ATCCTGGGGAAAGTGAGGGAAATATG GACATCACATGGAACAACATCCAGGAG ACTCAGGCCTTAGGAGTAACTGGGTA GTGTGC) 2 a 6 repeticiones (86bp)	GCTGCACTTT TCCCCCTAGT TGTGCTTGC	TAAAGTTATC TAGAAATAAA AAAGCATACA
Alelos	(C>T)	(C>T)	(T>C)	(C>G)	(C>G)	(A>T)
Secuencia 3' (30bp)	CATTGAAGGC TCATATGTAA AAATCCATGC	GACACATGGG ATAACGAGGC TTATGTGCAC	GAGGCAGAGA ACAGCACCCA AGGTAGAGAC	ATCCTGGGGA AAGTGAGGGA AATATGGACA	ATGCTAAAGG ACGTCACATT GCACAATCTT	TTGATAATTC ACCAAATTGT GGAGCTTCAG
Alelo ancestral	(C)	(C)	(T)	(4 repeticiones)	(C)	(A)

bp: base pairs. **m.t.:** melting temperature.

Tabla 2b. Descripción de las variaciones genéticas (cont.)

	IL10:c.-627T>G	IL10:c.-854T>C	IL10:c.-1117A>G	IL12B:c.*159A>C	TNF:c.-488G>A	LTA:c.-10+90A>G
Gen:						
ID en NCBI	3586	3586	3586	3593	7124	4049
Versión (Build)	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3
Símbolo	IL10	IL10	IL10	IL12B	TNF	LTA
Nombre oficial	Interleucina 10	Interleucina 10	Interleucina 10	Interleucina 12B	Factor de necrosis tumoral	Linfortoxina alfa
Localización	chr1q31-q32	chr1q31-q32	chr1q31-q32	chr5q31.1-q33.1	chr6p21.3	chr6p21.3
Posición de inicio	205012462	205012462	205012462	158690059	31651329	31648072
Posición de terminación	205007571	205007571	205007571	158674369	31654091	31650077
Posición codón de inicio	205012403	205012403	205012403	158686368	31653293	31649449
Tamaño (kbp)	4.89	4.89	4.89	15.69	2.76	2.01
Variación:						
ID de referencia en NCBI dbSNP (rs#)	rs1800872	rs1800871	rs1800896	rs3212227	rs1800629	rs909253
ID del Lab. GM UNAM en NCBI dbSNP (ss#)	104829939	104830706	104810155	104807663	NA	104807664
Sinónimos	IL10-592	IL10-819	IL10-1082	IL12B+1188 IL12+1188	TNF-308 TNF-A-308	LTA+252 TNF-B+252
Clase	SNP	SNP	SNP	SNP	SNP	SNP
Tipo	No-codificante	No-codificante	No-codificante	No-codificante	No-codificante	No-codificante
Localización	5' cercana al gen	5' cercana al gen	5' cercana al gen	Exón 8 (+159), 3' UTR	5' cercana al gen	Intrón 1 (+90)
Posición en cromosoma	205,013,030	205,013,257	205,013,520	158,675,528	31,651,010	31,648,292
Posición en contig	464,186	464,413	464,676	3,552,508	22,401,282	22,398,564
Posición en mRNA	NA	NA	NA	1188	NA	NA
Posición en codón	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Posición en proteína	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aminoácidos	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Secuencia 5' (30bp)	TTTACTTTC CAGAGACTGG CTTCTACAG	CACTGGTGA CCTTGTACA GGTGATGTA	CAAGACAACA CTAATAAGGC TTCTTTGGGA	CAATGATATC TTTGCTGTAT TTGTATAGTT	AAATGGAGGC AATAGGTTTT GAGGGGCATG	CTCTGTGACA CATTCTCTGT TTCTGCCATG
Alelos	(T>G)	(T>C)	(A>G)	(A>C)	(G>A)	(A>G)
Secuencia 3' (30bp)	ACAGGCGGGG TCACAGGATG TGTTCCAGGC	ATCTCTGTGC CTCAGTTTGC TCACTATAAA	GGGGAAAGTAG GGATAGGTAA GAGGAAAGTA	GATGCTAAAT GCTCATTGAA ACAATCAGCT	GGACGGGGTT CAGCCTCCAG GGTCCTACAC	TTCTCTCTG TTCCTTCTCT GTCTCTCTCT
Alelo ancestral	(T)	(T)	(A)	(A)	(G)	(A)

bp: base pairs. **m.t.:** melting temperature.

Tabla 3. Cepas de referencia empleadas para la elaboración de sondas de DNA.

Especie	ATCC	Complejo	Especie	ATCC	Complejo
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	Actinomyces	<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Other
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Actinomyces	<i>Parvimonas micra</i>	33270	Naranja
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12104	Actinomyces	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Otro
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Morado	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Rojo
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	Actinomyces	<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Naranja
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	*	No agrupado	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Otro
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Naranja	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Naranja
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Naranja	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	Otro
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Naranja	<i>Selenomonas artemidis</i>	43528	Otro
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Verde	<i>Selenomonas noxia</i>	43541	No agrupado
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	Verde	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Amarillo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Verde	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Naranja
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	Otro	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Amarillo
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	Verde	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Amarillo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Otro	<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Amarillo
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	Otro	<i>Streptococcus oralis</i>	35037	Amarillo
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	**	Naranja	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Amarillo
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Naranja	<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Rojo
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Otro	<i>Treponema denticola</i>	35405	Rojo
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Otro	<i>Veillonella parvula</i>	10790	Morado

*DNA de los serotipos *a* (43717) y *b* (43718) será combinado para generar una sonda de DNA. **DNA de las subespecies *nucleatum* (25586), *polymorphum* (10953) y *vincentii* (49256) será combinado para generar una sonda de DNA. **ATCC:** número de referencia del American Type Culture Collection. **stp.:** serotipo. **Complejo:** agrupación en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky & Haffajee 2005, Socransky et al. 1998) con las siguientes excepciones: *C. matruchotii*, *E. saburreum*, *E. sulci*, *G. morbillorum*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. endodontalis*, *P. melaninogenica*, *P. acnes* and *S. artemidis* agrupadas en “Otros”).

Tabla 4. Características generales y periodontales de la población total de estudio (N=189).

	No-DMT2 n=118		DMT2 n=71		M-W
	Media ± EEM	Rango	Media ± EEM	Rango	
GENERALES					
Edad (años)	40.4 ± 1.1	25 - 75	55.4 ± 1.5	30 - 83	0.000
Género (% mujeres)	50.8		70.4		0.008
Estatura (cm)	162.4 ± 1.3	139 - 184	152.2 ± 1.1	137 - 180	0.000
Peso (kg)	69.7 ± 2.0	38 - 124	64.9 ± 1.6	45 - 116	0.029
Grasa corporal (%)	29.0 ± 1.4	8.0 - 78.6	31.1 ± 0.8	17.0 - 47.0	0.113
Fumadores actuales (%)	19.5		2.8		0.000
PERIODONTALES					
Número de dientes faltantes	2.7 ± 0.2	0 - 8	3.2 ± 0.3	0 - 8	0.213
Profundidad de bolsa promedio (mm)	3.3 ± 0.1	1.7 - 7.4	2.9 ± 0.1	1.9 - 5.8	0.051
Nivel de inserción promedio (NI, mm)	3.5 ± 0.1	0.9 - 9.0	2.7 ± 0.2	1.0 - 6.9	0.000
Número de sitios con NI ≥5 mm	34.1 ± 3.2	0 - 121	23.3 ± 3.4	0 - 103	0.197
% sitios con:					
Acumulación de placa	36.4 ± 3.0	0 - 100	90.0 ± 1.4	48.8 - 100	0.000
Enrojecimiento gingival	13.8 ± 2.1	0 - 100	28.9 ± 2.8	0 - 100	0.000
Sangrado al sondeo	32.2 ± 2.4	0 - 100	49.3 ± 2.8	6.7 - 100	0.000
Supuración	3.3 ± 0.6	0 - 37.0	12.2 ± 1.7	0 - 68.8	0.000

No-DMT2: no diabéticos; **DMT2:** diabetes mellitus tipo 2; **EEM:** error estándar de la media; **M-W:** Prueba *U* de Mann Whitney con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991).

Tabla 5. Características generales y periodontales de población con clasificación periodontal (n=177) y características propias de sujetos diabéticos (n=52).

	SP no-DMT2 (n=63)			PG no-DMT2 (n=62)			SP DMT2 (n=13)			PG DMT2 (n=39)			Kruskal Wallis		
	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango	no-DM vs DM	SP vs PG	
GENERALES															
Edad (años)	33.7	1.2	18 - 60	49.6	1.4	35 - 75	46.1	2.3	36 - 63	60.0	1.7	35 - 76	0.0000	0.0000	
Género (% mujeres)	1.3	0.1	-	1.4	0.1	-	1.4	0.1	-	1.3	0.1	-	0.3886	0.7396	
Índice de masa corporal (IMC)	26.5	0.7	17.9 - 35.7	26.7	0.8	19.7 - 37.9	27.7	1.2	23.1 - 39.1	27.7	0.8	19.7 - 45.5	0.3387	0.9671	
% sobrepeso (IMC: 25.0 - 29.9)	1.2	0.1	-	1.2	0.1	-	1.2	0.1	-	1.2	0.1	-	0.6870	0.6917	
% obesidad (BMI: >30)	1.6	0.1	-	1.6	0.1	-	1.7	0.1	-	1.7	0.1	-	0.4227	0.7923	
PERIODONTALES															
Número de dientes faltantes	1.1	0.2	0 - 7	3.2	0.3	0 - 8	1.6	0.5	0 - 5	3.8	0.4	0 - 8	0.0039	0.0000	
Profundidad de bolsa promedio (PB, mm)	2.2	0.04	1.5 - 3.2	3.8	0.12	2.3 - 7.4	2.3	0.10	1.9 - 3.1	3.2	0.12	1.9 - 5.8	0.5785	0.0000	
Nivel de inserción promedio (NI, mm)	1.9	0.04	0.9 - 2.4	4.1	0.15	2.3 - 9.0	1.4	0.09	1.0 - 2.1	3.5	0.18	2.0 - 6.9	0.7450	0.0000	
Número de sitios con NI ≥5 mm	0	0	0 - 0	44.8	3.8	8 - 118	0	0	0 - 0	38.0	4.7	9 - 103	0.0229	0.0000	
Acumulación de placa	52.5	4.6	0 - 100	60.3	4.4	0 - 100	85.4	4.3	48.8 - 100	93.2	1.5	61.9 - 100	0.0000	0.0005	
Enrojecimiento gingival	24.7	3.5	0 - 86.9	31.8	4.1	0 - 100	23.8	8.6	0 - 100	34.6	3.6	0 - 100	0.1269	0.0176	
Sangrado al sondeo	19.5	2.5	0 - 83.9	48.5	3.2	0 - 100	30.4	4.1	9.4 - 62.0	57.3	3.8	6.7 - 100	0.0001	0.0000	
Supuración	0	0	0 - 0	4.6	1.0	0 - 37.0	0	0	0 - 0	18.1	2.4	0 - 68.8	0.0000	0.0000	
												SP vs PG			
												M-W	CC	Rho	
DIABETES															
Tiempo de diagnóstico DMT2 (años)							5.8	1.4	1 - 15	8.0	1.0	1 - 25	0.2787	-	-
Tratamiento farmacológico para DM (%)							0.8	0.1	-	0.8	0.1	-	0.8249	0.216	0.007
Hemoglobina glucosilada (%)							8.2	0.6	5 - 12	8.3	0.3	6 - 14	0.8615	-0.025	0.864
Lípidos totales (mg/100 ml)							674.8	39.4	490 - 860	655.3	29.1	405 - 1230	0.4689	-0.106	0.475
Triglicéridos (mg/100 ml)							179.8	18.1	102 - 259	239.1	41.3	82 - 1608	0.0805	0.586	0.658
Coolesterol (mg/100 ml)							194.5	13.3	142 - 266	195.7	9.1	115 - 364	0.8733	-0.023	0.875
Lípidos de alta densidad (HDL, mg/100 ml)							36.5	1.7	25 - 45	40.6	1.8	25 - 66	0.5805	0.081	0.586
Lípidos de baja densidad (LDL, mg/100 ml)							142.8	11.4	91 - 187	142.3	8.2	78 - 283	0.7872	-0.039	0.790

No-DMT2: no diabéticos; **DMT2:** diabetes mellitus tipo 2; **SP:** salud periodontal; **PG:** Periodontitis generalizada; EEM: error estándar de la media. M-W: Prueba U de Mann Whitney con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991); **CC:** prueba de coeficiente correlación y Rho de Spearman.

Tabla 6a. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas (N=189 sujetos).

	No-DMT2			DMT2			ESTADÍSTICAS							
	n=	i=	%i=	n=	i=	%i=	D_{max}	EXC	IFN	M-W (p=)	Fisher (p=)	RM	IC95%	M-H (p=)
IL1A:c.-949C>T														
IL1A:c.[-949CC] ‡	118	72	61.0	71	60	84.5	-23.5	0.56	0.15	0.001	0.001	3.5	1.7 -	7.3 0.001
IL1A:c.[-949CT] †		41	34.7		11	15.5	19.3	0.47	0.85	0.004	0.004	0.3	0.2 -	0.7 0.005
IL1A:c.[-949TT]		5	4.2		0		4.2	0.60	1.00	0.080	0.159		-	NA
IL1A:c.[-949C]	185		78.4	131		92.3	-13.9	0.48	0.08	0.080	0.159		-	NA
IL1A:c.[-949T] ‡		51	21.6		11	7.7	13.9	0.52	0.92	0.001	0.001	0.3	0.1 -	0.6 0.001
IL1B:c.315C>T														
IL1B:c.[315CC] ‡	118	84	71.2	71	70	98.6	-27.4	0.55	0.01	0.000	0.000	28.3	3.8 -	212.2 0.001
IL1B:c.[315CT] ‡		28	23.7		1	1.4	22.3	0.48	0.99	0.000	0.000	0.0	0.0 -	0.3 0.003
IL1B:c.[315TT]		6	5.1		0		5.1	0.59	1.00	0.054	0.085		-	NA
IL1B:c.[315C]	196		83.1	141		99.3	-16.2	0.48	0.01	0.054	0.085		-	NA
IL1B:c.[315T] ‡		40	16.9		1	0.7	16.2	0.52	0.99	0.000	0.000	0.0	0.0 -	0.3 0.001
IL1B:c.-583T>C														
IL1B:c.[-583TT] ‡	118	36	30.5	71	39	54.9	-24.4	0.64	0.45	0.001	0.001	2.8	1.5 -	5.1 0.001
IL1B:c.[-583TC] †		77	65.3		32	45.1	20.2	0.39	0.55	0.007	0.010	0.4	0.2 -	0.8 0.007
IL1B:c.[-583CC]		5	4.2		0		4.2	0.60	1.00	0.080	0.159		-	NA
IL1B:c.[-583T]	149		63.1	110		77.5	-14.3	0.52	0.23	0.080	0.159		-	NA
IL1B:c.[-583C] ‡		87	36.9		32	22.5	14.3	0.48	0.77	0.001	0.001	0.5	0.2 -	0.7 0.001
IL1RN:c.215-516(86)[2_6]														
IL1RN:c.215-516(86)[4]+[4]	118	49	41.5	71	30	42.3	-0.7	0.52	0.58	0.922	1.000	1.0	0.6 -	1.9 0.922
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[4]		48	40.7		32	45.1	-4.4	0.54	0.55	0.555	0.649	1.2	0.7 -	2.2 0.554
IL1RN:c.215-516(86)[5]+[4]		1	0.8		0	0.0	0.8	0.62	1.00	0.438	1.000		-	NA
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[2]		19	16.1		6	8.5	7.7	0.56	0.92	0.134	0.183	0.5	0.2 -	1.3 0.139
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[5]		1	0.8		1	1.4	-0.6	0.62	0.99	0.716	1.000	1.7	0.1 -	27.1 0.718
IL1RN:c.215-516(86)[2]+[3]		0	0.0		2	2.8	-2.8	0.63	0.97	0.068	0.140		-	NA
IL1RN:c.215-516(86)[4]	147		62.3	92		64.8	-2.5	0.48	0.35	0.431	0.533	1.1	0.6 -	3.3 0.431
IL1RN:c.215-516(86)[2]	87		36.9	47		33.1	3.8	0.52	0.67	0.987	1.000	0.8	0.6 -	1.8 0.987
IL1RN:c.215-516(86)[5]		2	0.8		1	0.7	0.1	0.62	0.99	0.879	1.000	0.8	0.1 -	9.3 0.879
IL1RN:c.215-516(86)[3]		0	0.0		2	1.4	-1.4	0.63	0.99	0.068	0.140		-	NA
IL6:c.-237C>G														
IL6:c.[-237CC] *	117	2	1.7	71	0	0.0	1.7	0.61	1.00	0.269	0.527		-	NA
IL6:c.[-237CG]		30	25.6		8	11.3	14.4	0.51	0.89	0.018	0.024	0.4	0.2 -	0.9 0.020
IL6:c.[-237GG] †		85	72.6		63	88.7	-16.1	0.51	0.11	0.009	0.010	3.1	1.3 -	6.9 0.011
IL6:c.[-237C] †		34	14.5		8	5.6	8.9	0.55	0.94	0.009	0.010	0.4	0.1 -	0.8 0.011
IL6:c.[-237G]	200		85.5	134		94.4	-8.9	0.45	0.06	0.269	0.527		-	NA
IL8:c.-352A>T														
IL8:c.[-352AA]	118	39	33.1	71	27	38.0	-5.0	0.56	0.62	0.488	0.530	1.2	0.7 -	2.3 0.487
IL8:c.[-352AT]		41	34.7		32	45.1	-10.3	0.58	0.55	0.159	0.168	1.5	0.8 -	2.8 0.159
IL8:c.[-352TT] *		38	32.2		12	16.9	15.3	0.49	0.83	0.021	0.026	0.4	0.2 -	0.9 0.023
IL8:c.[-352A] *	119		50.4	86		60.6	-10.1	0.54	0.39	0.021	0.026	1.5	1.1 -	4.9 0.023
IL8:c.[-352T]	117		49.6	56		39.4	10.1	0.46	0.61	0.488	0.530	0.7	0.4 -	1.5 0.487

Frecuencia de portadores (i); proporción (%); diferencia máxima (D_{max}); exactitud (EXC); índice de falsos negativos (IFN). La selección de alelos y genotipos individuales (resaltados en colores azul y rosa) se realizó basados en los siguientes puntos de corte: $D_{max}>10$, $EXC>0.5$, $IFN<0.5$, $RM>1.5$ y $MW<0.05$. Prueba U de Mann Whitney: * $p<0.05$, † $p<0.01$ y ‡ $p<0.001$ no-DMT2 vs. DMT2.

Tabla 6b. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas (N=189 sujetos) (cont.)

	No-DMT2			DMT2			ESTADÍSTICAS							
	n=	i=	%(i)=	n=	i=	%(i)=	D _{max}	EXC	IFN	M-W (p=)	Fisher (p=)	RM	IC95%	M-H (p=)
IL10:c.-627T>G														
IL10:c.[-627TT]	118	16	13.6	71	5	7.0	6.5	0.57	0.93	0.169	0.233	0.5	0.2 - 1.4	0.175
IL10:c.[-627TG]		68	57.6		49	69.0	-11.4	0.52	0.31	0.119	0.125	1.6	0.9 - 3.0	0.120
IL10:c.[-627GG]		34	28.8		17	23.9	4.9	0.53	0.76	0.466	0.502	0.8	0.4 - 1.5	0.466
IL10:c.[-627T]		100	42.4		59	41.5	0.8	0.52	0.58	0.466	0.502	1.0	0.7 - 2.5	0.466
IL10:c.[-627G]		136	57.6		83	58.5	-0.8	0.48	0.42	0.169	0.233	1.0	0.7 - 5.9	0.175
IL10:c.-854T>C														
IL10:c.[-854TT]	118	27	22.9	71	16	22.5	0.3	0.57	0.77	0.956	1.000	1.0	0.5 - 2.0	0.956
IL10:c.[-854TC]		66	55.9		38	53.5	2.4	0.48	0.46	0.748	0.765	0.9	0.5 - 1.6	0.747
IL10:c.[-854CC]		25	21.2		17	23.9	-2.8	0.58	0.76	0.660	0.719	1.2	0.6 - 2.4	0.659
IL10:c.[-854T]		120	50.8		70	49.3	1.6	0.49	0.51	0.660	0.719	0.9	0.4 - 1.7	0.659
IL10:c.[-854C]		116	49.2		72	50.7	-1.6	0.51	0.49	0.956	1.000	1.1	0.5 - 2.1	0.956
IL10:c.-1117A>G														
IL10:c.[-1117AA]	118	69	58.5	71	41	57.7	0.7	0.48	0.42	0.922	1.000	1.0	0.5 - 1.8	0.922
IL10:c.[-1117AG]		45	38.1		27	38.0	0.1	0.53	0.62	0.988	1.000	1.0	0.5 - 1.8	0.988
IL10:c.[-1117GG]		4	3.4		3	4.2	-0.8	0.62	0.96	0.769	1.000	1.3	0.3 - 5.8	0.769
IL10:c.[-1117A]		183	77.5		109	76.8	0.8	0.43	0.23	0.769	1.000	1.0	0.2 - 3.7	0.769
IL10:c.[-1117G]		53	22.5		33	23.2	-0.8	0.57	0.77	0.922	1.000	1.0	0.6 - 1.9	0.922
IL12B:c.*159A>C														
IL12B:c.[*159AA]	118	38	32.2	71	32	45.1	-12.9	0.59	0.55	0.077	0.088	1.7	0.9 - 3.2	0.077
IL12B:c.[*159AC]		58	49.2		28	39.4	9.7	0.47	0.61	0.195	0.228	0.7	0.4 - 1.2	0.195
IL12B:c.[*159CC]		22	18.6		11	15.5	3.2	0.57	0.85	0.582	0.693	0.8	0.4 - 1.8	0.581
IL12B:c.[*159A]		134	56.8		92	64.8	-8.0	0.51	0.35	0.582	0.693	1.4	0.6 - 2.8	0.581
IL12B:c.[*159C]		102	43.2		50	35.2	8.0	0.49	0.65	0.077	0.088	0.7	0.3 - 1.1	0.077
TNF:c.-488G>A														
TNF:c.[-488GG]	117	104	88.9	71	67	94.4	-5.5	0.43	0.06	0.205	0.295	2.3	0.7 - 6.7	0.213
TNF:c.[-488GA]		12	10.3		4	5.6	4.6	0.58	0.94	0.272	0.419	0.5	0.2 - 1.7	0.278
TNF:c.[-488AA]		1	0.9		0	0.0	0.9	0.62	1.00	0.436	1.000	-	-	NA
TNF:c.[-488G]		220	94.0		138	97.2	-3.2	0.40	0.03	0.436	1.000	-	-	NA
TNF:c.[-488A]		14	6.0		4	2.8	3.2	0.60	0.97	0.205	0.295	0.5	0.1 - 1.5	0.213
LTA:c.-10+90A>G														
LTA:c.[-10+90AA] *	118	58	49.2	71	24	33.8	15.3	0.44	0.66	0.040	0.049	0.5	0.3 - 1.0	0.040
LTA:c.[-10+90AG] †		46	39.0		43	60.6	-21.6	0.61	0.39	0.004	0.004	2.4	1.3 - 4.4	0.004
LTA:c.[-10+90GG]		14	11.9		4	5.6	6.2	0.57	0.94	0.159	0.204	0.4	0.1 - 1.4	0.167
LTA:c.[-10+90A]		162	68.6		91	64.1	4.6	0.44	0.36	0.159	0.204	0.8	0.7 - 7.1	0.167
LTA:c.[-10+90G] *		74	31.4		51	35.9	-4.6	0.56	0.64	0.040	0.049	1.2	1.0 - 3.5	0.040

Frecuencia de portadores (i); proporción (%); diferencia máxima (D max); exactitud (EXC); índice de falsos negativos (IFN). La selección de alelos y genotipos individuales (resaltados en colores azul y rosa) se realizó basados en los siguientes puntos de corte: Dmax>10, EXC>0.5, IFN<0.5, RM>1.5 y MW<0.05. Prueba U de Mann Whitney: * p<0.05, † p<0.01 y ‡ p<0.001 no-DMT2 vs. DMT2.

Tabla 7. Selección de genotipos y alelos individuales (N=189 sujetos).

	No-DMT2			DMT2			ESTADÍSTICAS							
	n=	i=	%(i)=	n=	i=	%(i)=	D _{max}	EXC	IFN	M-W (p=)	Fisher (p=)	RM	IC95%	M-H (p=)
IL1A:c.-949C>T														
IL1A:c.[-949CC] ‡	118	72	61.0	71	60	84.5	-23.5	0.56	0.15	0.001	0.001	3.5	1.7 - 7.3	0.001
IL1B:c.315C>T														
IL1B:c.[315CC] ‡		84	71.2		70	98.6	-27.4	0.55	0.01	0.000	0.000	28.3	3.8 - 212.2	0.001
IL1B:c.-583T>C														
IL1B:c.[-583TT] ‡		36	30.5		39	54.9	-24.4	0.64	0.45	0.001	0.001	2.8	1.5 - 5.1	0.001
IL6:c.-237C>G														
IL6:c.[-237GG] †		85	72.6		63	88.7	-16.1	0.51	0.11	0.009	0.010	3.1	1.3 - 6.9	0.011
IL8:c.-352A>T														
IL8:c.[-352A] *		119	50.4		86	60.6	-10.1	0.54	0.39	0.021	0.026	1.5	1.1 - 4.9	0.023
LTA:c.-10+90A>G														
LTA:c.[-10+90AG] †		46	39.0		43	60.6	-21.6	0.61	0.39	0.004	0.004	2.4	1.3 - 4.4	0.004

Frecuencia de portadores (i); proporción (%); diferencia máxima (D max); exactitud (EXC); índice de falsos negativos (IFN). La selección de alelos y genotipos individuales se realizó basados en los siguientes puntos de corte: Dmax>10, EXC>0.5, IFN<0.5, RM>1.5 y MW<0.05. Prueba U de Mann Whitney: * p<0.05, † p<0.01 y ‡ p<0.001 no-DMT2 vs. DMT2.

Tabla 8. Asociaciones del marcador aditivo.

Modelo para salud periodontal (n = 43)

	Marcador		Total	RM	RR	VPN	VPP
	0	1					
DMT2	3	9	12	4.2	1.8	0.86	0.41
No-DMT2	18	13	31	SNS	ESP	EXC	IFP
Total	21	22	43	0.75	0.58	0.63	0.42

Modelo para periodontitis generalizada (n = 118)

	Marcador		Total	RM	RR	VPN	VPP
	0	1					
DMT2	8	37	45	7.9	2.2	0.85	0.58
No-DMT2	46	27	73	SNS	ESP	EXC	IFP
Total	54	64	118	0.82	0.63	0.70	0.37

No-DMT2: no diabéticos; **DMT2:** diabetes mellitus tipo 2; **SP:** Salud Periodontal; **PG:** Periodontitis generalizada; **RM:** razón de momios; **RR:** índice de riesgo relativo; **VPP:** valor predictivo positivo; **VPN:** Valor predictivo negativo.

Tabla 9. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales ± EEM) de especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 189 sujetos de estudio (no-DMT2 n=118 y DMT2 n=71).

Proporción	No-DMT2				DMT2				M-W
	Media	EEM	Min	Max	Media	EEM	Min	Max	
<i>A. georgiae</i>	1.5	0.3	0.0	22.5	1.6	0.2	0.0	9.6	0.0004
<i>A. israelii</i>	3.6	0.6	0.0	33.7	3.4	0.4	0.1	16.9	0.0251
<i>A. naeslundii</i>	8.7	1.2	0.0	66.2	6.8	0.8	0.8	37.3	0.0656
<i>A. viscosus</i>	5.9	0.7	0.0	29.1	4.3	0.5	0.2	33.2	0.7887
<i>S. anginosus</i>	1.1	0.1	0.0	7.8	1.8	0.2	0.1	10.9	0.0000
<i>S. gordonii</i>	1.5	0.3	0.0	22.7	2.4	0.4	0.0	16.5	0.0003
<i>S. intermedius</i>	0.9	0.1	0.0	7.6	1.5	0.2	0.0	9.6	0.0000
<i>S. mitis</i>	2.7	0.6	0.0	37.8	2.6	0.2	0.1	10.5	0.0000
<i>S. oralis</i>	1.0	0.2	0.0	12.7	2.2	0.2	0.0	7.1	0.0000
<i>S. sanguinis</i>	2.2	0.3	0.0	19.5	2.9	0.3	0.2	10.3	0.0000
<i>A. odontolyticus</i>	1.5	0.3	0.0	20.6	0.8	0.1	0.0	2.0	0.2404
<i>V. parvula</i>	4.9	0.6	0.0	23.9	6.2	0.5	0.1	20.2	0.0004
<i>C. gingivalis</i>	2.0	0.3	0.0	16.4	1.2	0.2	0.0	8.0	0.6311
<i>C. ochracea</i>	0.5	0.1	0.0	6.8	1.2	0.1	0.0	5.5	0.0000
<i>C. sputigena</i>	1.2	0.2	0.0	10.7	1.7	0.2	0.0	9.6	0.0012
<i>E. corrodens</i>	2.6	0.5	0.0	38.8	3.5	0.6	0.0	31.9	0.0046
<i>C. gracilis</i>	0.4	0.1	0.0	4.2	1.1	0.1	0.0	6.8	0.0000
<i>C. rectus</i>	0.9	0.1	0.0	8.6	1.0	0.1	0.1	3.6	0.0018
<i>C. showae</i>	0.7	0.1	0.0	13.1	0.7	0.1	0.0	2.4	0.0272
<i>F. nucleatum</i>	3.2	0.5	0.0	43.6	2.4	0.2	0.2	9.7	0.3751
<i>F. periodonticum</i>	2.5	0.4	0.0	36.1	2.0	0.3	0.0	23.0	0.7045
<i>P. intermedia</i>	3.5	0.4	0.0	19.3	4.3	0.5	0.1	16.0	0.0232
<i>P. micra</i>	2.7	0.6	0.0	45.0	3.1	0.4	0.3	22.0	0.0000
<i>P. nigrescens</i>	2.3	0.3	0.0	17.2	4.0	0.4	0.0	15.6	0.0000
<i>S. constellatus</i>	1.4	0.3	0.0	17.0	2.3	0.2	0.0	8.9	0.0000
<i>P. gingivalis</i>	7.6	0.9	0.0	41.5	3.3	0.4	0.0	13.8	0.0487
<i>T. denticola</i>	2.2	0.2	0.0	12.6	1.5	0.2	0.0	8.8	0.2510
<i>T. forsythia</i>	5.3	0.6	0.0	35.5	3.7	0.5	0.0	30.4	0.4966
<i>A. a.</i>	0.8	0.2	0.0	13.0	0.4	0.1	0.0	2.5	0.6963
<i>S. noxia</i>	0.6	0.1	0.0	8.9	1.0	0.1	0.0	3.0	0.0000
<i>C. matruchotii</i>	8.5	0.8	0.0	39.6	6.9	0.8	0.5	31.0	0.4249
<i>E. saburreum</i>	3.7	0.6	0.0	35.5	3.2	0.3	0.1	15.4	0.0037
<i>E. sulci</i>	1.3	0.2	0.0	15.6	1.4	0.3	0.0	16.1	0.0171
<i>G. morbillorum</i>	2.8	0.5	0.0	38.8	2.2	0.2	0.1	7.7	0.0051
<i>L. buccalis</i>	6.0	1.1	0.0	84.5	3.1	0.5	0.0	25.0	0.9758
<i>N. mucosa</i>	1.7	0.3	0.0	14.6	3.3	0.4	0.0	19.0	0.0000
<i>P. acnes</i>	0.8	0.1	0.0	8.2	1.5	0.3	0.0	12.2	0.0000
<i>P. endodontalis</i>	0.3	0.1	0.0	4.1	0.2	0.0	0.0	1.8	0.0017
<i>P. melaninogenica</i>	2.3	0.3	0.0	20.0	2.9	0.4	0.0	18.9	0.0006
<i>S. artemidis</i>	1.2	0.3	0.0	25.1	1.2	0.2	0.0	15.7	0.0000

M-W: Prueba U de Mann Whitney: * $p < 0.05$ (color verde), † $p < 0.01$ (color naranja) y ‡ $p < 0.001$ (color rojo) para no-DMT2 vs. DMT2. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. a y b.

Tabla 10. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 105 ± EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 177 sujetos de estudio (SP no-DMT2 n=63, SP DMT2 n=13, PG no-DMT2 n=62 y PG DMT2 n=39).

	SP no-DMT2 (n=63)			SP DMT2 (n=13)		PG no-DMT2 (n=62)			PG DMT2 (n=39)		Kruskal Wallis no-DMT2 vs DMT2		
	Media	EV	Rango	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango	Media		EEM	Rango
<i>A. georgiae</i>	1.5	0.3	0.0 - 10.3	3.2	1.2	0.7 - 13.1	2.1	0.6	0.0 - 20.9	6.3	1.1	0.0 - 36.3	0.0000000
<i>A. israelii</i>	4.8	0.7	0.0 - 26.2	10.8	5.4	2.0 - 74.4	5.0	0.9	0.0 - 27.2	10.7	1.9	0.7 - 53.5	0.0000162
<i>A. naeslundii</i>	8.9	1.2	0.2 - 45.5	13.5	3.0	3.4 - 42.4	9.9	1.9	0.0 - 78.5	13.5	2.1	2.4 - 59.6	0.0002767
<i>A. viscosus</i>	6.8	1.3	0.1 - 60.3	15.2	4.6	4.3 - 62.9	8.9	1.5	0.0 - 52.8	12.6	2.2	2.3 - 78.6	0.0000009
<i>S. anginosus</i>	2.6	0.5	0.0 - 21.5	6.2	1.3	0.4 - 16.0	2.3	0.5	0.0 - 27.8	8.4	1.1	0.7 - 27.7	0.0000000
<i>S. gordonii</i>	2.9	0.6	0.0 - 36.2	6.5	1.9	0.5 - 24.7	2.0	0.3	0.0 - 9.0	5.6	0.7	0.2 - 22.1	0.0000000
<i>S. intermedius</i>	3.2	1.0	0.0 - 60.1	4.0	0.8	1.4 - 10.7	1.9	0.4	0.0 - 17.3	5.9	0.7	0.1 - 19.6	0.0000000
<i>S. mitis</i>	4.9	1.0	0.0 - 36.8	6.3	0.9	2.8 - 15.2	2.7	0.5	0.0 - 16.3	9.0	0.8	2.1 - 27.2	0.0000000
<i>S. oralis</i>	3.4	1.0	0.0 - 61.2	6.1	1.1	1.8 - 13.8	3.0	0.6	0.0 - 21.3	9.6	1.3	0.0 - 32.4	0.0000000
<i>S. sanguinis</i>	3.0	0.5	0.0 - 24.3	9.6	2.7	0.9 - 39.4	4.0	0.9	0.0 - 45.0	9.2	0.9	0.4 - 24.9	0.0000000
<i>A. odontolyticus</i>	2.8	1.1	0.0 - 69.5	2.4	0.7	0.3 - 9.9	2.4	0.8	0.0 - 43.3	3.9	0.5	0.0 - 15.5	0.0000049
<i>V. parvula</i>	10.7	2.1	0.0 - 89.5	21.9	3.9	4.9 - 45.1	8.0	1.4	0.0 - 51.6	24.6	2.5	0.5 - 81.0	0.0000000
<i>C. gingivalis</i>	3.7	0.9	0.0 - 55.1	4.8	0.9	1.0 - 13.2	3.3	0.9	0.0 - 49.2	5.1	0.8	0.0 - 27.3	0.0000318
<i>C. ochracea</i>	2.1	0.5	0.0 - 17.3	3.9	1.5	0.6 - 21.8	1.4	0.3	0.0 - 11.3	5.6	1.1	0.0 - 43.5	0.0000000
<i>C. sputigena</i>	2.5	0.5	0.0 - 21.5	6.1	1.7	2.7 - 26.7	1.9	0.4	0.0 - 23.6	6.8	1.1	0.0 - 35.8	0.0000000
<i>E. corrodens</i>	5.2	0.8	0.0 - 32.0	7.0	1.1	0.9 - 17.3	3.7	0.5	0.0 - 19.5	7.3	1.0	0.0 - 24.0	0.0000717
<i>C. gracilis</i>	1.3	0.3	0.0 - 11.6	3.4	0.8	0.0 - 8.9	1.0	0.3	0.0 - 15.8	5.8	1.1	0.1 - 35.4	0.0000000
<i>C. rectus</i>	1.7	0.3	0.0 - 11.8	3.3	0.9	0.6 - 10.9	1.7	0.2	0.0 - 10.1	4.2	0.6	0.2 - 17.5	0.0000001
<i>C. showae</i>	1.7	0.5	0.0 - 30.3	4.0	1.1	0.6 - 13.7	1.7	0.7	0.0 - 40.8	2.9	0.4	0.0 - 10.1	0.0000000
<i>F. nucleatum</i>	4.0	0.7	0.0 - 26.2	8.3	2.4	1.1 - 33.5	4.4	0.7	0.0 - 32.8	10.2	1.2	2.0 - 38.7	0.0000000
<i>F. periodonticum</i>	5.9	1.4	0.0 - 75.8	4.6	0.7	1.6 - 10.1	4.3	0.7	0.0 - 26.3	6.5	0.9	0.0 - 23.1	0.0065504
<i>P. micra</i>	4.4	0.9	0.0 - 45.2	6.9	2.0	0.6 - 29.3	4.2	1.0	0.0 - 36.9	14.0	2.1	1.0 - 70.6	0.0000000
<i>P. intermedia</i>	5.3	1.1	0.0 - 48.5	7.2	2.1	0.5 - 24.0	6.2	1.0	0.0 - 45.5	13.8	2.4	0.5 - 66.8	0.0000034
<i>P. nigrescens</i>	5.2	1.0	0.0 - 35.5	6.9	1.5	1.9 - 20.2	4.4	0.9	0.0 - 55.5	15.3	2.0	0.1 - 64.3	0.0000000
<i>S. constellatus</i>	2.7	0.4	0.0 - 12.4	5.0	0.8	2.3 - 12.6	3.0	0.5	0.0 - 25.5	8.9	1.1	1.5 - 31.7	0.0000000
<i>P. gingivalis</i>	3.9	0.6	0.0 - 22.9	4.3	0.9	0.2 - 11.8	8.4	1.2	0.0 - 57.1	10.3	1.2	0.7 - 29.5	0.0009632
<i>T. forsythia</i>	11.3	2.3	0.0 - 91.8	7.6	1.8	0.6 - 21.3	10.8	2.0	0.0 - 61.6	9.3	1.3	1.4 - 44.9	0.0167182
<i>T. denticola</i>	3.6	0.7	0.0 - 31.7	5.5	1.2	0.7 - 13.0	3.8	0.5	0.0 - 21.1	5.3	0.8	0.1 - 24.5	0.0017309
<i>A. a.</i>	0.9	0.2	0.0 - 10.6	1.9	0.9	0.1 - 11.8	1.2	0.3	0.0 - 12.2	1.9	0.2	0.0 - 6.7	0.0000018
<i>S. noxia</i>	1.8	0.4	0.0 - 17.4	3.4	1.6	0.2 - 22.2	1.1	0.4	0.0 - 21.2	3.8	0.5	0.3 - 11.8	0.0000000
<i>C. matruchotii</i>	9.2	1.3	0.0 - 49.4	15.1	5.2	1.4 - 74.2	11.1	1.6	0.0 - 69.7	16.5	2.4	4.4 - 87.7	0.0000470
<i>E. saburreum</i>	6.2	1.2	0.0 - 63.9	15.0	5.8	4.6 - 82.1	6.2	1.7	0.0 - 77.7	12.6	1.3	0.7 - 40.7	0.0000000
<i>E. sulci</i>	5.1	1.4	0.0 - 73.4	4.9	1.0	1.3 - 12.7	3.4	0.9	0.0 - 45.5	5.3	0.9	0.0 - 32.9	0.0000324
<i>G. morbillorum</i>	4.9	0.9	0.0 - 47.5	6.6	1.5	1.3 - 20.9	3.9	0.7	0.0 - 32.6	8.0	0.9	0.2 - 26.9	0.0000019
<i>L. buccalis</i>	3.7	0.5	0.0 - 18.9	6.6	1.5	0.2 - 20.8	6.4	2.0	0.0 - 96.0	13.4	2.7	0.0 - 74.6	0.0000002
<i>N. mucosa</i>	5.0	1.4	0.0 - 86.8	7.0	0.8	3.1 - 13.4	2.9	0.5	0.0 - 20.3	8.4	1.6	0.2 - 54.9	0.0000003
<i>P. endodontalis</i>	0.8	0.3	0.0 - 15.7	1.8	0.5	0.0 - 5.7	0.7	0.3	0.0 - 20.0	0.9	0.2	0.0 - 5.0	0.0000017
<i>P. melaninogenica</i>	4.6	0.7	0.0 - 24.4	5.3	0.9	0.6 - 13.5	3.7	0.8	0.0 - 30.8	10.0	1.2	0.0 - 35.2	0.0000000
<i>P. acnes</i>	1.6	0.3	0.0 - 10.5	3.5	1.4	0.3 - 19.3	1.8	0.5	0.0 - 24.2	4.7	1.1	0.1 - 38.2	0.0000000
<i>S. artemidis</i>	2.2	0.4	0.0 - 15.0	3.2	0.7	0.7 - 8.1	1.1	0.3	0.0 - 18.0	4.7	0.5	0.1 - 12.4	0.0000000

Prueba de Kruskal Wallis: $p < 0.05$ (color verde), $p < 0.01$ (color naranja) y $p < 0.001$ (color rojo) para las comparaciones de grupos no-DMT2 y DMT2.

FIGURAS

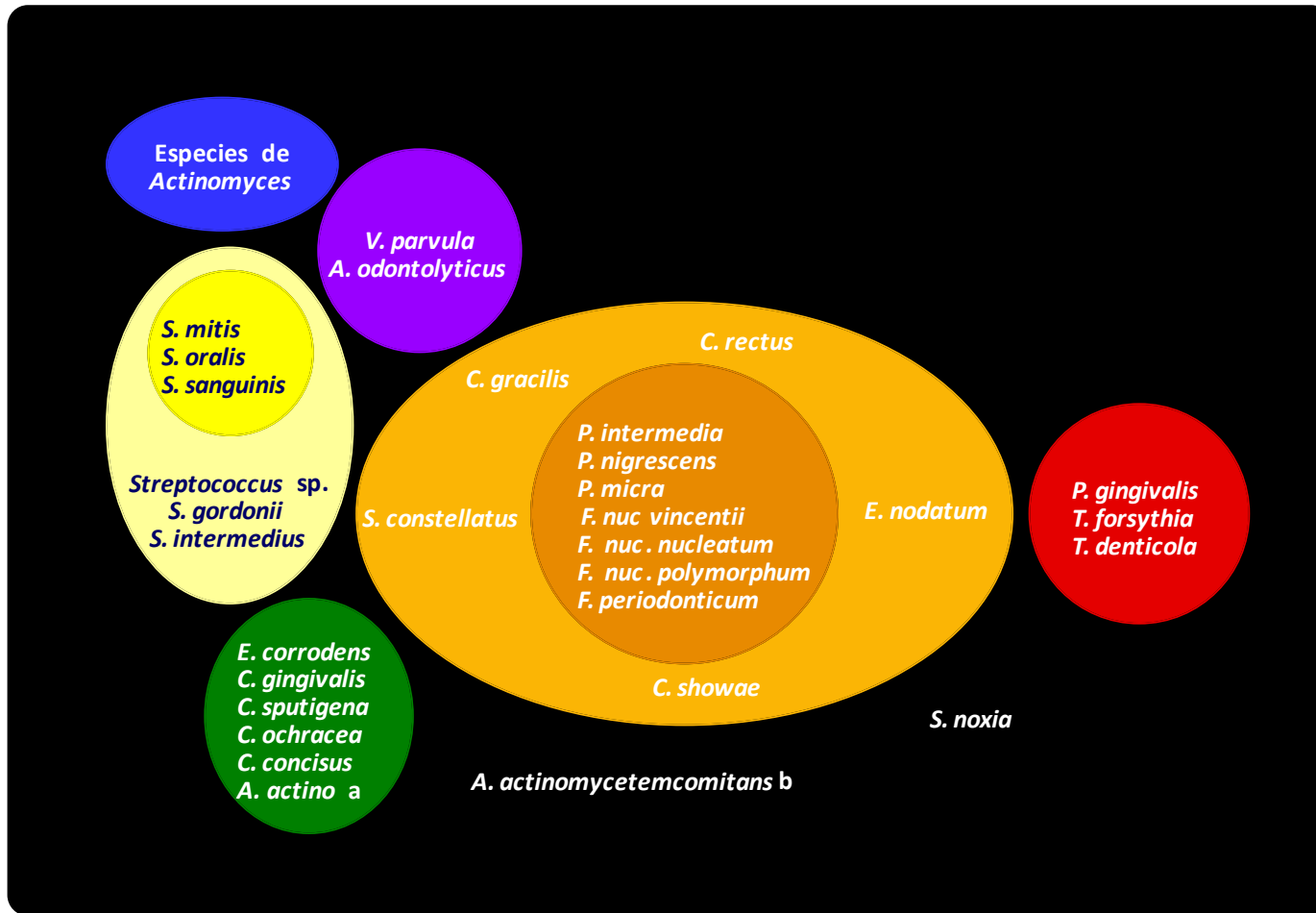


Figura 1. Representación de las asociaciones entre especies bacterianas que colonizan la placa dentobacteriana subgingival. Los complejos amarillo, morado, verde y azul son especies consideradas primordialmente como “colonizadoras primarias” o especies compatibles con salud periodontal. El complejo naranja está compuesto principalmente por “colonizadores puente” o especies periodontopatógenas putativas y el complejo rojo por “colonizadores tardíos” o especies periodontopatógenas reconocidas (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005).

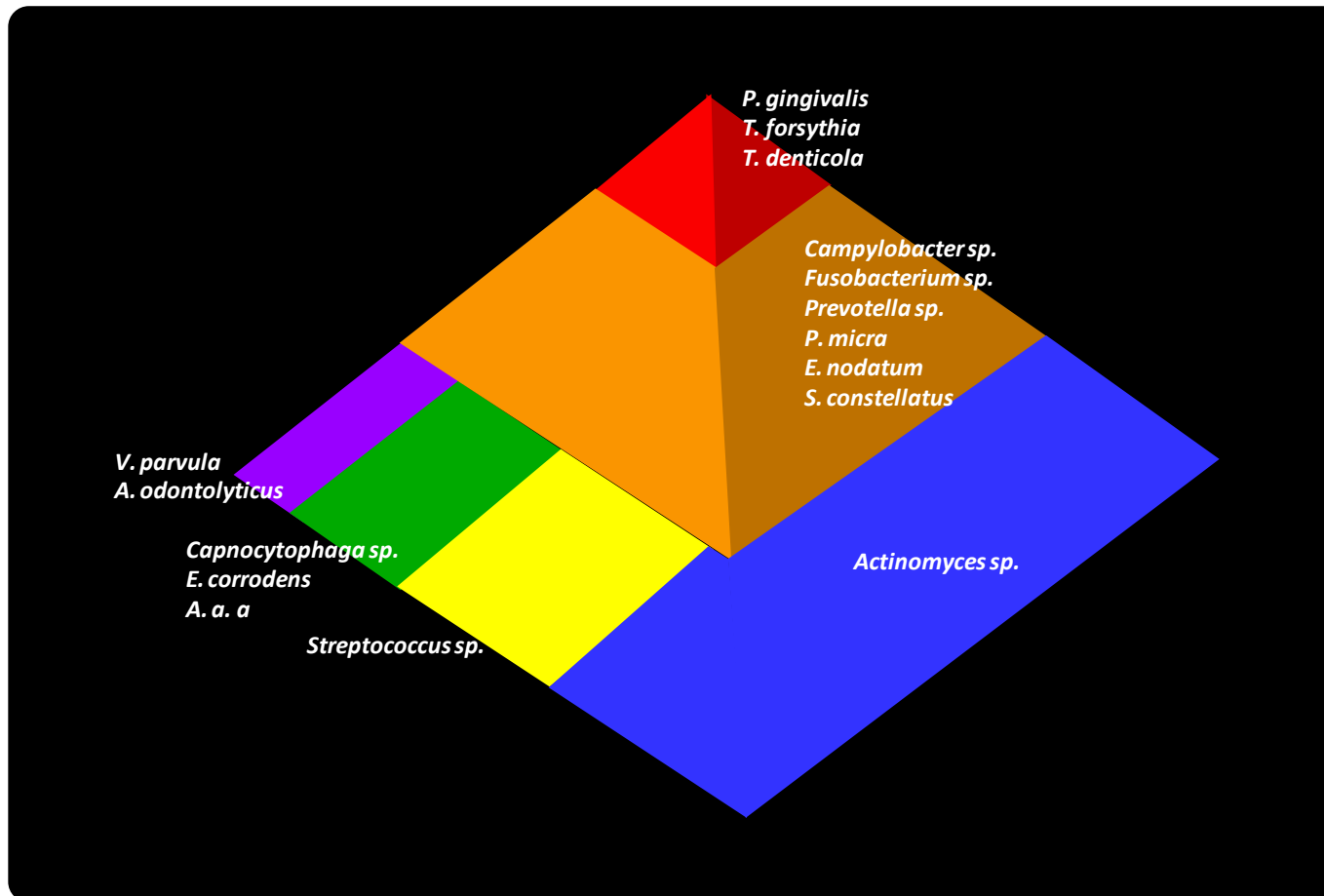


Figura 2. Pirámide ecológica en la placa dentobacteriana subgingival en condiciones de salud periodontal. Los complejos amarillo, morado, verde y azul son especies consideradas primordialmente como “colonizadoras primarias” o especies compatibles con salud periodontal. El complejo naranja está compuesto principalmente por “colonizadores puente” o especies periodontopatógenas putativas y el complejo rojo por “colonizadores tardíos” o especies periodontopatógenas reconocidas (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005).

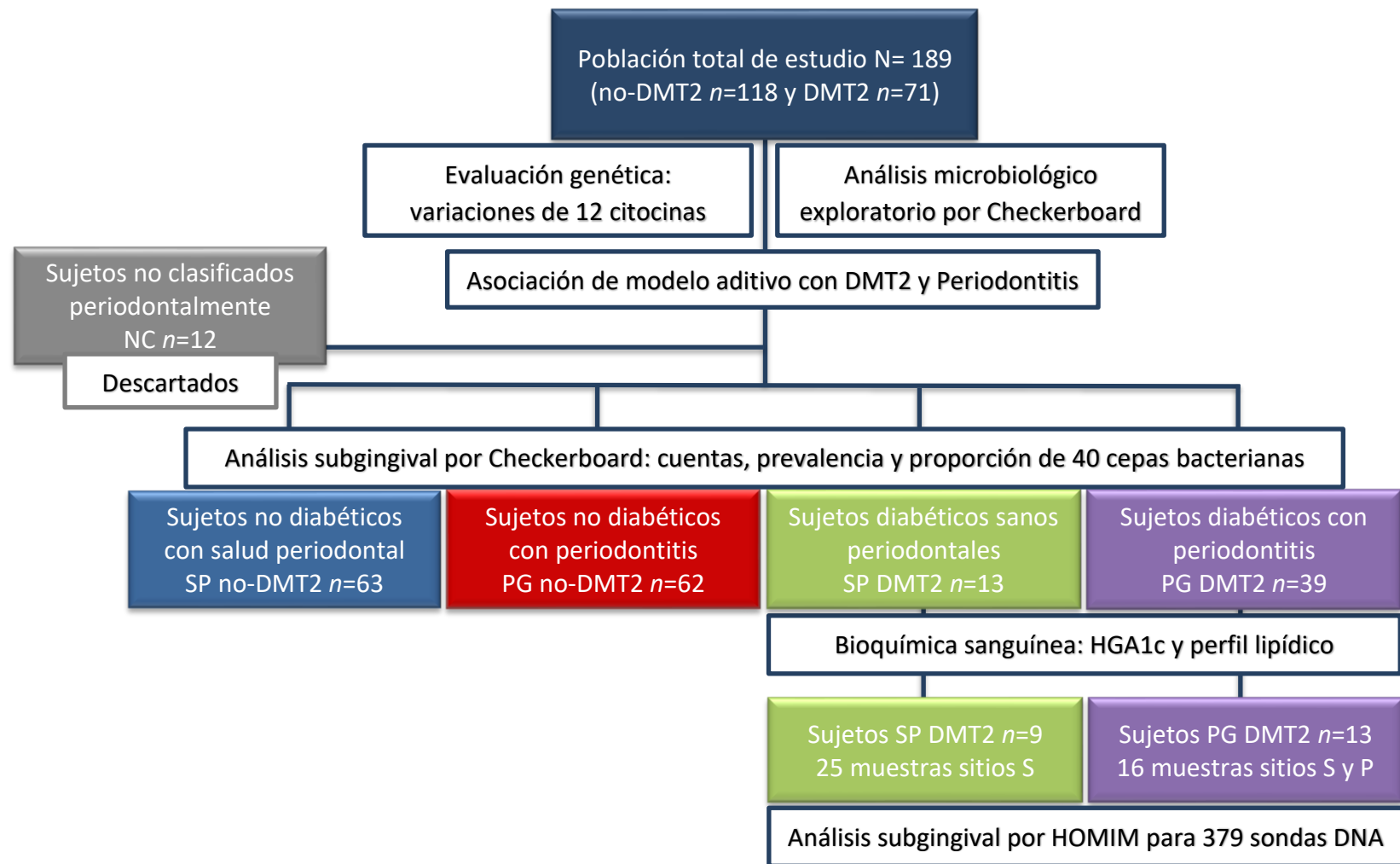


Figura 3. Diagrama de diseño y agrupación de la población de estudio. Estudio de tipo transversal y de casos y controles dónde se evaluó genéticamente a la población total, además de realizarle una exploración microbiológica por Checkerboard a grupos de sujetos no diabéticos (no-DMT2) y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Posteriormente, se evaluó el modelo aditivo como perfil genético para DMT2 y su asociación con Periodontitis. Los sujetos de estudio clasificados para Salud Periodontal (SP) y Periodontitis Generalizada (PG) se sub agruparon y los sujetos que no clasificaran (NC) fueron descartados para el posterior análisis microbiológico. De los sujetos con DMT2, se eligieron además a 22 sujetos para el análisis de sitios sanos periodontales (S) (NI>2mm) y con Periodontitis (P) (NI<5mm), por medio de la técnica de Identificación por Microarreglos del Microbioma Oral Humano (HOMIM).

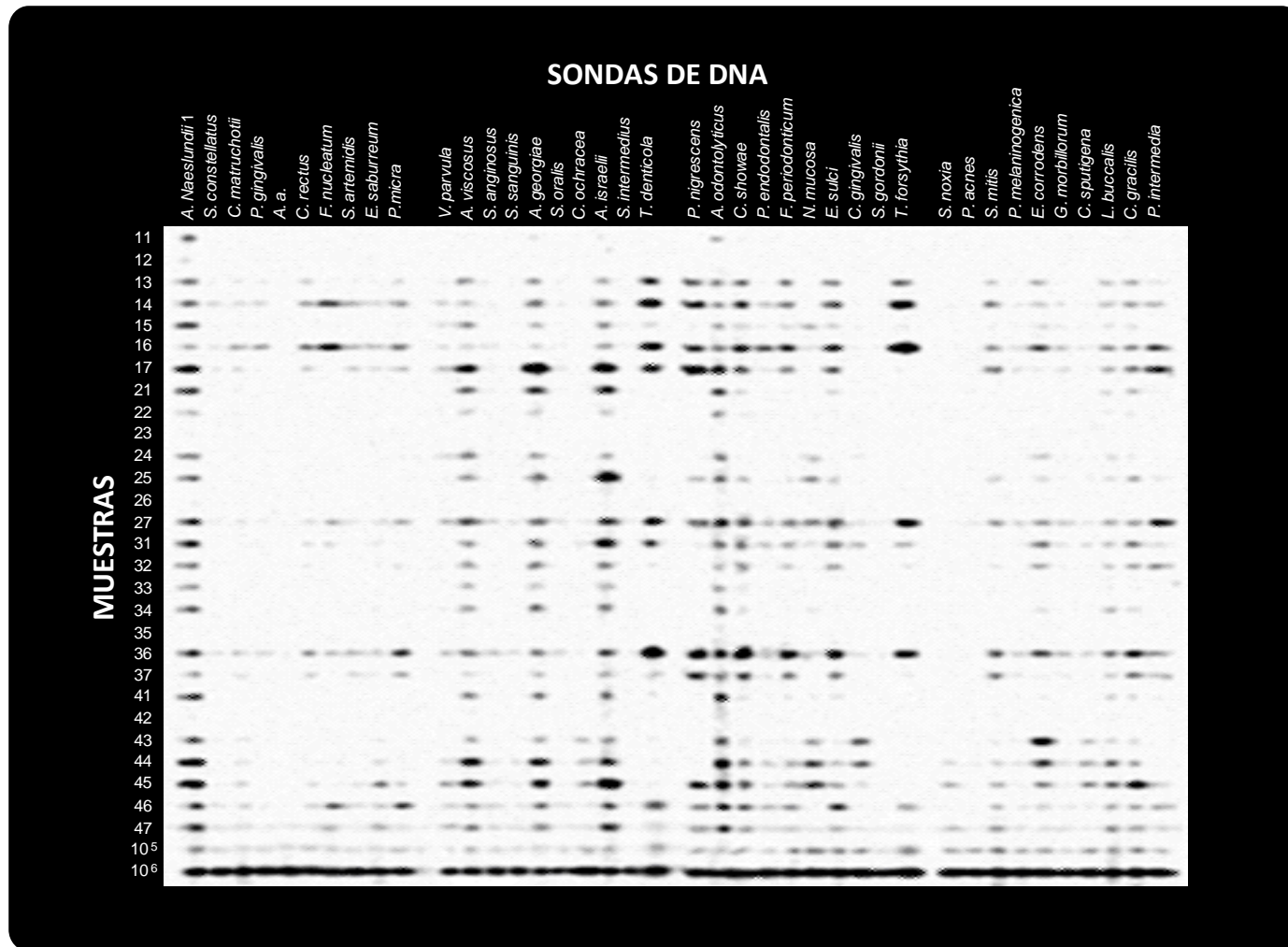


Figura 4. Imagen de una membrana de nylon en la que fueron procesadas microbiológicamente 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival para la identificación y enumeración de 40 especies bacterianas mediante la técnica de checkerboard para hibridaciones DNA-DNA.

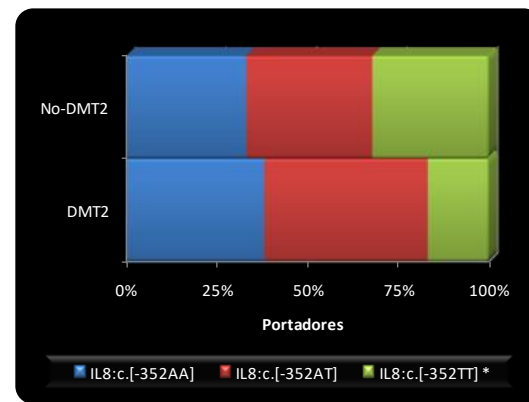
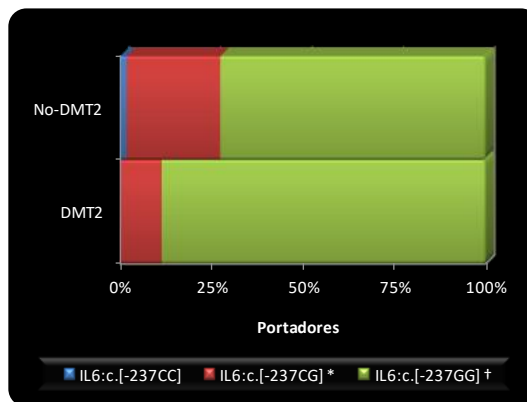
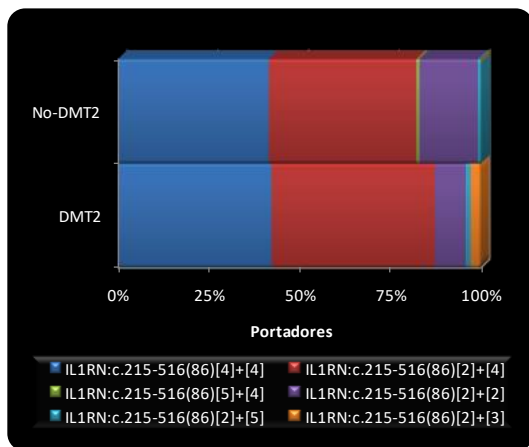
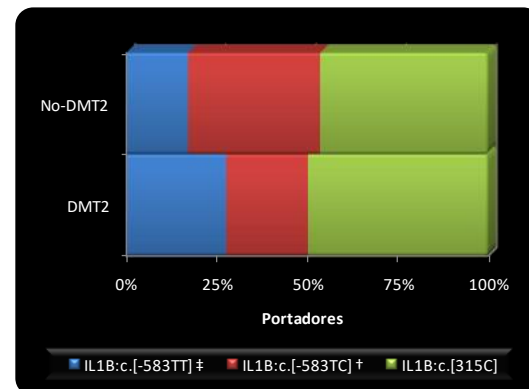
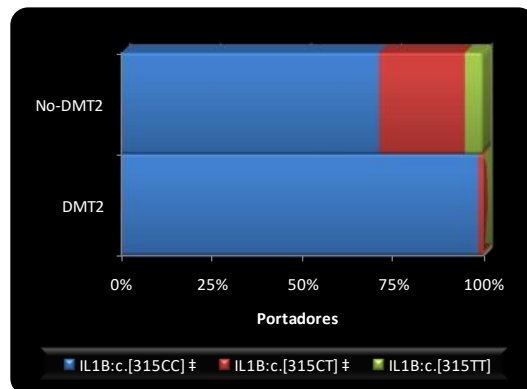
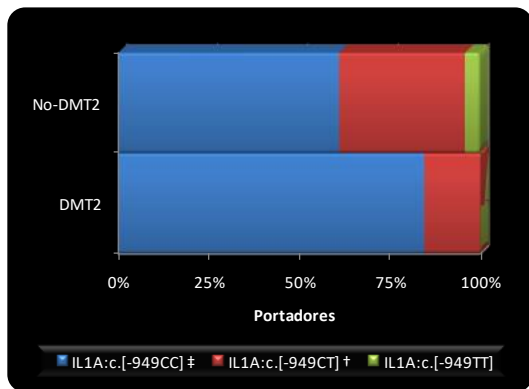


Figura 5a. Gráficas de mosaico que ilustran las diferencias en la proporción de portadores de los diferentes genotipos en la población total de estudio N= 189 (no-DMT2 n=118 y DMT2 n=71) para las variaciones genéticas evaluadas. Prueba U de Mann-Whitney: * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$.

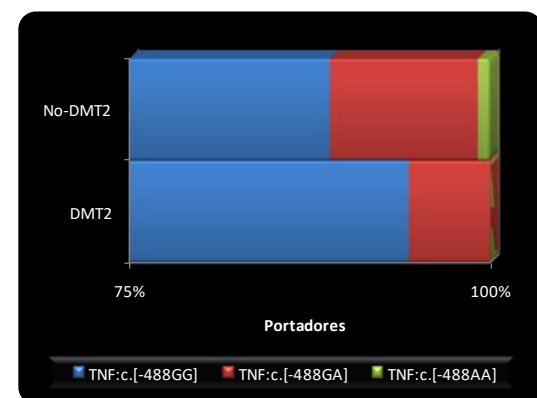
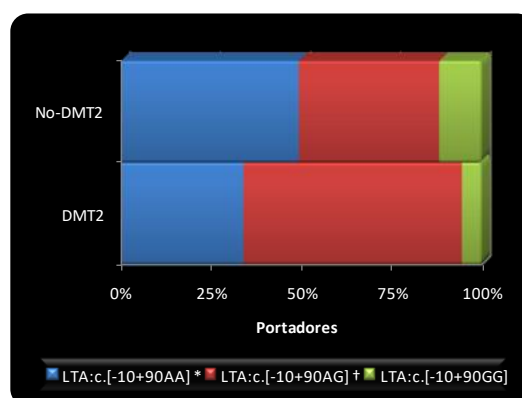
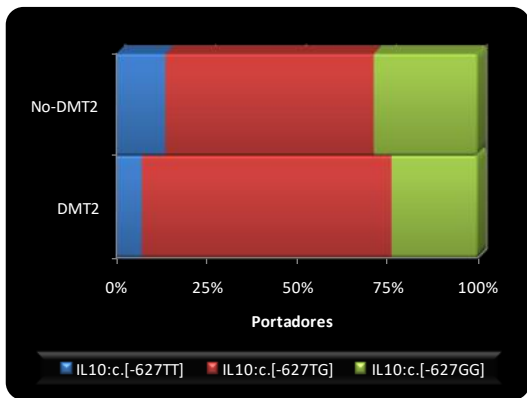
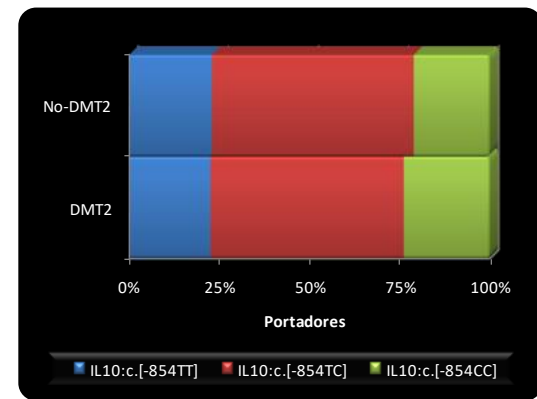
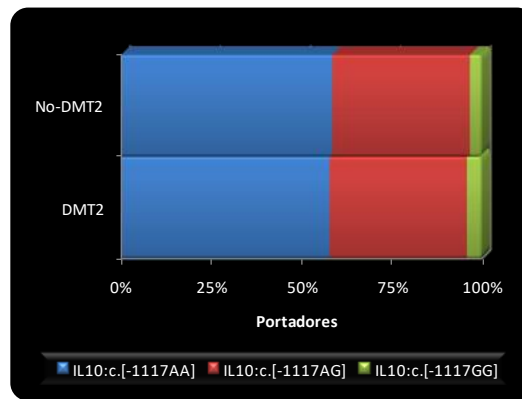
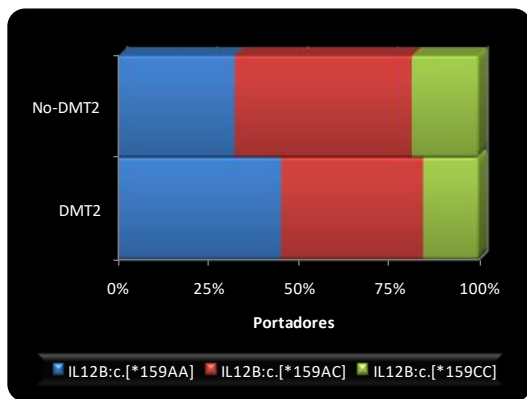
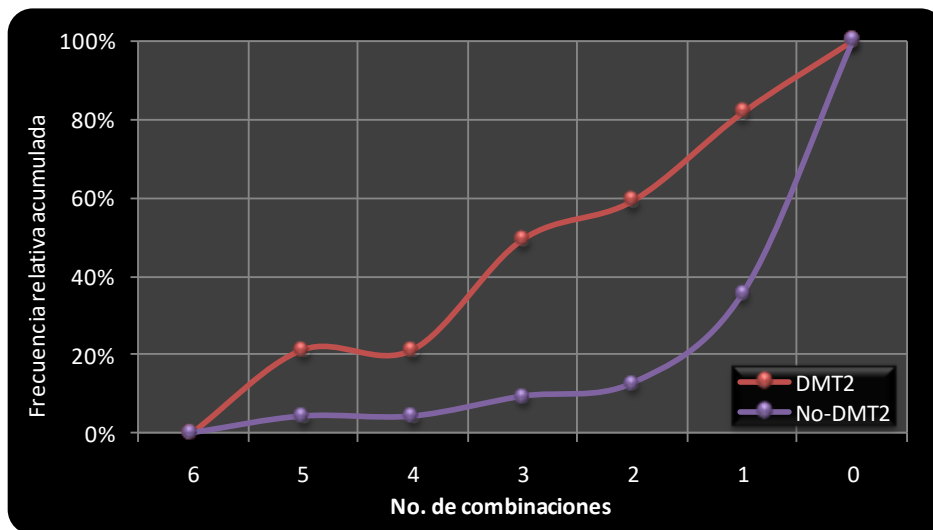


Figura 5b. Gráficas de mosaico que ilustran las diferencias en la proporción de portadores de los diferentes genotipos en la población total de estudio N= 189 (no-DMT2 n=118 y DMT2 n=71) para las variaciones genéticas evaluadas (cont). Prueba U de Mann-Whitney: * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$.

Haplotipos candidato	No-DMT2			DMT2			ESTADÍSTICAS							
	n	i	%(i)=	n	i	%(i)=	D_{max}	SEN	EXC	IFN	M-W (p=)	Fisher (p=)	RM	M-H (p=)
IL1A:c.[-949CC] + IL1B:c.[315CC] + IL1B:c.[-583TT] + IL6:c.[-237GG]	118	12	10.2	71	30	42.3	-32.1	0.42	0.72	0.58	0.000	0.000	6.46	0.000
IL1A:c.[-949CC] + IL1B:c.[315CC] + IL6:c.[-237GG] + IL8:c.[-352A]	28	23.7		43	60.6	-36.8	0.61	0.70	0.39	0.000	0.000	4.94	0.000	
IL1A:c.[-949CC] + IL1B:c.[315CC] + IL6:c.[-237GG] + LTA:c.[-10+90AG]	18	15.3		33	46.5	-31.2	0.46	0.70	0.54	0.000	0.000	4.82	0.000	
IL1B:c.[315CC] + IL1B:c.[-583TT] + IL6:c.[-237GG] + IL8:c.[-352A]	9	7.6		30	42.3	-34.6	0.42	0.74	0.58	0.000	0.000	8.86	0.000	
IL1B:c.[315CC] + IL6:c.[-237GG] + IL8:c.[-352A] + LTA:c.[-10+90AG]	11	9.3		29	40.8	-31.5	0.41	0.72	0.59	0.000	0.000	6.72	0.000	
Modelo aditivo (2 o más de los anteriores)	15	12.7		42	59.2	-46.4	0.59	0.77	0.41	0.000	0.000	9.94	0.000	
Modelo aditivo (1 o más de los anteriores)	42	35.6		58	81.7	-46.1	0.82	0.71	0.18	0.000	0.000	8.07	0.000	



No. de haplotipos	FRA		Dks
	No-DMT2	DMT2	
6	0.000	0.000	0.000
5	0.042	0.211	0.169
4	0.042	0.211	0.169
3	0.093	0.493	0.400
2	0.127	0.592	0.464
1	0.356	0.817	0.461
0	1.000	1.000	0.000

Figura 6. Gráfica que muestra la separación que se produce entre los en la población total de estudio N= 189 (no-DMT2 n=118 y DMT2 n=71), resultado de la aplicación del modelo aditivo propuesto para marcar específicamente al grupo DMT2. El cuadro que se presenta en el extremo inferior derecho presenta las frecuencias relativas acumuladas (FRA) que se producen al aplicar el modelo aditivo al conjunto de los 5 haplotipos. El punto de corte fue establecido en donde se produjo la máxima separación entre los grupos (Dks) (1 o más haplotipos). El cuadro superior sintetiza las estadísticas de evaluación relativas a cada uno de los 5 haplotipos y del modelo aditivo.

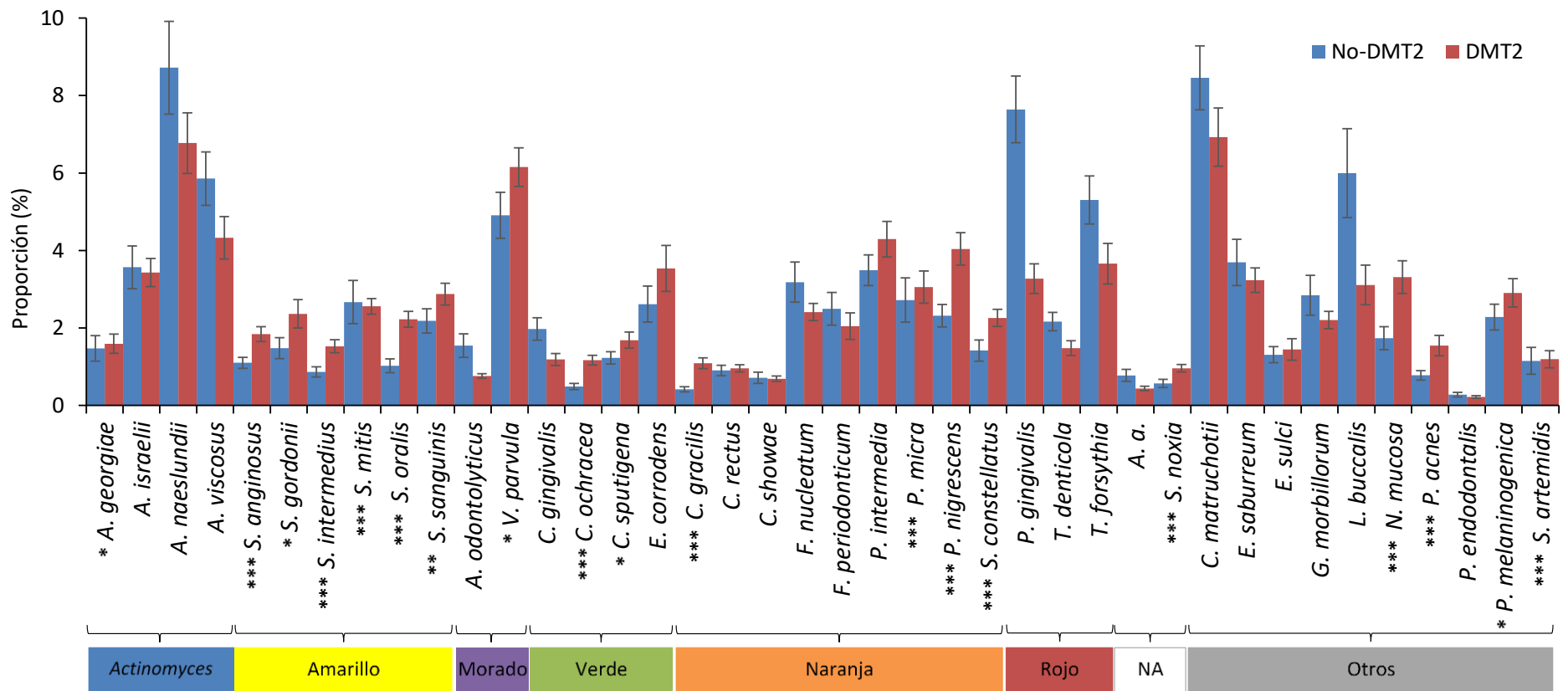


Figura 7. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales ± EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 189 sujetos de estudio (no-DMT2 $n=118$ y DMT2 $n=71$). Las proporciones fueron calculadas para cada especie en cada muestra de placa, promediadas entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. Prueba U de Mann-Whitney: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$, con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991). **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

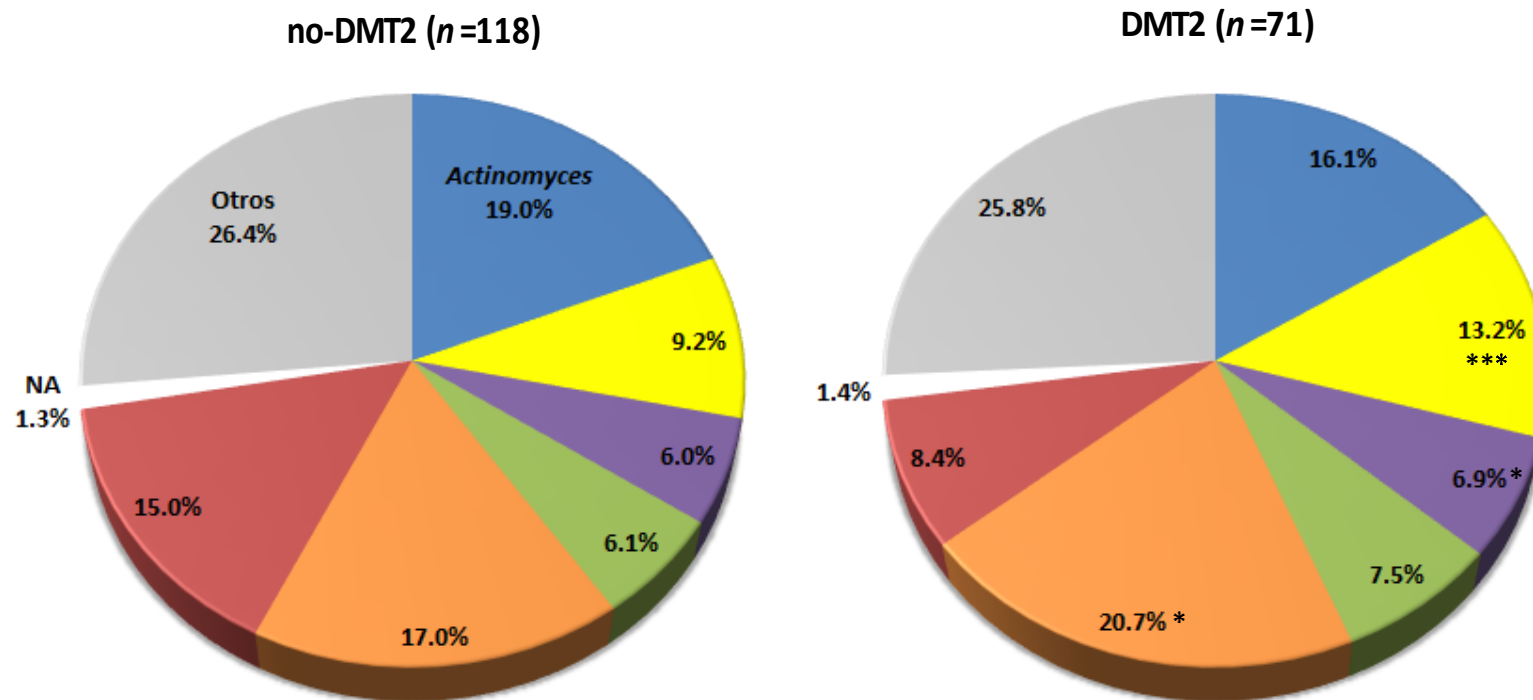


Figura 8. Proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 189 sujetos de estudio (no-DMT2 $n=118$, DMT2 $n=71$). Las 40 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005). Las proporciones fueron calculadas para cada complejo bacteriano en cada muestra de placa, promediadas entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. Prueba *U* de Mann-Whitney: * $p<0.05$ y *** $p<0.001$, con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991). **NA:** especies no-agrupadas.

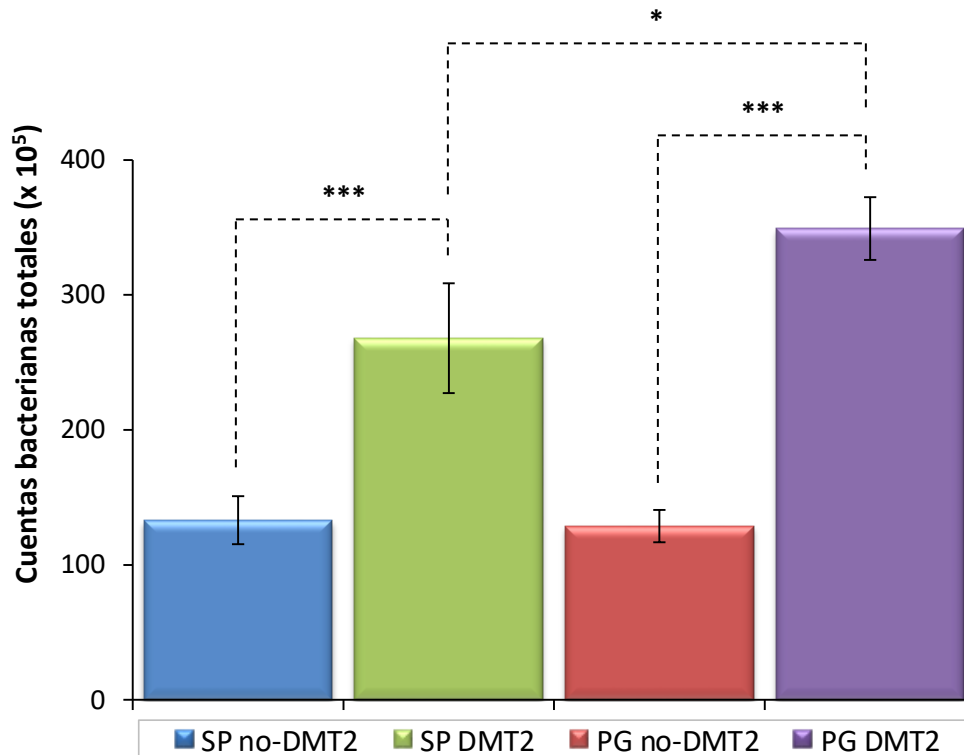


Figura 9. Niveles totales promedio (cuentas bacterianas totales $\times 10^5 \pm$ EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 177 sujetos de estudio (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio, obteniendo posteriormente la sumatoria del promedio de cuentas de todas las especies evaluadas y finalmente el promedio de las sumatorias entre los sujetos de cada grupo de estudio. Las diferencias entre los grupos SP no-DMT2 y PG no-DMT2 no fueron estadísticamente significativas a diferencia del resto de las comparaciones. Prueba *U* de Mann-Whitney: ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

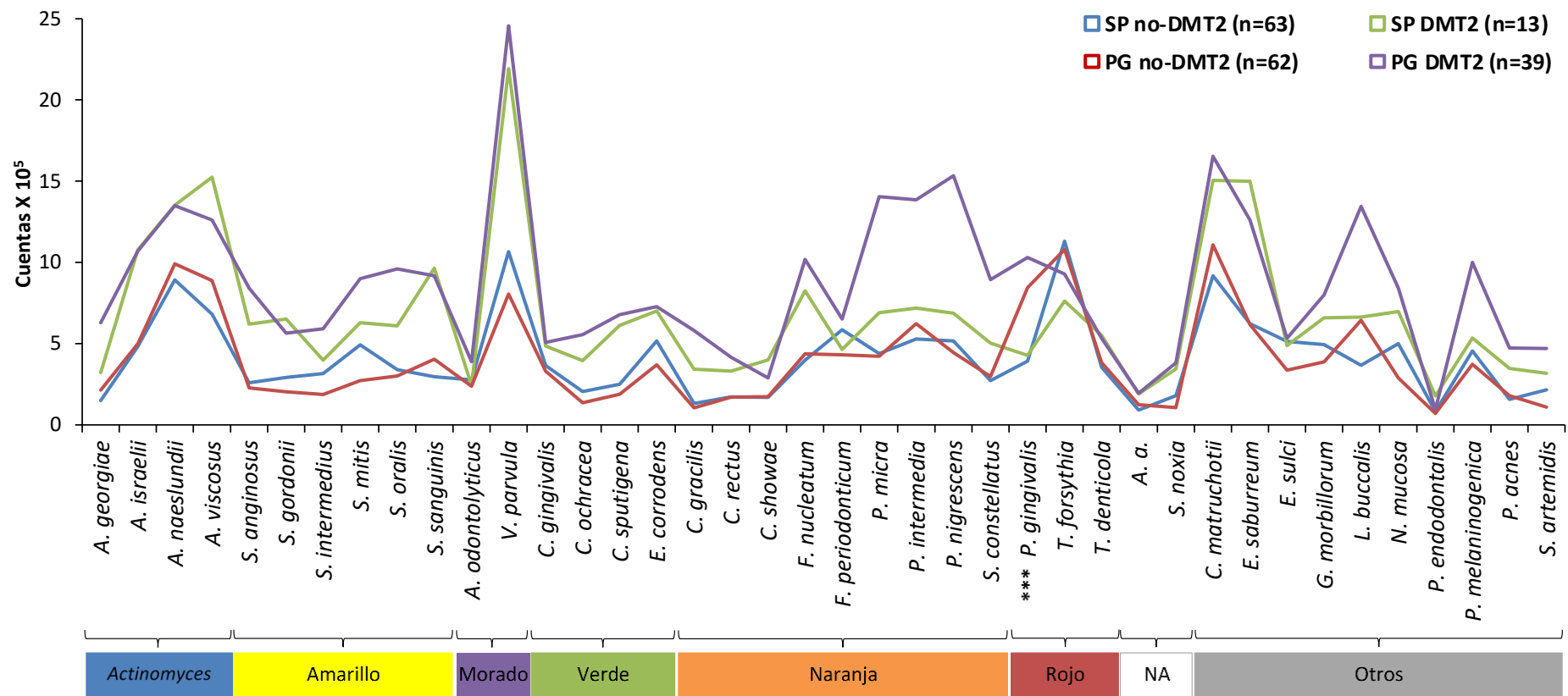


Figura 10. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 177 sujetos de estudio (SP no-DMT2 n=63, SP DMT2 n=13, PG no-DMT2 n=62 y PG DMT2 n=39). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. Diferencias entre los grupos SP y PG, prueba de Kruskal Wallis: *** p<0.001, con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991). La significancia de las diferencias entre los grupos no-DMT2 y DMT2 se presentan en la **Tabla 10**.

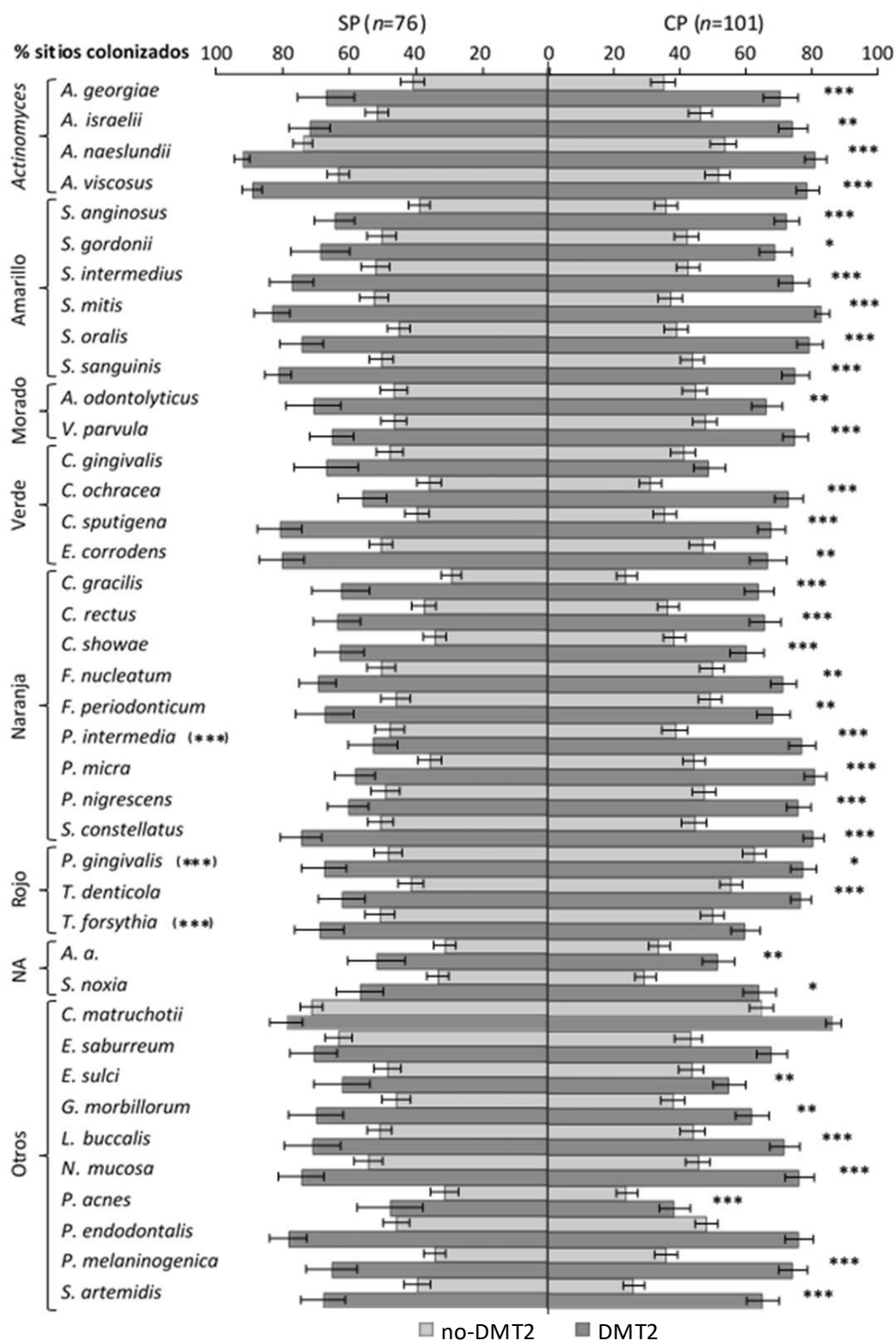


Figura 11. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 177 sujetos de estudio (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$). La prevalencia fue calculada para cada especie en cada muestra de placa, promediadas entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. Prueba de Kruskal Wallis: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ para las comparaciones entre grupos no-DMT2 vs. DMT2 y (***) $p<0.001$, para las comparaciones entre grupos SP vs. PG, con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991).

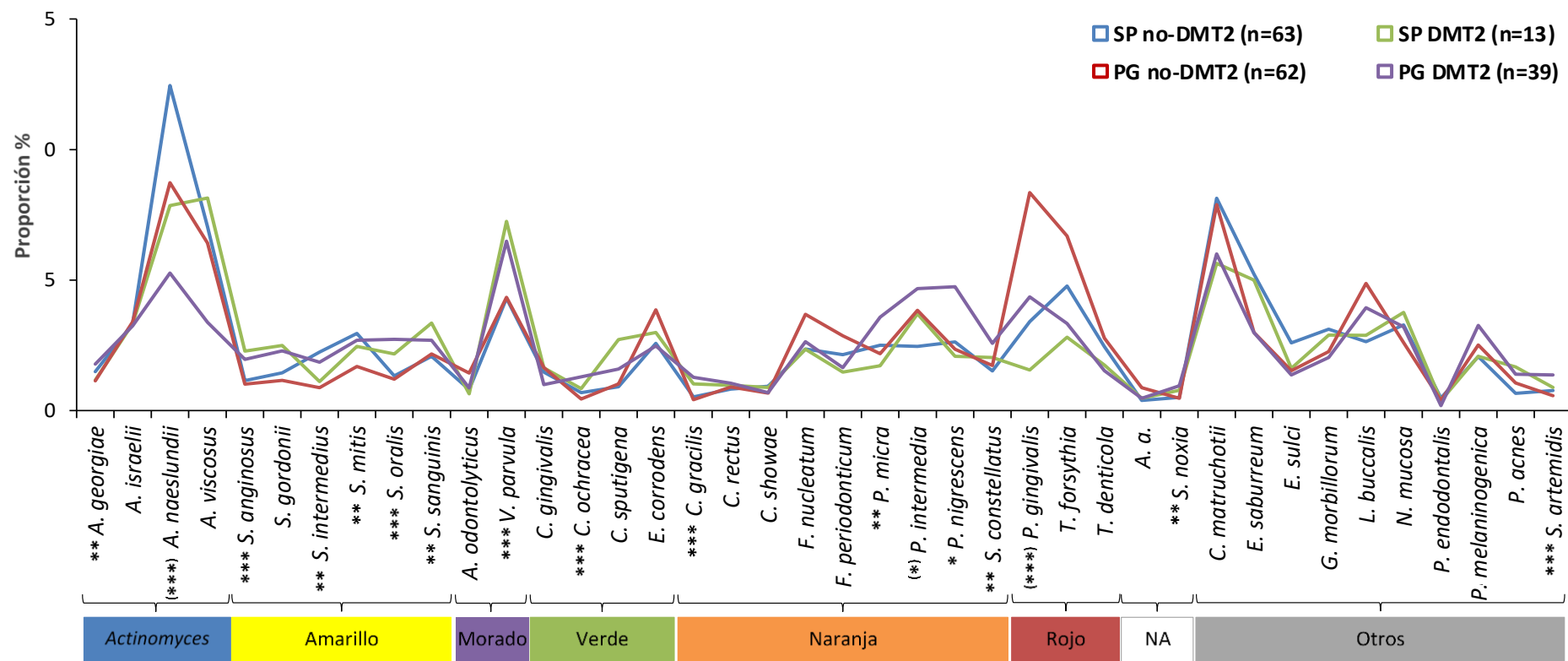


Figura 12. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 178 sujetos de estudio (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$). Las proporciones fueron calculadas para cada especie en cada muestra de placa, promediadas entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. Prueba de Kruskal Wallis: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ para las comparaciones entre grupos no-DMT2 vs. DMT2 y (*) $p<0.05$ y (***) $p<0.001$ para las comparaciones entre grupos SP vs. PG, con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991).

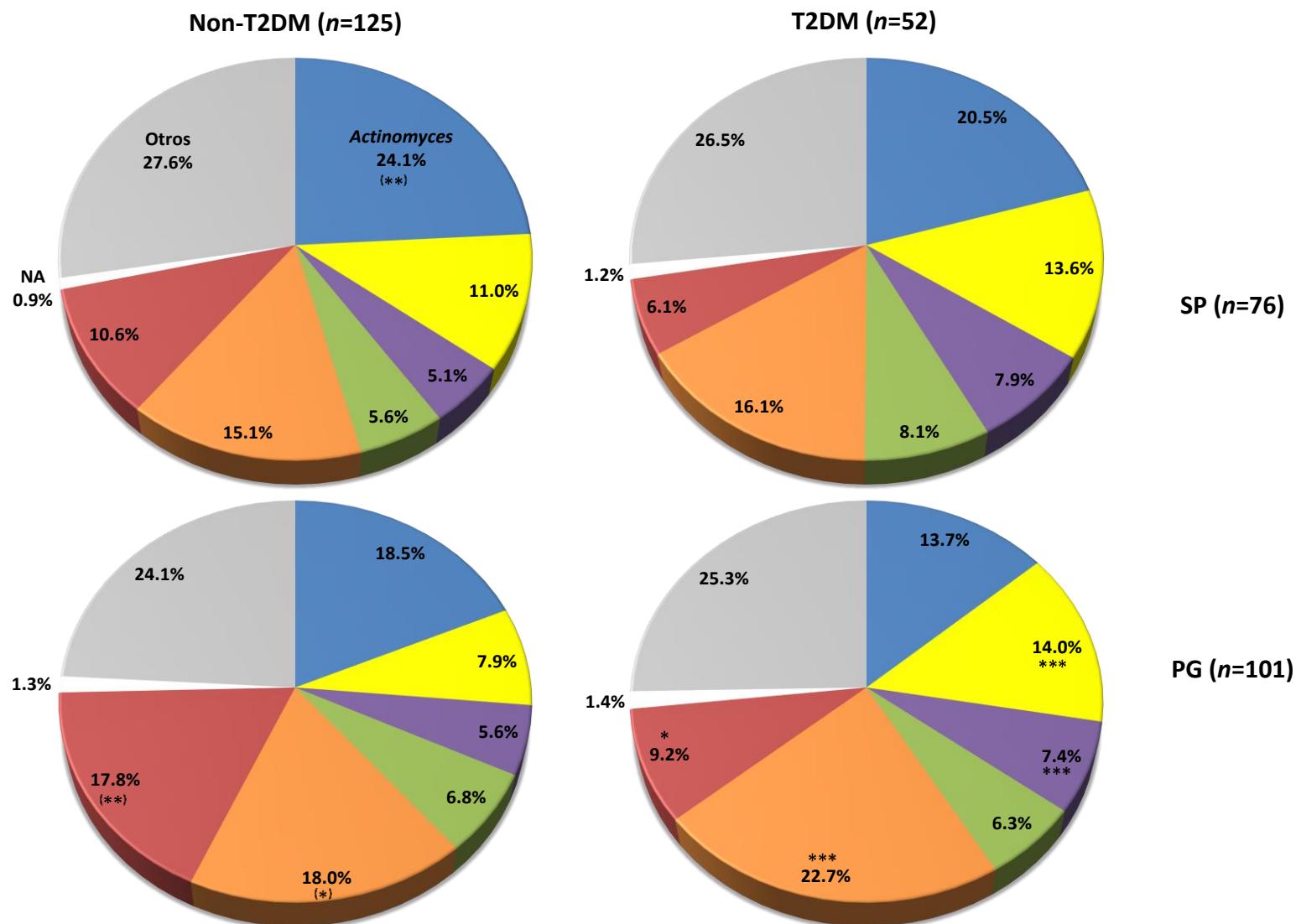


Figura 13. Proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 177 sujetos de estudio (SP no-DMT2 $n=63$, SP DMT2 $n=13$, PG no-DMT2 $n=62$ y PG DMT2 $n=39$). Las 40 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky, Haffajee et al. 1998, Socransky and Haffajee 2005) (las excepciones se describen en la **tabla 4**). Prueba de Kruskal Wallis: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ para las comparaciones entre grupos no-DMT2 vs. DMT2 y (*) $p<0.05$ y (**) $p<0.01$ para las comparaciones entre grupos SP vs. PG, con ajuste de comparaciones múltiples (Socransky and Haffajee 1991).

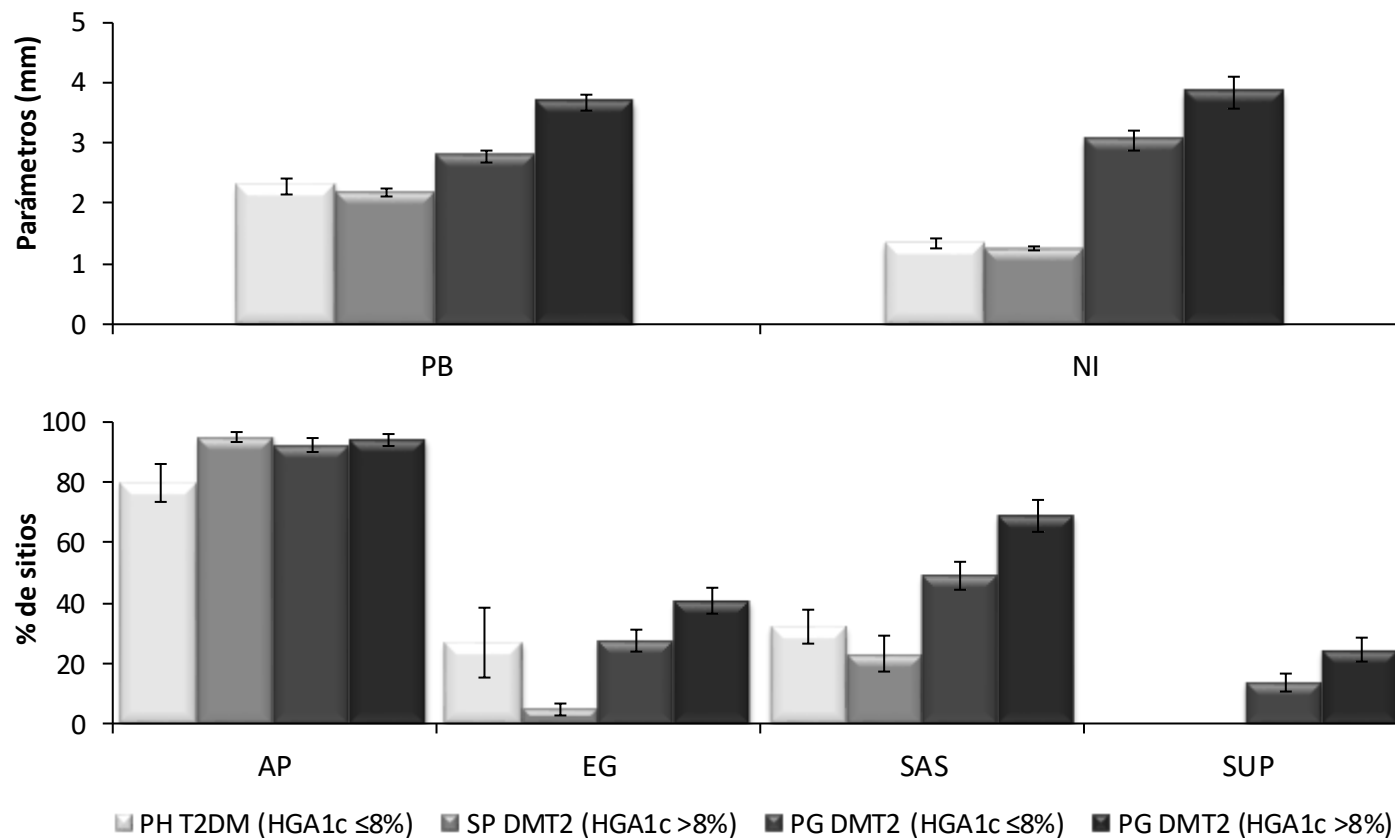


Figura 14. Características periodontales de los 52 sujetos diabéticos (SP DMT2 $n=13$ y con PG DMT2 $n=39$), en relación con distintos niveles de HGA1c. **mm:** milímetros, **%:** porcentaje. **PB:** profundidad de bolsa. **NI:** nivele de inserción. **PLA:** placa. **ENR:** enrojecimiento. **SAS:** sangrado al sondeo. **SUP:** supuración. **SP:** salud periodontal. **PG:** Periodontitis generalizada. **DMT2:** sujetos con diabetes mellitus tipo 2. Los sujetos fueron agrupados por: **HGA1c ≤8%:** hemoglobina glucosilada de buen control y **HGA1c >8%:** hemoglobina glucosilada de pobre control. Prueba *U* de Mann-Whitney * $p<0.05$ y *** $p<0.001$ para las comparaciones entre grupos de HGA1c $\geq 8\%$ y HGA1c $>8\%$.

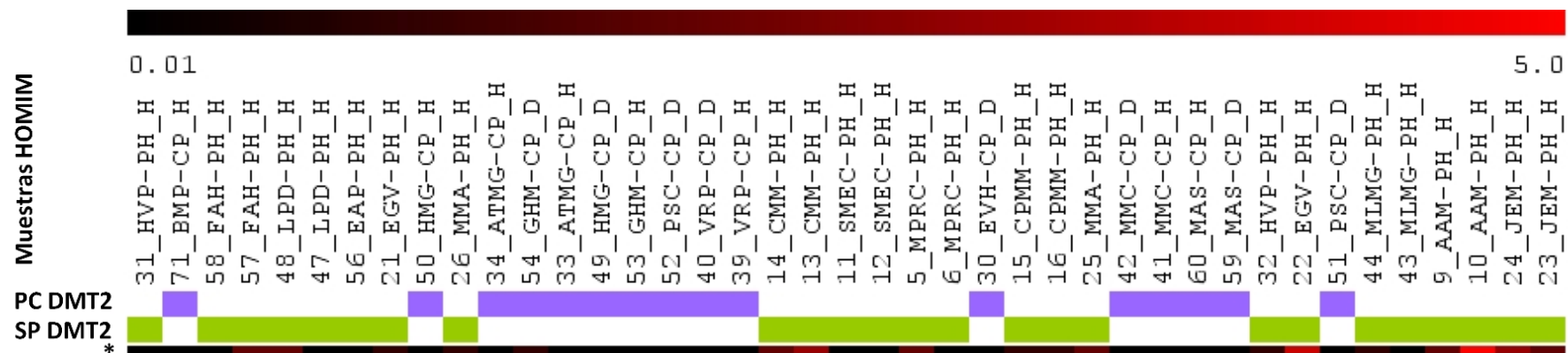


Figura 16. Descripción de las 41 muestras para procesamiento por HOMIM por grupos de estudio SP ($n=25$) y PG ($n=16$) DMT2. Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$ después del ajuste de comparaciones FDR (Benjamini-Hochberg). Sonda HOMIM con significancia, correspondiente a: *Streptococcus salivarius* HOT-755 / *Streptococcus vestibularis* HOT-021 / *Streptococcus* sp. HOT-067_E34. La descripción de las muestras contiene: código de la muestra (numérico), iniciales del sujeto de estudio, clasificación de SP (PH) y PG (CP), así como la agrupación de sitio sano $n=25$ (H) o enfermo $n=16$ (D).

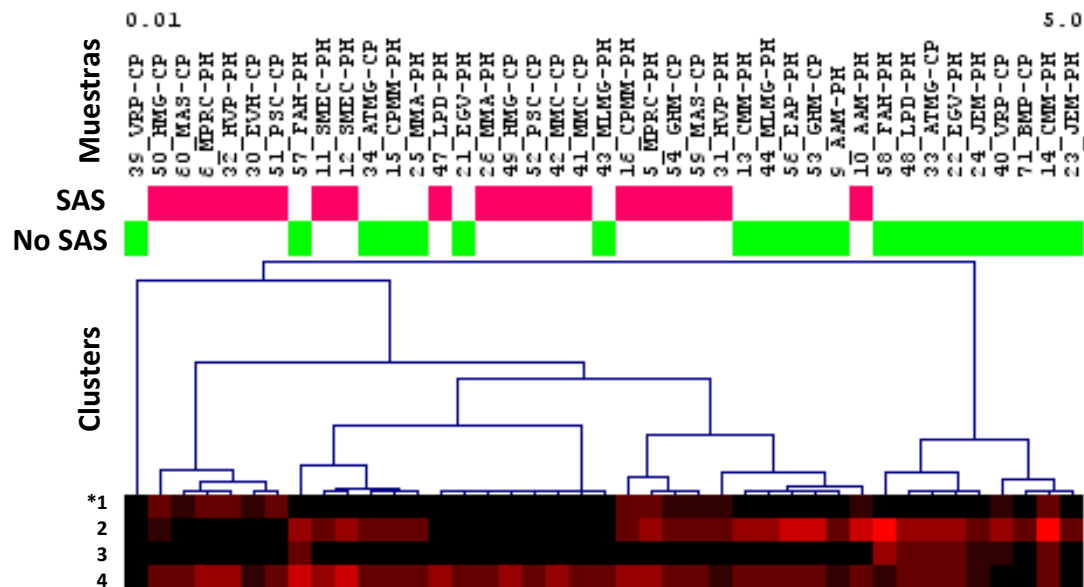


Figura 17. Descripción de las muestras HOMIM por grupos de sangrado al sondeo **SAS** ($n=20$) y no sangrado al sondeo **SAS** ($n=21$) del grupo de DMT2 (SP y PG). Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$ después del ajuste de comparaciones FDR (Benjamini-Hochberg). Sondas HOMIM con significancia, correspondiente a: 1. SR1[G-1] sp. HOT-345,874_AC72; 2. *Campylobacter concisus* HOT-575/ *Campylobacter rectus* HOT-748_X36; *Rothia dentocariosa* HOT-587/ *Rothia mucilaginosa* HOT-681_E52; *Rothia mucilaginosa* HOT-681_AB63. La descripción de las muestras contiene: código de la muestra (numérico), iniciales del sujeto de estudio, clasificación de SP (PH) y PG (CP), así como la agrupación de sitio sano (H) o enfermo (D).

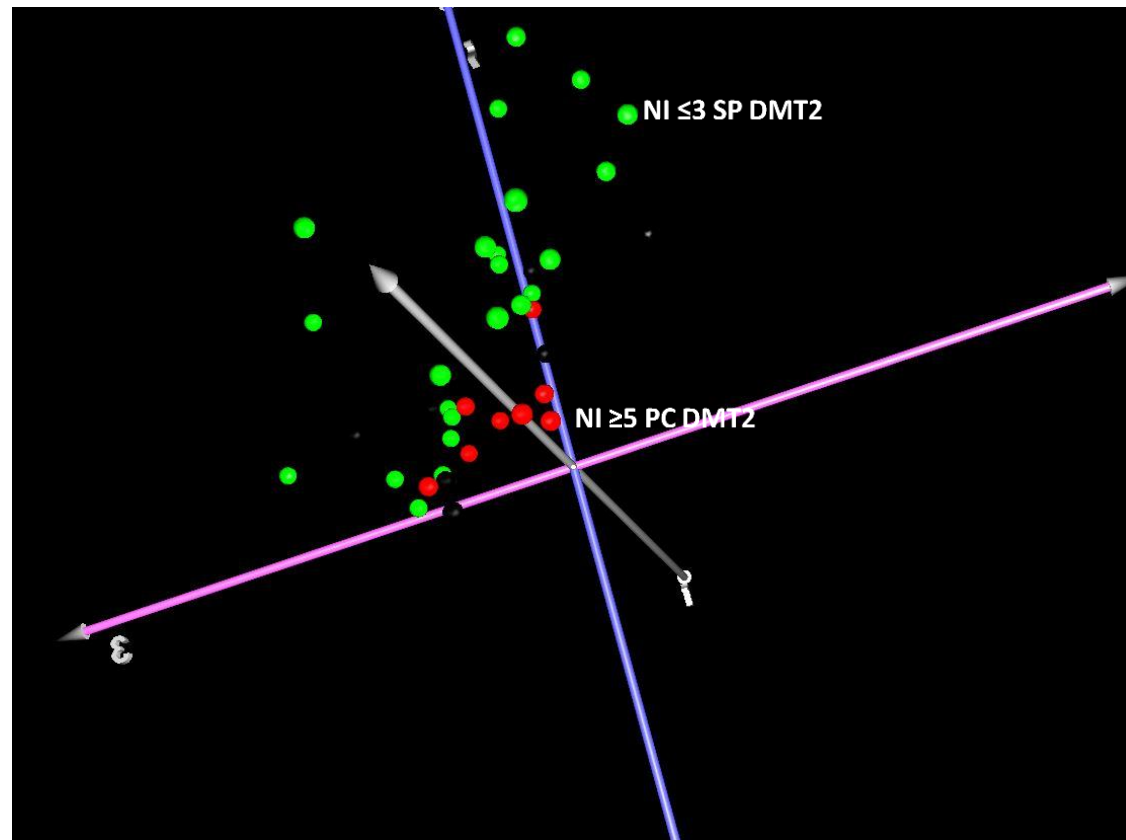


Figura 18. Análisis de Componentes Principales para la agrupación de sitios muestreados para la técnica de HOMIM. NI ≤ 3 mm correspondiente a sitios sanos periodontales (círculos verdes) y ≥ 5 mm correspondiente a sitios con enfermedad periodontal (círculos rojos) de DMT2 ambos tipos de muestras. Las muestras de sitios con NI ≤ 3 mm de PG DMT2 fueron ocultadas en círculos negros, para poder observar las diferencias entre el resto de los grupos.

ANEXOS

Anexo 1. Formato de consentimiento informado

(hoja 1 de 3)

Laboratorio de Genética Molecular
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA (FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (5)
SECCIÓN ISO: 4.2

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie.

CLÍNICOS RESPONSABLES:

- Mtra. Adriana-Patricia Rodríguez-Hernández.
- Esp. Velia Jacobo-Soto.
- Dra. Gaby Esthela-Tiznado.
- Mtra. Ma. de Lourdes Márquez-Corona.

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

TELÉFONO: (044) 55-2699-7530 (horas y días hábiles)

E-MAIL: contacto@labgenmol.onmicrosoft.com

TÍTULO DEL PROYECTO: Factores microbiológicos y 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.

COPIA ARCHIVO



ISO 9001:2008
COPANT/ISO 9001-2008
NMX-CC-9001-IMNC-2008

Iniciales del paciente

Circuito Institutos
Cd. Universitaria
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA
(FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (5)
SECCIÓN ISO: 4.2

- **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 atiende 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 conlleva 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.



Laboratorio de Genética Molecular
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México



**CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA
(FOLIO NO. 001)**

FE-GMLIFO-001 (5)
SECCIÓN ISO: 4.2

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.

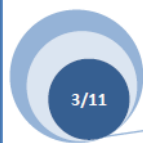
RENUNCIA/RETIRO: Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología 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)

COPIA ARCHIVO



ISO 9001:2008
COPANT/ISO 9001-2008
NMX-CC-9001-IMNC-2008

Iniciales del paciente

Circuito Institutos
Cd. Universitaria
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005

Anexo 2. Calibración de clínicos para estudios de investigación periodontal

(Hoja 1 de 3)

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



A continuación se detalla la información y resultados relacionados con el ejercicio de calibración clínica periodontal en el cual usted participó:

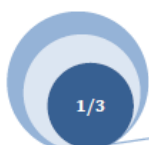
Ejercicio de calibración

Número	CCP-001b-2011
Fecha	08 de Noviembre de 2011
Clínicos evaluados	9 (nueve)
Apuntadores evaluados	7 (siete)
Sesiones teóricas	1 (una)
Sesiones prácticas	3 (tres)

Participante

Código	C01
Nombre	Dra. María de Lourdes Márquez Corona
Puesto	Profesor/investigador de tiempo completo
R.F.C.	MACL630413HX4
Institución o empresa	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Instituto de Ciencias de la Salud Área Académica de Odontología
Calle y no.	Carretera tilcuautla s/n
Colonia	Exhacienda la Concepción
Delegación	San Agustín Tlaxiaca
Ciudad	Pachuca de Juárez
Estado	Hidalgo
País	México
Código postal	
Teléfono	01771-72000 x 5112
Fax	01771-72000 x 5111
Móvil	771-175-7888
E-mail	lulumaco_1@yahoo.com.mx
Web	
Sesiones teóricas	1 de 1 (100%)
Sesiones prácticas	1 de 1 (100%)
Ejercicios anteriores	2 (dos)

El presente documento está compuesto por un total de 3 (3) páginas incluyendo ésta y contiene firmas electrónicas. El reporte que se presenta a continuación se emite a petición del solicitante como parte de un servicio contratado para los fines que al mismo convengan. El Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM y sus integrantes se deslindan de cualquier responsabilidad relacionada con el uso o divulgación de la información y resultados proporcionados, mismos que no constituyen conflicto de interés alguno ya que las partes no sostienen vínculos científicos o económicos que pudieran interpretarse como tal.



ISO 9001:2000
COPANT/ISO 9001-2000
NMX-CC-9001-IMNC-2000

Circuito escolar s/n
Cd. Universitaria 04510
5622-5565
lximenez@post.harvard.edu

Anexo 2. Calibración de clínicos para estudios de investigación periodontal
(hoja 2 de 3)

Laboratorio de Genética Molecular
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México



Descripción de la sesión práctica

Total de pacientes	2 (dos)
Códigos pacientes	P10 y P11
Condición pacientes	Salud periodontal y Periodontitis
Sitios por paciente	84
Apuntadores	1 (uno)
Códigos apuntadores	A10 - Katya Azucena Ávila Márquez

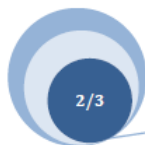
Resultados

Código paciente	P10
Condición paciente	Salud Periodontal
Código apuntador	A10
PB promedio (\pm EEM, mm)	1.86 \pm 0.08
NI promedio (\pm EEM, mm)	0.88 \pm 0.06
Medidas con variabilidad (%)	26.2 (PB), 34.5 (mB)
Índice de medidas con variabilidad baja	1.0 (PB), 1.0 (mB)
Índice de medidas con variabilidad alta	0 (PB), 0 (mB)
Índice de variabilidad	0.13 (PB), 0.17 (NI)
Reproducibilidad (%)	86.8 (PB), 82.6 (NI)

Código paciente	P11
Condición paciente	Periodontitis
Código apuntador	A10
PB promedio (\pm EEM, mm)	3.49 \pm 0.18
NI promedio (\pm EEM, mm)	3.58 \pm 0.21
Medidas con variabilidad (%)	43.6 (PB), 47.4 (mB)
Índice de medidas con variabilidad baja	1.0 (PB), 0.86 (mB)
Índice de medidas con variabilidad alta	0 (PB), 0.14 (mB)
Índice de variabilidad	0.22 (PB), 0.28 (NI)
Reproducibilidad (%)	78.0 (PB), 71.5 (NI)

RESULTADO GENERAL

Índice de variabilidad promedio	0.20
Reproducibilidad promedio (%)	79.7




ISO 9001:2000
COPANT/ISO 9001-2000
NMX-CC-9001-IMNC-2000

Circuito escolar s/n
Cd. Universitaria 04510
5622-5565
Iximenez@post.harvard.edu

Anexo 2. Calibración de clínicos para estudios de investigación periodontal
(hoja 3 de 3)

Laboratorio de Genética Molecular
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México



Interpretación	
Medidas con variabilidad (%)	0 a 20.9-Excelente 21 a 39.9-Aceptable 40 a 100-Inaceptable
Índice de medidas con variabilidad baja	1 a 0.90-Excelente 0.89 a 0.71-Aceptable 0.70 a 0-Inaceptable
Índice de medidas con variabilidad alta	0 a 0.10-Excelente 0.11 a 0.29-Aceptable 0.30 a 1-Inaceptable
Índice de variabilidad	0 a 0.10-Excelente 0.11 a 0.29-Aceptable (*) 0.30 a 1-Inaceptable
Reproducibilidad (%)	90.0 a 100-Excelente 71.0 a 89.9-Aceptable (*) 0 a 70.9-Inaceptable
EVALUÓ:	
Firmado digitalmente por Laurie Ann Ximénez Fyvie Nombre de reconocimiento (DN): cn=Laurie Ann Ximénez Fyvie, o=Facultad de Odontología, UNAM, ou=Laboratorio de Genética Molecular, email=lximenez@post.harvard.edu, c=MX	
 Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie Jefe del Laboratorio de Genética Molecular Firmado por: Laurie Ann Ximenez-F	



ISO 9001:2000
COPANT/ISO 9001-2000
NMX-CC-9001-IMNC-2000

Circuito escolar s/n
Cd. Universitaria 04510
5622-5565
lximenez@post.harvard.edu

Anexo 3. 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.215-516(86)[2_6]	IL6:c.-237C>G	IL8:c.-352A>T						
5'-3' secuencia primer-F (m.t. C°)	TTTATTATTTTTAGAGATGGGGG (57.0)	TCCAGTGTTCATTAGCCACCC (60.1)	GGTAACAGCACCTGGTCTTGC (62.0)	ACTCCTATTGACCTGGAGCACAGGT (65.5)	TTTCTTTTGAAAACCTCTGTC (57.8)	AGTATGCCCCCTAAGAGCAG (58.4)						
5'-3' secuencia primer-R (m.t. C°)	CGGGAGGTATGCCTAAGG (59.1)	CAGGATGTTCCATTACCTTG (58.5)	GCACATACTTTTCTTATTACCTTC (58.5)	TTGGTTAATCTTCTATTACCTGC (57.3)	GAGCCTCAGACATCTCCAGTC (59.0)	CAAACTGAGTCATCACACTCC (61.0)						
Tamaño del producto (bp)	387	351	306	394	347	398						
Secuencia del producto	TTTATTATTTTTAGAGATGGGGGcttca a t g t t c c c a c a c t g g a c t a a a c t c t g g g c c t c a a g t g a t t g c t g c t c a g c c t c t g a a t a g c t g g g a c t a g g g g c a t g c c a t c a c t a g t t c a t t t c c t a t t a a a a t a c a t g g c t t a a c t c c a a c t g g a a c c c a a a c a t t a t t g c t a a g a g t c t g g t t t c c a c c c t g a a c t a g g c t g c c a c a g g a a t t a t a a a g c t g a a a t t c t t a a t a t a g t a a c c a g g c a a c a c c a t t g a a g g c t c a t a t g t a a a a a t c a t g c t t c c t t c c a a t c t c a t t c c c a a a c t a g c c a c t g g c t t g g c t g a g c C T T A C G C A T A C T C C C G	TCCAGTGTTCATTAGCCACCCc a c t c c c a g c t t c a t c c c t a c t g g t t g t c a t c a g a t t g a c g t a t a t g c t a g g t g c c t c c a a g a a a t c a a a t t t g c c g c t c g c t c a g a g g c t g c c c t c t g a t t t a t a c t a a a c a a c a t g t g c t c a c a t t t c a g a a c t a c t t c t t c g a c a c a t g g g a t a a c a g a g c c t t a t g t g c a c g a t g c a c t g t a c g a t c a c t g a a c t g c a c g t c c g g a c t c a c a g c a a a a a g c t t g g t a t g t c t g t c c a t a t g a a c t g a a a g c t c c c a c t c c a g g a c a g g a t a t g g a g c a a C A A G G T A A A T G G A A A C A T C C T G	GGTAACAGCACCTGGTCTTGCagggtgtgt g a g c t a t c t c c a g g g t g c c c c a a c t c c g t c a g g a g c c t g a a c c c t c a t a c g t a t g t t c t g c c c c a g c c a a g a a g g t c a a t t t t c t c a g a g g c t c t g c a a t g a c a g a g a g c t c t g a g g c a g a a c a g c a c c c a a g g t a g a c c c a c a c c t c a t a c a g a c a g g g a g g c t a t t g g c c t c a t t g t a c c a t t t a c c a t g t a a t g g g a a g a t t c t a a a c t t a a g t a c a a G A A G T G A A T G A A G A A A A G A T A T G T G C	ACTCCTATTGACCTGGAGCACAGGTatcctgg g g a a a g t g a g g g a a a t a t g g a c a t c a t g g a a c a a c a t c a g g g a g a c t c a g g c c t a g g a g t a c t g g g t a g t g t g c a t c c t g g g a a a g t g a g g g a a a t a t g g a c a t c a c a t g g a a c a a c a t c c a g g a g a c t c a g g c c t c t a g g a a a t a t g g a c a t c a c a t g g a a c a a c a t c c a g g a g a c t a g c c c t c a g g a g t a c t g g g t a g t g t c a t c c t g g g a a a g t g a g g g a a a t a t g g a c a t c a t g g a a c a a c a t c c a g g a g a c t c a g g c t c t a g g a g t a a c t g g t a g t g t g c T T G G T T A A T C T T C T A T T A C C T G C	TTTCTTTTGAAAACCTCTGTCa t g a c t t a g c t t t a c t t t g t c a g a c a t g c c a a a g t g c t g a g t c a c t a t a a a g a a a a a a g a a a g t a a a g g a a g a g t g g t c t g c t t a g c g c t a g c t c a a t g a c g a c t a g c t g c a c t t t t c c c c c a t g t t g t c t t g c a t g t a a a g g a g c t c a a t t g c a a t c t t a a a g g t t c c a a t c a g c c c c a c c g c t c t g c c c a c c c t c a c c c t c c a a a a g a t t a t c a a a t g t g g a t t t t c c a a t g a g t c t c a a t a t t a g a g t c t c a a c c c c c a a t a a t a t a g A C T G G A G A T G T C T G A G G C T C	AGTATGCCCCCTAAGAGCAGta a c a g t t c c t a g a a c t c t c t a a a t g c t t a g a a a a g a t t t a t t t t a a t t a c t c c c c a a t a a a t g a t g g c t g g c t t a t c t c a c a t a g a t a g c a t g t a a t t a a c t g a a a a a a a t a t a t g c c a t t a a a g a a a t c a t c c a t g a t c t t t a c a c c t g c c a c t c t a g t a c t a t c t g t c a c a t g g t a c t a g t a a a g t a t t a a a t t a a t t a t t t a a a g a t c a a a g a a a a c t t c t g t a c t c c g t a t t t g a a g g a a c a a a t G G A A G T G T G A T G A C T C A G G T T T G	chr2:113259329-113259715	chr2:113306692-113307042	chr2:113311189-113311494	chr2:113604552+113604945	chr7:22732997+22733343	chr4:74824628+74825025
	IL10:c.-627T>G	IL10:c.-854T>C	IL10:c.-1117A>G	IL12B:c.*159A>C	TNF:c.-488G>A	LTA:c.-10+90A>G						
5'-3' secuencia primer-F (m.t. C°)	CCTAGGTCACAGTGACGTGG (59.2)	ACACACAATCCAAGACAAC (53.2)	ACACACAATCCAAGACAAC (53.2)	GACACAACGGAATAGACC (50.8)	GCCTCAGGACTCAACACAGC (61.0)	TGCTTCGTGCTTTGGACTAC (59.1)						
5'-3' secuencia primer-R (m.t. C°)	GGTGAGCACTACCTGACTAGC (56.7)	TATATGCTAGTCAGGTAGTGC (49.9)	TATATGCTAGTCAGGTAGTGC (49.9)	ACATCTGGCAGACAAC (54.2)	TCTCGGTTTCTTCCATCG (60.3)	AGAGAGAGAGACAGTGAAGCGG (58.9)						
Tamaño del producto (bp)	412	381	381	250	350	377						
Secuencia del producto	CCTAGGTCACAGTGACGTGGc a a a t t g c c c a t t c a g a a t a c a t g g g a t t g a a a t a a t t g g g t c c c c c a a c c t g g a t g a a t a c c c a a g a c t t c t c t g t a a c t t a g c a g t c a c t t a g g t c t c g g g c t t a g t t c c c a a g t a a a a t g a g g g g t g g g c t a a a t c t c t a a a g t t c c c a a g c a g c c c t t c c a t t t a c t t t c a g a g a c t g g c t t c t a c a g t a c a g g c g g g t c a c a g a t g t t c c a g g c t c t t t a c c c c g a t t c a t t a g g t c t c a g g c a t g t t t c c a c c t t c a c t g t c c c c a c c c a a c t g t g c t t g g g g a a g t g g g t a a g a t a g t c g c a c t t g c t g a a a g c t t c t a t a G C T A G T C A G G T A G T G C T C A C C	ACACACAATCCAAGACAACa c t a c t a a g g c t t c t t g g a a g g g g a a g t a g g g a t a g t a a g a g g a a a g t a a g g g a c c t c t a t c c a g c t c c a t g g a a t c c t g a c t t c t t t c t t g t a t t t c a a c t t c t c c a c c c a t c t t t t a a a c t t a g a c t c a g c c a c a g a a g c t t a c a c t a a a g a a a c t c t a a g g c c a a t t a a t c a a g g t t t c a t t c a g t g t g g a g a t g g t g t a c a g t a g g g t g a g g a a c c c a a t t c t c a g t t g c a c t g g t g t a c c t t g t a c a g g t g a t g a a t a c t c t g t c c t c a g t t t g c t c a c t a a a a t a g a c g g t a g g g t c a t g g t g a G C A C T A C T G A C T A G C A T A T A	ACACACAATCCAAGACAACa c t a c t a a g g c t t c t t g g a a g g g g a a g t a g g g a t a g t a a g a g g a a a g t a a g g g a c c t c t a t c c a g c c t a g g a c t c t g a c t t t t c c t t g t t a t t c a a c t t c t c c a c c c c a t t t t a a a c t t a g a c t c c a g c c a c a g a a g c t t a c a c t a a a a g a a a c t c t a a g g c c a a t t t a a t c c a a g g t t t a t c t a t g t g t g g a g a t g g t g t a c a g t a g g g t a g g a a c c a a a t t c t c a g t t g c a c t g g t g t a c c t t g t a c a g t g a t g t a a t a c t c t g t c c t c a g t t g t c a c t a t a a a t a g a g a c g g t a g g g g t c a t g g t g a G C A C T A C T G A C T A G C A T A T A	GACACAACGGAATAGACCc a a a a g a t a a t t t c t a t c t g a t t t g t t t a a a c g t t t t t t a g g a t c a c a a t g a t a t c t t t g t g t a t t g t a t a g t c a a a t g c t c a t t g a a c a t c a g c t a t t t a t g t a t a g a t t t t c c a g c t c t c a a g t t g c a t g g g c t c a t g t c t a t t a a t a t t t a a g t a t t t a t g t a t t a t a g t a t a t c t g t a t t t a a c G T T T G T C T G C C A G G A T G T	GCCTCAGGACTCAACACAGCt t t t c c t c c a a c c c g t t t c t c t c c t c a a g g a c t c a g c t t t c t a g a c c c c t c c a g t t c t a g t t c a t c t t t t c c t g c a t c t g t c t g g a a g t t a g a g g a a a c a t g g g c c t g t g g g t t g t t t g t t t c t t c t g t c g a c c a g a c a g c t g g t c c c a a a g a a a t g g a g g c a a t a g g t t t g a g g g g a t g g g g a c g g g a c a c a t c t c t g t t t c g c a t g a t t c t c t g t t c g g g t t c t g a c t g a c t c t t g t c c c t t c t g t c g a t c t c t c t c g g g g t c g g g g g t g c t c t c c c c t t g a t g c t g t g t c c c a a c t t t c a a a t c c c g c c c c c g G A T G G A G A G A A A C C G A G A	GCCTCAGGACTCAACACAGCt t t t c c t c c a a c c c g t t t c t c t c c t c a a g g a c t c a g c t t t c t a g a c c c c t c c a g t t c t a g t t c a t c t t t t c c t g c a t c t g t c t g g a a g t t a g a g g a a a c a t g g g c c t g t g g g t t g t t t g t t t c t t c t g t c g a c c a g a c a g c t g g t c c c a a a g a a a t g g a g g c a a t a g g t t t g a g g g g a t g g g g a c g g g a c a c a t c t c t g t t t c g c a t g a t t c t c t g t t c c c t t c t g t c t c t g t c t c c t c t g t c a c c t t g t c a t g g c c c a g a g a c c c c c t g g a a t c g g g g t t c t g a c t g a c t c t t g t c c c t t c t g t c g a t c t c t c t c g g g g t c g g g g g t g c t c t c c c a g g g c g g a g g t c t g t c t c c g c c g t g c c c c g c c C G C T C A C T G T C T C T C T C T C T G A	chr1:205012795+205013206	chr1:205013181-205013561	chr1:205013181-205013561	chr5:158675377-158675626	chr6:31650826+31651175	chr6:31648095+31648471

bp: base pairs. m.t.: melting temperature.