



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Genotipificación de SNVs de la región promotora
de los genes IL-6, IL-1 β , TNF-a asociados a
respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea
Obstruktiva del Sueño y Enfermedad Periodontal**

Francisco Javier Sir Mendoza

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Genética
Bogotá, Colombia

2022

Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

Francisco Javier Sir Mendoza

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director (a):

Ph.D^(c) Mauricio Rey Buitrago

Codirector (a):

Ph.D Liliana Margarita Otero Mendoza

Ph.D Farith Damián González Martínez

Grupo de Investigación:

Genética clínica – Universidad Nacional de Colombia

Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) – Pontificia Universidad Javeriana

Grupo de Investigación en Salud Pública (GISPOUC) – Universidad de Cartagena

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Instituto de Genética

Bogotá, Colombia

2022

A mis padres, mi hermana, mi familia, amigos, profesores, especialmente al Dr. Mauricio, Dra. Liliana y Dr. Farith. A todos eternamente agradecido por su acompañamiento, apoyo y su confianza incondicional. A la vida por permitirme vivir este sueño que ya es una feliz realidad. ¡MIL GRACIAS!

Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes.

Isaac Newton

Declaración de obra original

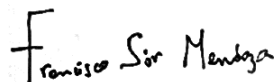
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Francisco Javier Sir Mendoza

Fecha 04/03/22

Resumen

Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

El objetivo del presente estudio fue determinar variantes de nucleótido único (SNVs) en la región promotora de los genes IL-1 β c.-511C>T, c.-31T>C; TNF- α c.-308 G>A; IL-6 c.-572G>C, c.-174C>G, y los niveles de proteínas de estas citoquinas proinflamatorias en saliva de individuos con apnea obstructiva del sueño (AOS) y periodontitis crónica (PC). Se realizó un estudio de casos y controles que comprendió un total de 129 individuos de Bogotá, Colombia. El grupo de casos fue subdividido en PC, AOS, PC más AOS. Para la genotipificación se realizó extracción de ADN y amplificación por PCR para llevar a cabo secuenciación Sanger. Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial con el programa R (v3.6.2). Los alelos IL-1 β presentaron asociación significativa (IL-1 β c.-511T $p=0.0007$ (OR 2.83 IC: 1.57-5.10), IL-1 β c.-31C $p=0.001$ (OR 2.81 IC: 1.51-5.20)) y en sus estados homocigotos (IL-1 β c.-511TT $p=0.002$ (OR 7.9 IC : 2.09-29.8), IL-1 β c.-31CC $p=0.0001$ (OR 7.2 IC: 1.8-27.9)). Estas estimaciones se obtuvieron al comparar individuos con AOS vs controles, y sujetos con PC más AOS vs controles, sugiriendo que individuos con estos SNVs poseen más de dos veces riesgo de desarrollar estos fenotipos inflamatorios, incluso aumenta a más de 7 veces siendo homocigotos. En ambos análisis, alélico y genotípico, el efecto de riesgo se mantuvo en pacientes diagnosticados concomitantemente con ambas enfermedades. Este efecto puede ser correlacionado con los niveles de proteínas, individuos IL-1 β c.-511TT con PC más AOS tuvieron mayores niveles de proteína IL-1 β en saliva que controles IL-1 β c.-511 CC ($p=0.011$), así mismo, controles IL-1 β c.-31TT vs PC más AOS IL-1 β c.-31 CT ($p=0.001$). Los alelos de IL-1 β analizados incrementan el riesgo de desarrollar AOS y/o AOS más PC simultáneamente, siendo mayor en genotipos homocigotos. Por otro lado, se ha identificado una nueva variante en IL-1 β con un efecto protector (IL-1 β c.4654A $p=0.028$ (OR 0.22 IC:0.06-0.7)).

Palabras clave: periodontitis, apnea obstructiva del sueño , SNV, citoquinas.

Abstract

Genotyping of SNVs of the promoter region of the genes IL-6, IL-1 β , TNF- α associated to inflammatory response in Obstructive Sleep Apnea and Periodontal Disease phenotypes

The aim of the present research was to determine single nucleotide variants (SNVs) in the promoter region of IL-1 β (c.-511C>T, c.-31T>C), TNF- α (c.-308G>A), IL-6 (c.-572G>C, c.-174C>G) gene, and the protein level of these proinflammatory cytokines in saliva of individuals with Obstructive Sleep Apnea (OSA) and Chronic periodontitis (CP). A case and control study that comprised a total 129 subjects from Bogotá, Colombia was conducted. The cases group was subdivided into a group with only CP, only with OSA, and presenting CP and OSA in concomitance. For genotyping, DNA extraction and PCR amplification were performed to carry out Sanger sequencing. Descriptive and inferential statistic was performed using R (v3.6.2). The IL-1 β alleles had significant association (IL-1 β c.-511T $p=0.0007$ (*OR* 2.83 *CI*: 1.57-5.10), IL-1 β c.-31C $p=0.001$ (*OR* 2.81 *CI*: 1.51-5.20)) as well as its homozygous states (IL-1 β c.-511TT $p=0.002$ (*OR* 7.9 *CI* : 2.09-29.8), IL-1 β c.-31CC $p=0.0001$ (*OR* 7.2 *CI*: 1.8-27.9)). These estimations were obtained when comparing individuals with OSA vs Controls and subjects with CP + OSA vs Controls, suggesting that individuals with the mentioned SNVs have two times more risk to develop these inflammatory phenotypes and the risk is even seven times more when having two copies of the allele. In both allelic and genotypes analyzes the risk effect of the SNVs was maintained in patients diagnosed with both diseases. In addition, this genotypic effect could be correlated to the protein level, homozygous individuals IL-1 β c.-511TT diagnosed simultaneously with OSA and CP had more IL-1 β protein level in saliva than controls IL-1 β c.-511CC ($p= 0.011$), as well as when comparing controls IL-1 β c.-31TT with OSA and CP IL-1 β c.-31 CT ($p= 0.001$). The alleles IL-1 β c.-511T and IL-1 β c.-31C increase the risk of develop OSA and/or OSA with CP concomitantly, even more in a homozygous state. Otherwise, a novel variant in IL-1 β has been identified with a protective effect (IL-1 β c.4654A $p=0.028$ (*OR* 0.22 *IC*:0.06-0.7)).

Keywords: periodontitis, obstructive sleep apnea, SNV, cytokines.

Contenido

	Pág.
Resumen	VIII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas.....	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción.....	1
1. Marco Teórico	5
1.1 Citoquinas	5
1.2 IL-1 β	6
1.3 IL-6.....	11
1.4 TNF- α	16
1.5 Enfermedad Periodontal	19
1.5.1 Epidemiología de la Enfermedad Periodontal	20
1.6 Apnea Obstructiva del Sueño.....	21
1.6.1 Epidemiología de Apnea Obstructiva del Sueño.....	22
1.7 Implicaciones de los genes IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la etiopatogenia de la Enfermedad Periodontal y Apnea Obstructiva del Sueño.....	22
1.8 ¿Existe asociación entre los fenotipos de Enfermedad Periodontal y Apnea Obstructiva del Sueño? ¿Es bidireccional esta asociación?.....	24
2. Objetivos	27
2.1 Objetivo general	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. Metodología	28
3.1 Diseño del estudio	28
3.2 Muestreo	28
3.3 Criterios de selección	28
3.3.1 Criterios de inclusión	28
3.3.2 Criterios de exclusión.....	29
3.4 Extracción de ADN y genotipificación.....	29
3.4.1 Condiciones de PCR.....	31
3.5 Cuantificación de proteínas IL-6, IL-1 β , TNF- α en saliva	31
3.6 Análisis estadístico	32
3.7 Consideraciones éticas.....	33
3.8 Consideraciones de bioseguridad y riesgo ambiental.....	34

XII Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α y sus niveles proteicos asociados a respuesta inflamatoria en Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

3.9	Propiedad intelectual	34
4.	Resultados.....	35
4.1	Datos descriptivos de la muestra de estudio.....	35
4.2	Frecuencias alélicas y genotípicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α	36
4.3	Niveles de proteínas IL-1 β , IL-6 y TNF- α según genotipo y fenotipo.....	42
4.4	Frecuencias alélicas y genotípicas en IL-1 β c.G4654A	47
4.5	Niveles de proteínas IL-1 β c.G4654A según genotipo y fenotipo	52
5.	Discusión.....	55
6.	Conclusión.....	64
7.	Recomendaciones.....	64
	Bibliografía	69

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Distintos mecanismos regulan la transcripción del gen IL-1 β en células linfoides T CD4 y monocitos. Tomado de Pulugulla SH y Cols, Cytokine. 2018 Nov 1;111:373-81.....	7
Figura 2. Estructura de la vía de señalización iniciada por la interleuquina 1 (IL-1) revela mecanismos de variantes oncogénicas y SNVs en la inflamación y el cáncer. Tomado de Ozbabacan SE y Cols, PLoS computational biology. 2014 Feb;10(2)	9
Figura 3. Estructura de la vía de señalización iniciada por la interleuquina 1 (IL-1) revela mecanismos de variantes oncogénicas y SNVs en la inflamación y el cáncer. Tomado de Ozbabacan SE y Cols , PLoS computational biology. 2014 Feb;10(2)	11
Figura 4. IL-6 en inflamación, inmunidad, y enfermedad. Tomado de Tanaka T y Cols, Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2014 Oct 1;6(10):a016295.	13
Figura 5. Vía de señalización de Interleuquina 6 y su rol en la enfermedad renal: una actualización. Tomado de Su H y Cols, Frontiers in immunology. 2017 Apr 21;8:405	14
Figura 6. Tomado de Jak/Stat: IL-6 Receptor Signaling. Cell Signaling Technology, 2020.	15
Figura 7. Fitoquímicos como una Fuente potencial para inhibidores TNF- α . Tomado de Iqbal M y Cols, Phytochemistry reviews. 2013 Mar 1;12(1):65-93	17
Figura 8. Biología de TNF, mecanismos patogénicos y estrategias terapéuticas emergentes. Tomado de Kalliolias GD y Ivashkiv LB, Nature Reviews Rheumatology. 2016 Jan;12(1):49.....	18
Figura 9. Niveles de TNF- α según genotipo en individuos casos	43
Figura 10. Niveles de IL-1 β según genotipo en individuos casos	43
Figura 11. Niveles de IL-6 según genotipo en individuos casos.....	44
Figura 12. Niveles de TNF- α según genotipo y fenotipo en individuos casos.....	45
Figura 13. Niveles de IL-1 β c.-511 según genotipo y fenotipo en individuos casos.....	46
Figura 14. Niveles de IL-1 β c.-31 según genotipo y fenotipo en individuos casos.....	47
Figura 15. Niveles de IL-1 β c.G4654A según genotipo en individuos casos.....	52
Figura 16. Niveles de IL-1 β c.G4654A según genotipo y fenotipo en individuos casos.	53

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Características sociodemográficas de los sujetos de estudio.....	35
Tabla 2. Distribución de diagnósticos entre individuos casos	36
Tabla 3. Frecuencias alélicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α	37
Tabla 4. Frecuencias alélicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α según discriminación de casos.....	38
Tabla 5. Comparación Intergrupo de frecuencias alélicas IL-1 β c.-511C>T según discriminación de casos	39
Tabla 6. Comparación Intergrupo de frecuencias alélicas IL-1 β c.-31T>C según discriminación de casos.....	39
Tabla 7. Frecuencias genotípicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α	40
Tabla 8. Frecuencias genotípicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α según discriminación de casos	41
Tabla 9. Comparación Intergrupo de frecuencias genotípicas IL-1 β c.-511 C>T según discriminación de casos	42
Tabla 10. Comparación Intergrupo de frecuencias genotípicas IL-1 β c.-31T>C según discriminación de casos.....	42
Tabla 11. Frecuencias alélicas en IL-1 β c.G4654A	48
Tabla 12. Frecuencias alélicas en IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos	49
Tabla 13. Comparación Intergrupo de frecuencias alélicas IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos.....	49
Tabla 14. Frecuencias genotípicas en IL-1 β c.G4654A	50
Tabla 15. Frecuencias genotípicas en IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos ..	51
Tabla 16. Comparación Intergrupo de frecuencias genotípicas IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos	51

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
AOS	Apnea Obstructiva del Sueño
PC	Periodontitis Crónica
SNV	Variante de nucleótido único (por sus siglas en inglés)
*	p-valor <0.05 (estadísticamente significativo)
**	p-valor ≤0.01 (estadísticamente significativo con corrección de significancia)
+	Test chi-cuadrado X^2 con corrección de continuidad de Yates
°	Test exacto de Fisher
¥	Test U de Mann-Whitney con corrección de continuidad

Introducción

La enfermedad periodontal es una entidad inflamatoria crónica que se caracteriza por la pérdida del ligamento periodontal y destrucción del hueso alveolar circundante a los dientes (1). Por ello, es una de las principales causas de pérdida de órganos dentales y considerada según el estudio Global Burden of Disease 2016 la undécima enfermedad más prevalente a nivel global (2). La enfermedad periodontal es prevalente en países desarrollados y en vía de desarrollo y afecta aproximadamente entre 20 -50% de la población global (3). En la actualidad se ha estimado una prevalencia global de 10 – 15% de manifestaciones severas de periodontitis (4), y a nivel local, el último Estudio Nacional de Salud Bucal -ENSAB IV reportó que el 61.8% de la población colombiana se encontraba afectada por esta enfermedad inflamatoria (5).

A pesar de que se han implementado políticas en salud pública de promoción y prevención enfocadas a disminuir la incidencia y prevalencia de la enfermedad periodontal, la alta frecuencia de esta entidad aún se mantiene, lo cual podría indicar que la atención primaria en salud bucal y la terapéutica no están siendo totalmente efectivas o que puedan existir otras condiciones sistémicas que condicionen o aumenten el riesgo de desarrollo de esta enfermedad, entre ellas la apnea obstructiva del sueño (AOS) (6). Sin embargo, en la actualidad aún no se ha confirmado esta posible relación de riesgo.

La apnea obstructiva del sueño es un trastorno respiratorio crónico multifactorial, que consiste en un cese temporal de la respiración por ≥ 10 segundos, disminuyendo el flujo aéreo en al menos un 50%, lo cual conlleva a una reducción en la saturación de oxígeno sanguíneo del 3% a 4% o mayor (7). Estos signos clínicos usualmente están asociados a la obstrucción parcial en la vía aérea superior (8), lo cual afecta los episodios de sueño en estos individuos. La privación del sueño tiene un profundo efecto en muchos aspectos fisiológicos como la alerta, procesamiento de la memoria, reparación de daños celulares,

desarrollo cerebral, cognición, estado de ánimo, regulación hormonal, riesgo de depresión, elevación del cortisol, alteración en el metabolismo de la glucosa, función inmune, aumento en la inflamación sistémica y por ende de marcadores proinflamatorios (9–11). Las Complicaciones neuropsiquiátricas de AOS incluyen disfunción cognitiva, depresión y Alzheimer (12). Actualmente, el tratamiento para AOS está confinado en el alivio de la obstrucción mecánica pasando por desapercibidos aspectos funcionales de la enfermedad que pueden ser claves para futuros dianas terapéuticos (13).

Latorre C. y Cols (2018), recientemente ha reportado la asociación entre enfermedad periodontal y apnea obstructiva del sueño. Ambas condiciones han sido asociadas con el desarrollo de enfermedades sistémicas como diabetes, alteraciones metabólicas, cardiovasculares y cognitivas (14–16). Gunaratnam y Cols (2009) reportaron una mayor prevalencia de periodontitis entre pacientes con AOS (6). Seo WH y Cols (2013) sugirieron que la apnea obstructiva del sueño podría ser un factor de riesgo para la enfermedad periodontal (17). La asociación entre estas condiciones podría tener repercusiones en la práctica odontológica y médica. Esto no solo propiciaría una atención bucal más integral, sino que también fomentaría un enfoque multi e interdisciplinario entre ambas enfermedades (7).

A pesar de que ha sido sugerida una posible asociación entre ambas enfermedades, las bases moleculares que ayudarían a explicar la patogénesis de esta asociación no han sido completamente dilucidadas, y en menor grado, las implicaciones genéticas subyacentes que podrían contribuir al entendimiento de su fisiopatología. Estudios previos han revelado la relación entre variantes localizadas en la región promotora de genes de citoquinas proinflamatorias y AOS (18). Se ha reportado que variantes en el gen IL-6 en la posición -572 G/C (rs1800796) han sido asociadas con apnea obstructiva del sueño y su severidad (19). Zhang Z y Cols (2019) evidenciaron un incremento en la susceptibilidad de presentar AOS en población china en presencia del SNV -308G/A (rs1800629) (19). Así mismo, en relación con la aparición y/o desarrollo de enfermedad periodontal se han asociado variantes en IL-1 β en las posiciones c.+3954/3953 C/T (rs1143634), c.-511 C/T (rs16944) y c.-31 T/C (rs1143627) (20); El SNV IL-6 c.-572 G/C ha sido sugerido como un alelo de riesgo debido que podría aumentar la susceptibilidad de desarrollo o progresión de esta

entidad (21). Desde hace más de dos décadas se ha sugerido una posible relación con gran énfasis en la región promotora -308 del gen TNF- α y la periodontitis crónica, no solo en su desarrollo sino en la progresión de su severidad (22). Una mayor comprensión de estas bases genéticas en la fisiopatología subyacente a la posible asociación entre enfermedad periodontal y apnea obstructiva del sueño podría generar nuevas estrategias terapéuticas en el futuro, dado que se ha demostrado que el tratamiento de la periodontitis incide positivamente en los niveles de inflamación sistémica, podría ser una de las nuevas formas futuras de mejorar la apnea obstructiva del sueño (23). De igual forma, el tratamiento de AOS podría prevenir la progresión de enfermedad periodontal (17).

Debido a que la mayoría de los estudios enfocados en esta temática se han realizado en población caucásica y una menor proporción en población asiática, y dado que las frecuencias alélicas de SNVs, así como también las interacciones génicas pueden variar entre poblaciones, es de gran importancia realizar un estudio genético en población latinoamericana (24–26). Así mismo, existe una alta prevalencia de periodontitis crónica en individuos con AOS (60.1%) en la ciudad de Bogotá, Colombia, siendo más prevalente la periodontitis crónica severa en un 74% (27). Por esta razón, el objetivo de la presente investigación fue determinar variantes en la región promotora de los genes IL-6 (c.-572C, c.-174C), IL-1 β (c.-511T, c.-31C) y TNF- α (c.-308A) y los niveles de estas citoquinas proinflamatorias en saliva en los fenotipos de AOS y PC.

Este estudio se enfocó en evaluar el rol genético, en la etiología de PC y AOS de forma simultánea y en nuestro conocimiento, es el primero, específicamente en determinar la presencia de ciertas variantes en la región promotora de genes de citoquinas proinflamatorias en esta etiología.

1. Marco Teórico

1.1 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas pequeñas, no estructurales con peso molecular que varía entre 8 a 40.000 Da. Originalmente fueron llamadas linfoquinas, monoquinas, quemoquinas e interleuquinas para indicar la fuente celular de donde provenían, sin embargo, este término fue cambiado por “citoquinas” que describe la capacidad de cualquier célula nucleada de sintetizar estas proteínas y responder ante ellas(28), siendo los derivados de la línea linfóide y mielóide los productores predominantes. Según su lugar de acción, las citoquinas pueden ejercer un efecto sobre la célula que las secreta (autócrina), en células cercanas (paracrina), o en algunos casos en células distantes (endocrina). Es común que distintos tipos celulares puedan sintetizar la misma citoquina o que una única citoquina tenga una acción pleiotrópica. Estas moléculas son producidas en cascada, estimulando su célula objetivo para producir citoquinas adicionales, las cuales pueden entre sí tener una acción sinérgica o antagonista (29). Las citoquinas que promueven la inflamación son llamadas “citoquinas proinflamatorias” y aquellas que suprimen este proceso son denominadas “citoquinas anti-inflamatorias”.

Las citoquinas son principalmente sintetizadas y liberadas por células de la primera línea de defensa inmune, las cuales expresan una serie de receptores conocidos como *Toll-like receptors (TLRs)* capaces de unirse a secuencias altamente conservadas expresadas por microorganismos (30), tales como lipopolisacáridos (LPS) que se encuentran en la membrana de bacterias gram negativas, peptidoglicanos (PGN), RNA de doble cadena e islas CpG de DNA bacteriano(31). Esta unión receptor-ligando conlleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-18, a través de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPK* por sus siglas en inglés) junto con el factor de transcripción nuclear Kb (*NF-Kb* por sus siglas en inglés)(32).

1.2 IL-1 β

La familia de citoquinas IL-1 está conformada por 11 miembros y la familia de receptores IL-1 por 10 miembros. Se ha reportado que esta familia de IL-1 es la más asociada a inflamación que otra familia de citoquinas. Las citoquinas IL-1 están principalmente asociadas a la inmunidad innata, así mismo pueden estar asociadas a la inmunidad adquirida. La principal característica de la inmunidad innata es la falta de especificidad. La importancia de los miembros de la familia de IL-1 a la respuesta innata radica en la homología del dominio citoplasmático TIR (*Toll interleukin-1 receptor*) con este mismo dominio en los receptores tipo *Toll-like* (33), conllevando a respuestas inflamatorias convergentes como la inducción de ciclooxigenasa 2 (COX2), producción de múltiples citoquinas y quimiocinas, incremento en la expresión de moléculas de adhesión y síntesis de óxido nítrico.

IL-1 β es el miembro más estudiado de esta familia de citoquinas debido a su rol en la mediación de enfermedades auto-inflamatorias(34). Esta interleuquina se expresa elevadamente en células derivadas de la línea mieloide, de igual forma en otros tipos de células pueden que sintetizarla en niveles menores, tales como fibroblastos, células *natural-killer*, células epiteliales y endoteliales(35).

El gen de IL-1 β localizado en el clúster de genes de IL-1 en el cromosoma humano 2, codifica para una proteína precursora de interleuquina 1 β denominada ProIL-1 β con un tamaño de 31 kDa. ProIL-1 β es principalmente producida por monocitos y macrófagos activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se unen a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) y por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)(36). ProIL-1 β es sintetizada como una proteína precursora con baja actividad biológica, la cual es procesada intracelularmente para convertirse en IL-1 β

madura (17 kDa) por la acción de caspasa 1 del inflamosoma o extracelularmente por otras proteasas (36).

Spi1 (Spi1/PU.1) es un factor de transcripción presente en la línea celular de monocitos/macrófagos, el cual se une constitutivamente al promotor de IL-1 β localizado en dos sitios, entre -50 a -39 y -115 a -97(37). En células no mieloides los factores de transcripción implicados en la expresión génica son NF- κ B y C/EBP β (38). Estos factores permiten el reclutamiento de otras proteínas de unión a cajas TATA (*TBP- TATA Binding Protein* por sus siglas en inglés) para permitir la formación del complejo de pre-iniciación (PIC) de la transcripción(39). Adicionalmente, algunos estudios se han enfocado en investigar la regulación de este gen en la línea celular linfoide, específicamente los linfocitos T CD4+. Sin embargo, se ha reportado que la regulación para el proceso transcripcional del gen IL-1 β en células T CD4+ es independiente de Spi1 interviniendo un nucleosoma bivalente H3K4me3+/H3K27me3+ en el promotor del gen en mención(40) (ver figura 1).

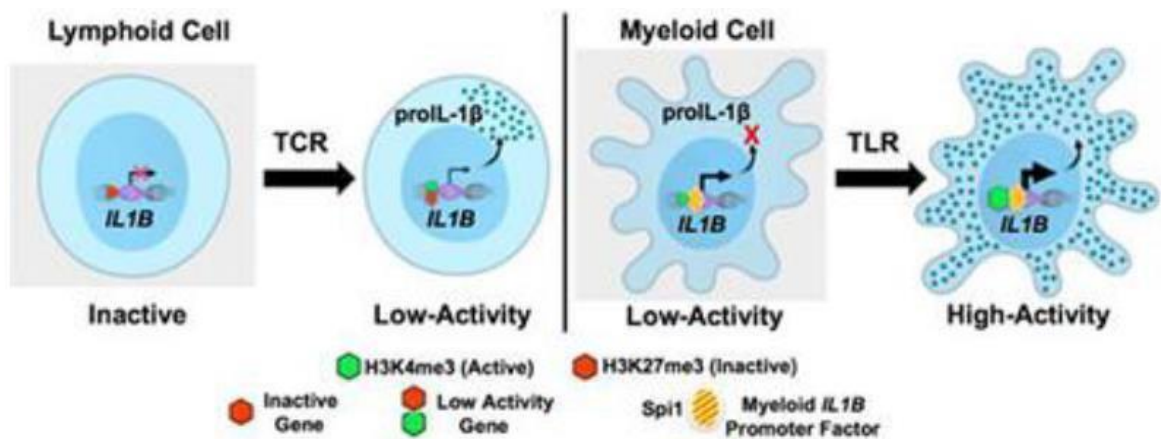


Figura 1. Distintos mecanismos regulan la transcripción del gen IL-1 β en células linfoides T CD4 y monocitos. Tomado de Pulugulla SH y Cols, Cytokine. 2018 Nov 1;111:373-81.

La señalización iniciada por el incremento de IL-1 incrementa la expresión de factores de adhesión en células endoteliales, lo cual resulta en la migración de células inmunes hacia el sitio de infección(41). IL-1 α e IL-1 β puede inducir a la expresión de cientos de genes, incluidos ellos mismos (*feedback* positivo) que amplifica la respuesta de IL1 en una manera autocrina o paracrina y sus acciones reguladoras se llevan a cabo a través de vías de

8 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

señalización conservadas(42–44). La propagación de la señal depende de proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPKs*), conllevando a la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de las proteínas de defensa del huésped. La señal inicia al unirse los ligandos IL-1 α o IL-1 β al receptor tipo 1 (IL-1R1) y la señal se propaga con la ayuda del co-receptor denominado proteína accesoria del receptor IL-1 (IL-1RAP) formando un complejo trimérico (45) (ver figura 2). En este complejo, los dominios TIR (*Toll-and IL1R-Like*) en la regiones citoplasmáticas del receptor IL-1R1 y co-receptor IL-1RAP, se acercan resultando en el rápido ensamblaje de proteínas de señalización intracelular, MYD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response gene 88*), TOLLIP (*Toll-interacting protein*)(41) e IRAK4 (*IL-1 Receptor-Associated Kinase 4*)(46,47). La unión de MYD88 conlleva a la fosforilación de quinasas asociadas al receptor de IL-1, IRAK4, IRAK2 y IRAK1, lo cual permite el reclutamiento y oligomerización de TRAF6 (*Tumor Necrosis Factor-Associated Factor 6*) (48,49).

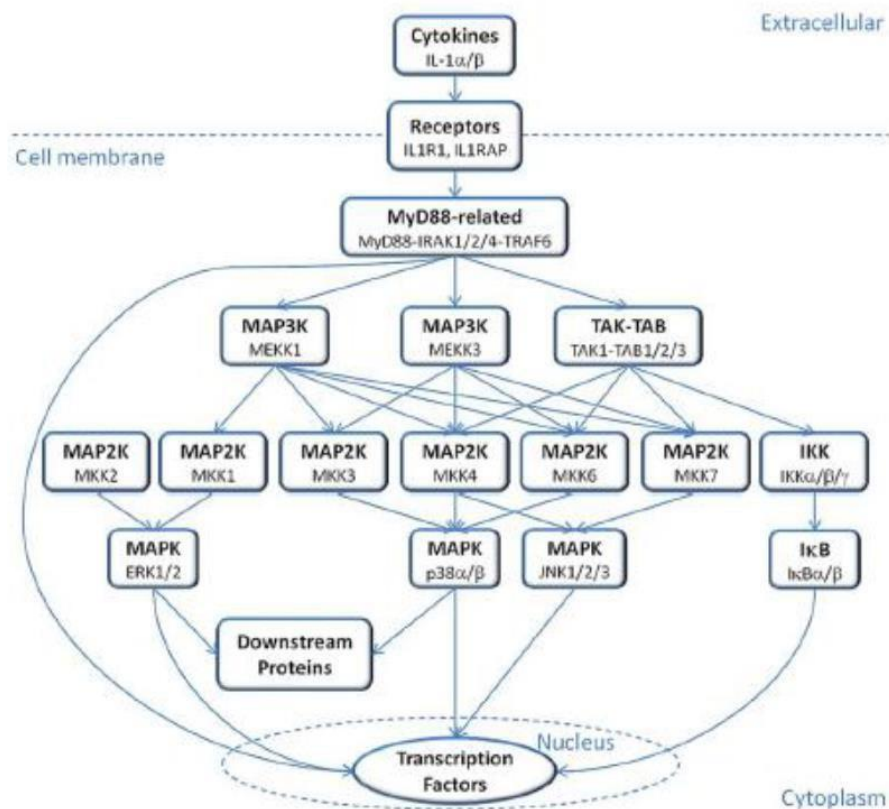


Figura 2. Estructura de la vía de señalización iniciada por la interleuquina 1 (IL-1) revela mecanismos de variantes oncogénicas y SNVs en la inflamación y el cáncer. Tomado de Ozbabacan SE y Cols, PLoS computational biology. 2014 Feb;10(2).

TRAF6, IRAK1 y IRAK2 fosforilados, se disocian y migran a la membrana para asociarse con TAK1 (*TGF-β Activated Kinase 1*) y proteínas de unión a TAK1, tales como TAB1 y TAB2(43). El complejo TAK1-TAB1-TAB2-TRAF6 migra devuelta al citosol, donde TRAF6 es ubiquitinado y TAK1 es fosforilado. Desde este punto, la señal se puede propagar mediante dos vías principales: IKK-I- κ B-NF- κ B y/o MKK-MAPK/JNK/ERK (ver figura 3). En la primera vía, TAK1 fosforilado activa el inhibidor de la subunidad beta del factor nuclear kappa-B y IKK activado fosforila el inhibidor del factor nuclear kappa-B (I κ B) que se degrada, de modo que el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) es liberado y migra al núcleo(41). TAK1 también puede activar quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38, JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) y ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) al interactuar con proteínas MAP quinasa quinasa - MKK (*MAP kinase kinase*). Corriente abajo de esta vía se encuentran factores de transcripción como c-Jun, c-Fos, c-Myc y ATF2.

10 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

En la segunda vía, la señalización de las MAP quinasas (*MAPK*), son conservadas entre los eucariotas, media eventos celulares desencadenados por señales extracelulares como la unión de citoquinas(50), lo cual es esencial para la señalización de IL-1. Esta vía se basa en una triple cascada de quinasas: MAP quinasa quinasa quinasa MKKK/MEKK (MAP Kinase Kinase Kinase), MAP quinasa quinasa (MKK/MEK) y MAP quinasa (MAPK), estas quinasas secuencialmente se fosforilan y se activan unas con otras (50). Las quinasas JNK y MAP p38 poseen roles en la supresión tumoral y pueden ser fosforiladas y activadas por MKK4, el cual, también es supresor tumoral(51,52). MEKK interactúa con MKK inactivo y lo fosforila; el complejo se disocia, liberando el MKK activo y libre, el cual interactúa con JNK inactivo para activarlo(50). La activación de JNK conlleva a la disrupción de la interacción MKK-JNK, liberando el JNK activo para fosforilar dianas corriente abajo, tales como p53, Bax, Bim/Bmf (promotoras de apoptosis), Bcl2, Bcl-XL, 14-3-3, Mcl-1 (proteínas inhibitorias de apoptosis), TGF- β 1 (relacionado al desarrollo tumoral), CDC25, CiclinaD1/CDK4 (proteínas del ciclo celular relacionadas al crecimiento tumoral)(51).

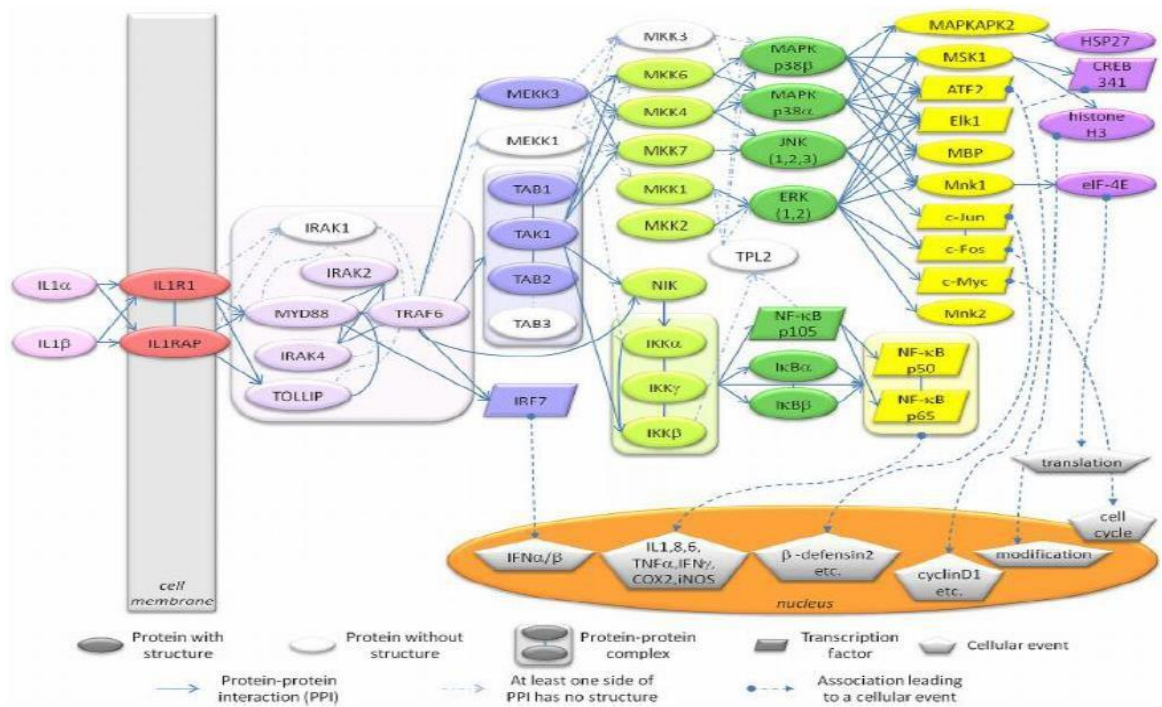


Figura 3. Estructura de la vía de señalización iniciada por la interleuquina 1 (IL-1) revela mecanismos de variantes oncogénicas y SNVs en la inflamación y el cáncer. Tomado de Ozbabacan SE y Cols , PLoS computational biology. 2014 Feb;10(2).

1.3 IL-6

La interleuquina 6 (IL-6) es un mediador de la respuesta inmune, hematopoyesis e inflamación, implicado en la activación de genes relacionados a procesos de diferenciación, supervivencia celular, apoptosis y proliferación. A esta proteína se le han asignado múltiples nombres con base en su función biológica, tales como Factor Activador de Célula B (*BSF-2* por sus siglas en inglés) relacionado con la diferenciación de células B activadas en anticuerpos, Factor Estimulador de Hepatocitos debido a su efecto en la síntesis de proteínas en hepatocitos, entre otras denominaciones. El gen IL-6 se localiza en el cromosoma 7p21 y codifica para una proteína IL-6 humana la cual está conformada por 212 aminoácidos y un tamaño de 21 -26 kDa(53). La síntesis de interleuquina 6 es desencadenada por lesiones infecciosas debido que estos patógenos presentan los denominados PAMPs o patrones moleculares asociados a patógenos reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) presentes en los monocitos y macrófagos(54). Las injurias celulares debido a daño tisular son capaces de mediar la

12 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

producción de interleuquina 6 al liberar las moléculas conocidas como *DAMPs* o patrones moleculares asociados a daño. Los PRR comprenden los *Toll-Like Receptors* (TLR), receptores parecidos a RGI-1 (RLR), receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) y receptores de DNA. Estos estimulan la liberación del factor de transcripción NF- κ B potenciando la transcripción del mRNA de los genes de IL-6, IL-1 β y TNF- α . Es importante destacar que IL-1 β y TNF- α también estimulan factores de transcripción para IL-6. Las *DAMPs*, contienen varios tipos de moléculas, tales como DNA mitocondrial, proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) y proteínas S100. Estas proteínas al igual que los *PAMPs* son capaces de activar *NF- κ B* a través de la unión a los *TLR*. El DNA mitocondrial estimula *TLR9*(55), *HMGB1* a *TLR2*, *TLR4* y el receptor para compuestos de glicosilación avanzada (*RAGE*)(56). Se ha evidenciado que en la región promotora 5' flanqueante del gen IL-6 se encuentran elementos reguladores en cis que actúan como sitios de unión para NF- κ B, proteína de especificidad 1 (SP1), factor nuclear de IL-6 (*NF-IL6*, también conocido como *CAAT*), proteína activadora 1 (*AP-1*) y factor 1 regulador del interferón (*IRF1*), la activación de estos elementos reguladores conlleva a la estimulación transcripcional del promotor IL-6(57,58). En relación con la regulación transcripcional y postranscripcional de IL-6 varias proteínas y microRNA están asociados (ver figura 4). En células diana, IL-6 primero se une a la cadena α del receptor de IL6 (IL-6R), también llamado mbIL-6R, CD126, gp80. Posteriormente, este complejo se une a dos moléculas de gp130 e inicia la transducción de la señal. JAK/STAT3 y SHP2/Gab/MAPK son las principales vías relacionadas a la señalización iniciada por gp130, la cual es activada vía el motivo YxxQ y Y759 de gp130(59–61). Es importante destacar que solo ciertos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, células T CD4+, hepatocitos y podocitos, expresan IL-6R en su superficie celular, y, por lo tanto, pueden responder directamente a IL-6(62,63). Receptores solubles han sido identificados para muchas citoquinas y pueden actuar como agonistas o antagonistas de señalización de citoquinas y eventos inflamatorios (64). La forma soluble del receptor IL-6R es denominada sIL-6R (65).

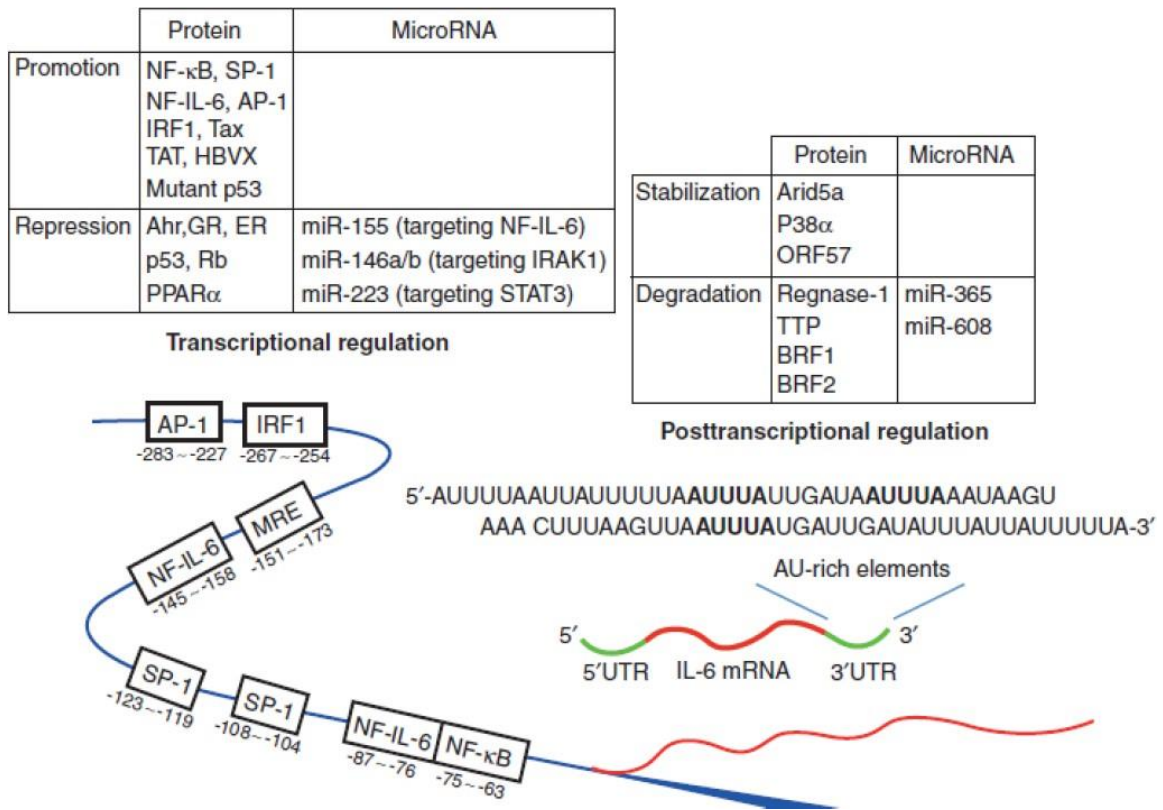


Figura 4. IL-6 en inflamación, inmunidad, y enfermedad. Tomado de Tanaka T y Cols, Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2014 Oct 1;6(10):a016295.

La unión de la forma soluble a IL-6 presenta una afinidad similar a la unión de IL-6 con mbIL-6R(66), en consecuencia, el complejo IL-6/sIL-6R puede activar gp130, una proteína de membrana que es expresada de forma ubicua(67). La activación de gp130 a través del complejo IL-6/sIL-6R es llamado vía de señalización trans, mientras que la activación de gp130 por IL6/ mbIL-6R es denominada vía de señalización clásica(68) (ver figura 5). La vía trans representa una alternativa a la vía clásica y permite IL-6 modular un amplio espectro de células diana(69). Se conocen dos mecanismos distintos de generación de sIL-6R. El primero implica un clivaje proteolítico de mbIL-6R basado en una actividad metaloproteasa, y el segundo, es debido a la traducción de mRNA IL-6 que sufrió un splicing diferencial que tiene por consecuencia la ausencia de dominios transmembranales y citosólicos(70,71). Se cree, que el primer mecanismo es quien se encuentra principalmente implicado en la generación de sIL-6R(72). El proceso de clivaje de IL-6R es realizado por metaloproteasas de la familia ADAM(73), entre los cuales ADAM10 y

14 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

ADAM17 son las enzimas principalmente implicadas(64). ADAM17 está implicada con una rápida escisión de IL-6R. Muchos factores pueden activar ADAM17, tales como las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , toxinas bacterianas, depleción del colesterol celular, agonista PKC, daño celular, entre otros(74,75). A menudo, se cree que la vía clásica está implicada en la actividad anti-inflamatoria de IL-6, mientras que la vía trans es proinflamatoria(76).

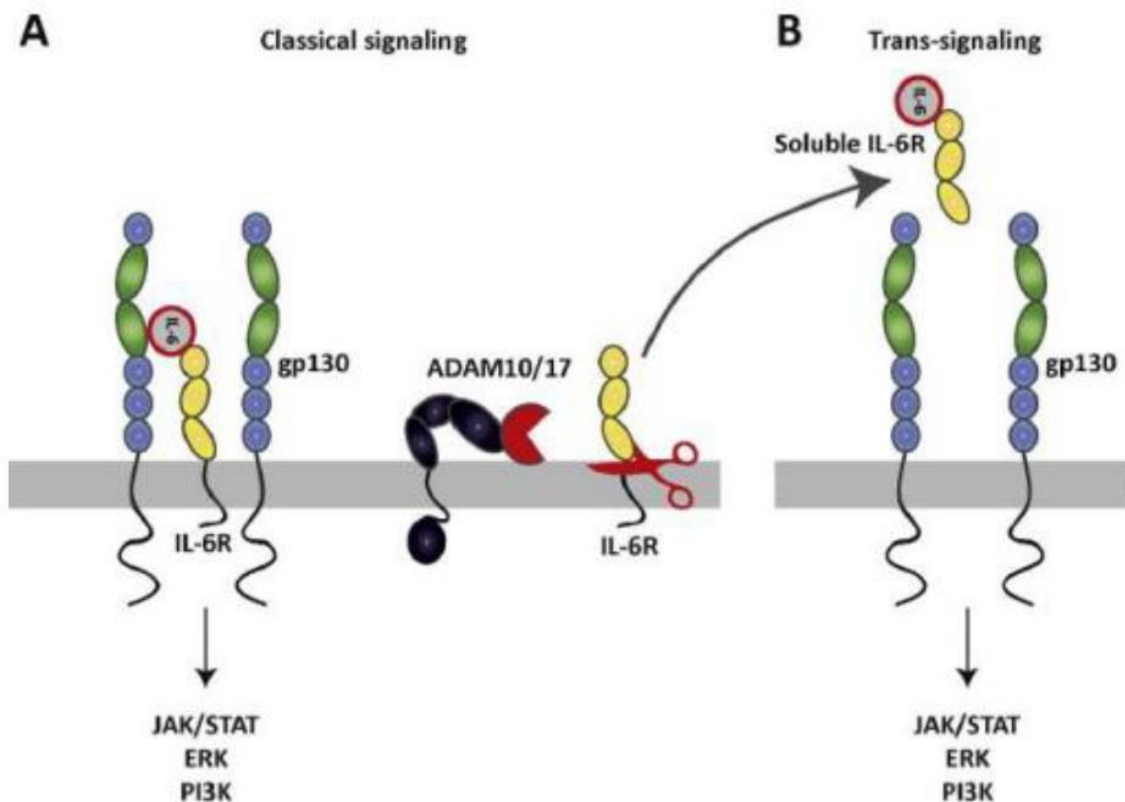


Figura 5. Vía de señalización de Interlequina 6 y su rol en la enfermedad renal: una actualización. Tomado de Su H y Cols, *Frontiers in immunology*. 2017 Apr 21;8:405.

Las quinasas Jak1, Jak2, Tyk2 se asocian a gp130 y se activan a través de su estimulación a priori. La unión de citoquinas induce la dimerización del receptor activando los Jaks asociados, los cuales se fosforilan ellos mismos y el receptor. Los sitios fosforilados del receptor y Jaks sirven como sitios de unión para Stats que contienen dominios SH2, tales como Stat3, y para proteínas y adaptadores que contengan este mismo SH2 que unen el receptor a otras vías como MAPK, PI3K/Akt, entre otras. La tirosina fosfatasa SPH2 se une a gp130 fosforilado, posiblemente formando un enlace a la vía MAPK, que también se

activa con la estimulación de citocinas IL-6. Stats fosforilados se translocan dentro del núcleo para regular la transcripción génica (77–79) (ver figura 6).

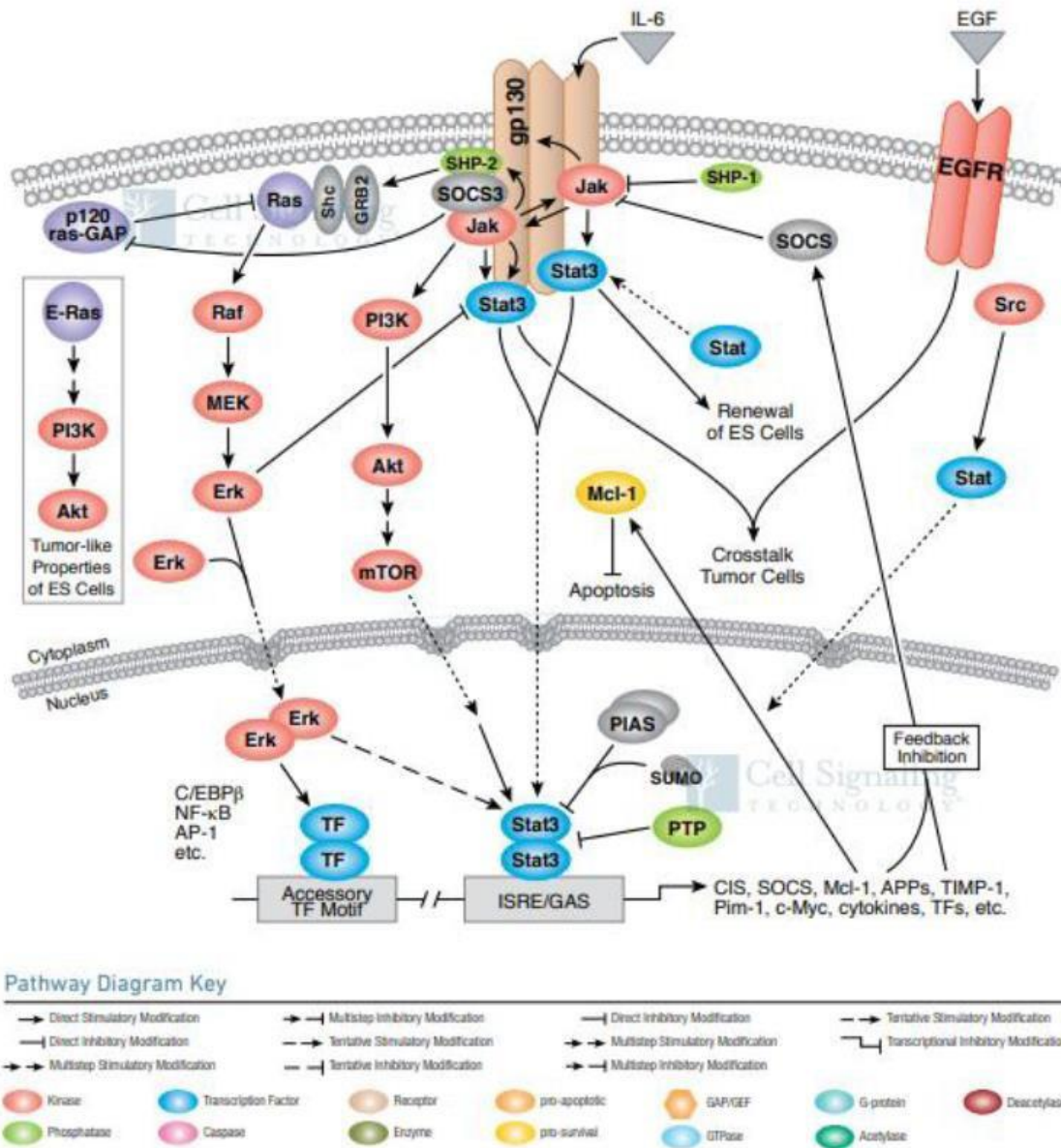


Figura 6. Tomado de Jak/Stat: IL-6 Receptor Signaling. Cell Signaling Technology, 2020.

1.4 TNF- α

El gen TNF- α está presente como una única copia del gen en el cromosoma humano 6p21. Este gen está conformado por cuatro exones y tres intrones. La citoquina TNF- α es pleiotrópica y es expresada en distintos tipos de células, sin embargo, sus principales sintetizadores hacen parte de la línea monocítica, tales como macrófagos, astrogía, microglía, células de Langerhans y células de Kupffer(80). La expresión transcripcional de este gen es regulada por varios factores, incluyendo NF- κ B y el factor nuclear de células T activadas (NF-AT). La producción de TNF- α es también regulada a nivel traduccional por secuencias ricas en uracilo-adenina (UA) en la región flanqueante 3'UTR en el mRNA (81). La proteína humana TNF- α tiene una masa molecular de 27 KDa y conformada por 233 aminoácidos, la cual es posteriormente clivada a 17 KDa (157 aminoácidos). Los 76 aminoácidos presentes en la presecuencia de la proteína de 27 KDa son altamente conservados y parecen servir en el anclaje a la membrana celular, subsiguiente a ello es clivada por una enzima proteolítica TACE resultando en un TNF- α soluble (82). El TNF- α actúa a través de dos receptores transmembranales, TNFR1 también conocido como p55 o p60 expresado en la mayoría de los tejidos mamíferos y TNFR2 conocido como p75 o p80 expresado en células del sistema inmune. La unión al TNFR2 presenta una disociación ligando-receptor rápida, por lo que la concentración local de TNF- α en la superficie celular es elevada(83). La activación de TNFR1 por el ligando TNF- α está asociada a distintas respuestas inflamatorias. TNF- α se une al dominio extracelular o soluble de TNFR1 conllevando a la liberación de una proteína inhibidora intracelular denominada dominio de muerte (DD o SODD por sus siglas en inglés). Al dominio intracelular de TNFR1 se une una proteína llamada dominio de muerte asociado al receptor de TNFR1 (*TRADD* por sus siglas en inglés)(84), la cual recluta otras proteínas: *Receptor interacting protein-1 (RIP-1)* (85), *TNFR-associated factor 2 (TRAF2)* (86). Este complejo es liberado del TNFR1, la proteína RIP-1 recluta MEKK-3 y TGF β , subsecuentemente activando el complejo IKK (*inhibitor of κ B kinase*). Este complejo fosforila I κ B α y otras proteínas IKK β , lo cual conlleva a la ubiquitinación y degradación de I κ B α , permitiendo la liberación de NF κ B. El NF κ B circulante en el citoplasma se transloca al núcleo y estimula la transcripción génica (87,88) (ver figura 7). Es importante destacar que existen varios mediadores de señalización mediados por el TNF- α para la activación de NF κ B dependiendo del tipo celular.

Estimulación de TNFR2 activa la proteína MAP3K a través de TRAF2 en el complejo TRADD-RIP-TRAF2, activando MAP2K, MEK 4 y MEK6, conllevando a la activación de *c-Jun N-Terminal Kinases* (JNKs) y p38MAPK. JNK activa la transcripción génica a través del factor de transcripción AP-1. En adición, también se activa la vida de señalización ERK que activa factores de transcripción EGR-1.

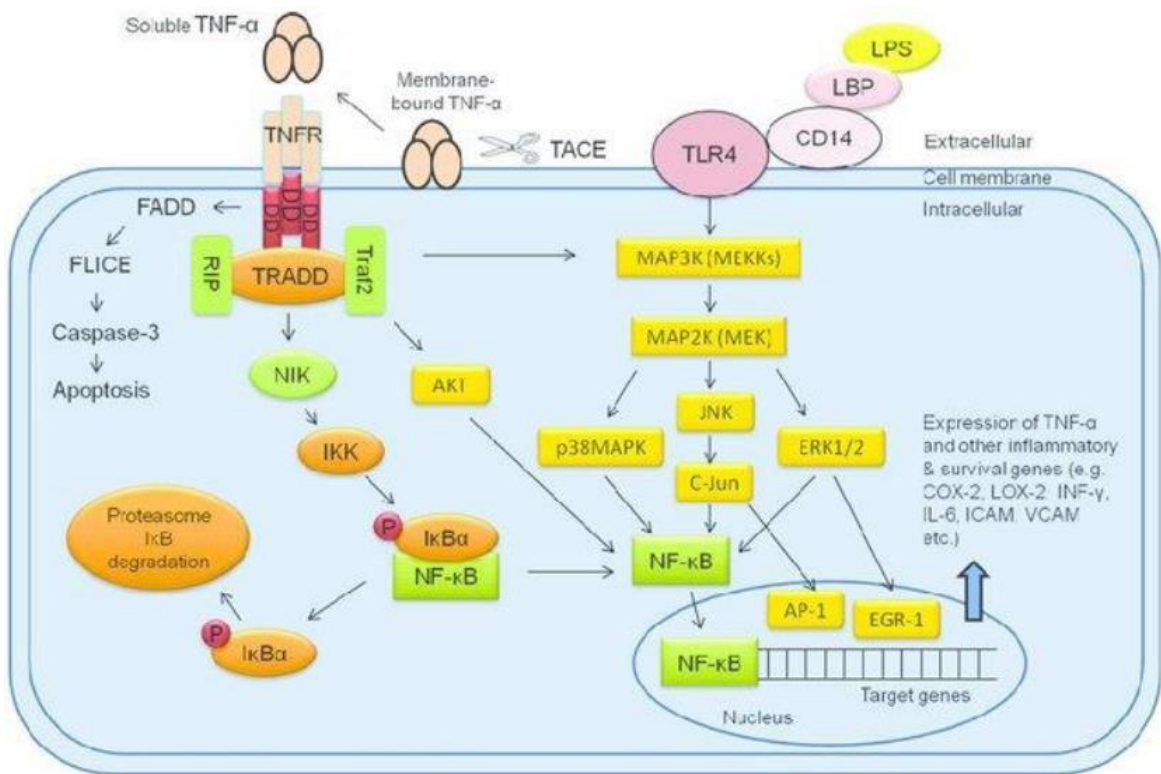


Figura 7. Fitoquímicos como una Fuente potencial para inhibidores TNF-α. Tomado de Iqbal M y Cols, *Phytochemistry reviews*. 2013 Mar 1;12(1):65-93.

Las tres vías anteriores de igual manera activan NFκB (ver figura 8). TRAF2 estimula el complejo I el cual está conformado en la membrana citoplasmática por TRADD, RIP, TRAF2. Por otra parte, al activarse TNFR1 se inducen señales proapoptóticas a través de *Fas-associated death domain* (FADD), el cual inicia el proceso apoptótico si el NFκB no induce proteínas antiapoptóticas tales como FLIPL.

18 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

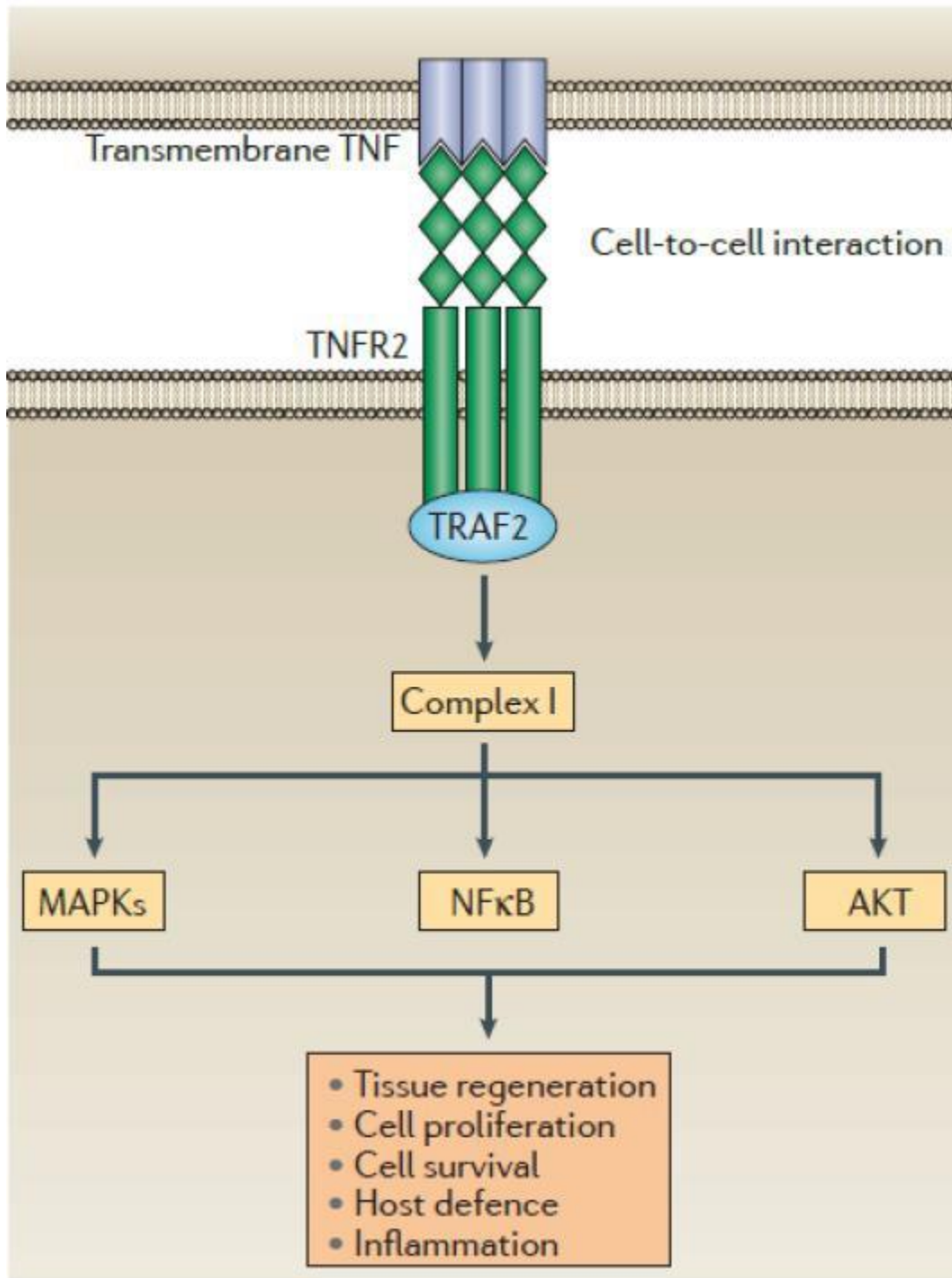


Figura 8. Biología de TNF, mecanismos patogénicos y estrategias terapéuticas emergentes. Tomado de Kalliolias GD y Ivashkiv LB, Nature Reviews Rheumatology. 2016 Jan;12(1):49.

1.5 Enfermedad Periodontal

El término “enfermedad periodontal” está relacionado con condiciones inflamatorias crónicas de los tejidos de soporte del diente, incluyendo gingiva, ligamiento periodontal y hueso. La enfermedad periodontal no ocurre de forma inmediata, esta es el resultado de la progresión de una gingivitis no tratada la cual es iniciada por bacterias presentes en el biofilm formado entre el diente y la gingiva. El signo clínico principal de enfermedad periodontal son las denominadas bolsas periodontales y pueden conllevar a la pérdida dental (89).

La enfermedad periodontal presenta varios tipos, siendo el más común la periodontitis crónica. La periodontitis crónica es clasificada según su severidad en estadio I: periodontitis inicial, estadio II: periodontitis moderada, estadio III: periodontitis severa con potencial de pérdida adicional de dientes, estadio IV: periodontitis severa con potencial de pérdida de la dentición; según la extensión y distribución: localizada, generalizada, distribución molar-incisivo; y según su evidencia o riesgo de rápida progresión: grado A: tasa baja de progresión, grado B: moderada tasa de progresión y grado C: rápida tasa de progresión. Se establecieron parámetros clínicos principales de diagnóstico de enfermedad periodontal según sus distintos estadios basados en pérdida de inserción clínica (CAL por sus siglas en inglés), pérdida ósea y profundidad de sondaje (PD por sus siglas en inglés). CAL 1-2 mm, <15% de pérdida ósea predominantemente horizontal, PD \leq 4 mm son característicos del estadio I, CAL 3-4 mm, 15% - 35% de pérdida ósea horizontal, PD \leq 5 mm para estadio II, CAL \geq 5 mm, pérdida ósea con extensión hacia la mitad o tercio apical de la raíz del diente, PD \geq 6 mm con pérdida dental de \leq 4 dientes para estadio III, CAL \geq 5 mm, pérdida ósea con extensión hacia la mitad o tercio apical de la raíz del diente, PD \geq 6 mm con pérdida dental de \geq 5 dientes para estadio IV. Según la extensión y distribución se considera generalizada si afecta >30% de sitios afectados(90).

Varios factores de riesgo han sido identificados y establecidos, uno de ellos y el que ha cobrado mayor importancia es el hábito de fumar cigarrillo(91). En adición, la diabetes

mellitus es la enfermedad sistémica más prevalente y estudiada que predispone a periodontitis (92). Otros factores para destacar son el bajo nivel educativo, bajos ingresos económicos, etnia afroamericana y en menor instancia (debido que no han sido ampliamente dilucidados) variables psicosociales (93). El factor genético ha sido considerado relevante para la aparición y progresión de la periodontitis. En la actualidad, estudios de asociación genómica no han identificado SNV's específicos entre las poblaciones. Sin embargo, se conoce que existe una contribución poligénica y factores epigenéticos en interacción con el medio ambiente (89).

Considerando los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad periodontal, la disbiosis en el biofilm microbiano juega un papel importante en la generación y progresión de esta patología(94). Sin embargo, esta disbiosis no es contundente por sí misma para la implantación de la enfermedad periodontal, sino que se acompaña de una hiperreactividad inmune hacia la presencia microbiana(95,96). Las células del epitelio de unión actúan como una barrera física contra los patógenos y provocan la respuesta inmune innata y adquirida(97). Las células dendríticas dentro del epitelio toman material antigénico microbiano, lo llevan a tejidos linfoides para la presentación a linfocitos. Posterior a ello se genera una infiltración de neutrófilos, granulocitos y linfocitos, generando una respuesta inflamatoria crónica que desencadena la resorción ósea por los osteoclastos, degradación de las fibras del ligamento periodontal por metaloproteinasas de la matriz y la formación de tejido de granulación, procesos importantes para la aparición y progresión de la enfermedad periodontal(98).

1.5.1 Epidemiología de la Enfermedad Periodontal

La prevalencia de la enfermedad periodontal es variable entre las poblaciones, afecta principalmente adultos, pero también puede ocurrir en niños y adolescentes. Se ha estimado que aproximadamente 10 – 15% de la población global se encuentra afectada por manifestaciones severas y formas avanzadas de periodontitis(4). En Colombia, según el último Estudio Nacional de Salud Bucal -ENSAB IV el 61.8% de la población está

afectada por periodontitis crónica. Los individuos de sexo masculino son los más afectados en un 66.41% respecto a las mujeres con un 57.41%(99).

1.6 Apnea Obstructiva del Sueño

La apnea obstructiva del sueño es un trastorno respiratorio del sueño, definido como la ausencia del flujo respiratorio con más de 10 segundos de duración asociado a incremento en el esfuerzo respiratorio (periodo entre 10 segundos y dos minutos) medido en las bandas toracoabdominales o por aumento de la presión esofágica lo que lo diferencia de la apnea central del sueño(100,101). El signo clínico principal de la AOS es el cese del flujo de aire >90% resultante a pesar del esfuerzo inspiratorio debido a bloqueo en las vías aéreas superiores(102). Durante el sueño existe una reducción en el tono de los músculos dilatadores que permiten la permeabilidad de las vías aéreas superiores, la relajación del músculo geniogloso que permite la retracción posterior de la lengua dentro de la faringe facilitando la obstrucción(103). Estas eventuales interrupciones dan lugar a despertares transitorios repetidos y disminución en la saturación de oxígeno(101). Para el diagnóstico de este trastorno el método de referencia es la polisomnografía, el cual consiste en el registro de variables respiratorias que nos permiten evaluar la cantidad y calidad del sueño mediante eventos respiratorios y neurofisiológicos(104). Los individuos que son sometidos a esta prueba presentan un índice de apnea-hipoapnea (AHÍ *por sus siglas en inglés*, se refiere al número de eventos de apneas-hipoapneas por hora) ≥ 5 . La severidad de la AOS es determinada con el índice AHÍ, 5 a 14 es leve, 15 a 30 moderada y >30 severa.

La fisiopatología de la AOS es compleja y aún no es bien conocida. Factores de riesgo han sido asociados a esta entidad, tales como, la obesidad, acromegalia, hipotiroidismo, amiloidosis, tesaurismosis, anormalidades anatómicas orofaríngeas o craneofaciales relacionadas a hipertrofia amigdalina o velopalatina, depósito de grasa en pilares amigdalinos, macroglosia, glosoptosis relacionada a micrognatia y a retracción de la mandíbula, pólipos y tumores nasales, hipertrofia de los cornetes nasales, adenoides o tumores rinofaríngeos, distrofia muscular que genera disminución en la actividad de los músculos dilatadores de las vías aéreas superiores (101,105,106). Otros factores de riesgo, como el hábito de fumar, consumo de alcohol, uso de sedantes y congestión nasal, han sido sugeridos, pero la literatura científica en torno a ellos es escasa(100).

1.6.1 Epidemiología de Apnea Obstructiva del Sueño

Se ha reportado una prevalencia general que varía entre 9% a 38% en adultos >18 años limitada a población en Europa y América del norte (107). En 2007 la Organización Mundial de la Salud estimó que más de 100 millones de personas alrededor del mundo eran propensos a tener AOS (108). Según lo reportado por V.A Benjafield y cols. (2019), un estimado de 936 millones de individuos entre 30-69 años con índice AHI ≥ 5 presentaban AOS. Una prevalencia global de esta patología con índice AHI ≥ 5 fue estimada en 730 millones de personas, afectando predominantemente a China, seguido por Estados Unidos, Brasil e India (109). En Colombia se reportó una prevalencia del 19% en tres ciudades (Bogotá, Bucaramanga y Santa Marta) con la metodología ómnibus. Por otro lado, en estas mismas ciudades se estimó una prevalencia global del 26.9% con la escala STOP-Bang (110).

1.7 Implicaciones de los genes IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la etiopatogenia de la Enfermedad Periodontal y Apnea Obstructiva del Sueño

La susceptibilidad a estas enfermedades inflamatorias está determinada por el estado de equilibrio entre los efectos de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias(28). Se ha reportado una influencia genética en la etiopatogénesis de estas entidades al identificar genes candidatos que codifican para estas citoquinas como posibles loci de susceptibilidad, entre ellos, los genes IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Sin embargo, estudios de asociación genotipo-fenotipo son inconsistentes entre poblaciones debido a diferencias raciales y regionales(111), y a la misma naturaleza de la enfermedad determinada por condiciones multifactoriales y poligénicas.

SNVs han sido identificados en distintas poblaciones en el gen IL-1 β en las posiciones c.+3954/3953C>T (rs1143634), c-511C>T (rs16944), c.-31T>C (rs1143627)(20), las cuales han sido asociadas a enfermedad periodontal. El SNV rs1143634 ha sido asociado con la progresión y severidad de la periodontitis crónica en individuos caucásicos(26,112). En la región promotora las variantes c.-1464 G/C (rs1143623) y c.-3737 G/A (rs4848306)

se presume que actuaban en haplotipo en el proceso transcripcional e incidían en los niveles de fluido crevicular gingival de la proteína IL-1 β en individuos con PC (113). Wang H.F y cols (2017) realizaron un metaanálisis sobre la relación entre el SNV c.-511C>T y periodontitis en población china y obtuvieron una asociación significativa con el riesgo de periodontitis en esta población, así mismo reportaron que esta asociación genética se mantenía después de realizar una exploración sin tener en cuenta factores como el medio ambiente y antecedentes genéticos diferentes entre los individuos estudiados(111). En relación con la AOS, Popko K. y Cols (2008) realizaron un estudio de casos y controles evidenciando que la frecuencia del alelo T y C en la posición c.+3954/3953 fue similar en ambos grupos estudiados(18). Gok I. y Cols (2015) analizaron el SNV rs1143634, reportando un cambio polimórfico en 41.9% de pacientes en comparación a 25.8% en controles(114).

SNVs en la región promotora del gen IL-6 en la posición c.-572 G/C (rs1800796) han sido asociadas con AOS y su severidad(19), tal como lo reportado por Wu W y cols (2016) quienes observaron que aquellos individuos con presencia del alelo C y genotipo homocigoto para este alelo presentaban 8.3 veces riesgo de desarrollar un fenotipo moderado de AOS (115). Larkin y Cols (2010) sugirieron que variantes en el gen IL-6 podrían influenciar el riesgo de AOS independientemente de otros factores como la obesidad (116). De manera análoga, respecto a la enfermedad periodontal, esta misma variante c.-572 G>C ha sido sugerida como un alelo de riesgo debido que podría aumentar la susceptibilidad de desarrollo o progresión de esta enfermedad (21). Otros SNVs en esta región genómica han sido identificados tales como c.-174G>C, c.-373A>T y c.-597 G>A. Costa y Col (2010) reportaron que el SNV c.-174G>C (rs1800795) podría jugar un rol en la PC (117).

En relación con el gen TNF- α , la hipoxia intermitente en individuos con AOS promueve la transcripción de TNF- α e incrementa la producción de esta citoquina, resultando en inflamación sistémica(118). Zhang Z y cols (2019) llevaron a cabo un estudio de casos y controles en China con individuos que presentaban fenotipo de apnea obstructiva del sueño, obteniendo asociación significativa con el incremento en la susceptibilidad de

24 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

presentar esta patología en presencia del SNV c.-308G>A (rs1800629)(19). Popko K. y Cols (2008) reportaron que el alelo A en la posición genómica c.-308 fue más frecuente en sujetos con AOS que en individuos controles con una diferencia del 5-7%(18). Por el contrario, en relación con la PC, V. Dosseva-Panova y Cols (2015) sugieren que el alelo G y su genotipo homocigoto podría desempeñar un rol importante en el desarrollo y progresión de esta patología en población búlgara(119). Desde hace más de dos décadas se ha sugerido una posible relación con gran énfasis en la región promotora c.-308 del gen TNF- α y la PC, no solo en su desarrollo sino en la progresión de su severidad (22). Dada esta relevancia, se ha continuado en la indagación y confirmación de esta posible asociación en distintos grupos poblaciones, así mismo, ha traído consigo la exploración de otros posibles puntos calientes o *hotspots*. Soya Y. y Cols (2003) realizaron un estudio que buscaba observar la asociación de SNVs recientemente identificados distintos a c.-308G>A en la región promotora del gen TNF- α y la enfermedad periodontal en población japonesa, reportando una significativa mayor frecuencia de portadores de al menos una variante alélica en c.-1031T>C, c.-863C>A, c.-857C>T en individuos con periodontitis crónica severa que en sujetos sanos. Además, estos individuos presentaban cantidades séricas elevadas de proteína TNF- α (24).

1.8 ¿Existe asociación entre los fenotipos de Enfermedad Periodontal y Apnea Obstructiva del Sueño? ¿Es bidireccional esta asociación?

La enfermedad periodontal posee una causalidad multifactorial, a pesar de ello, su etiología se atribuye principalmente a bacterias gram negativas y espiroquetas que desencadenan respuestas inflamatorias (120). Esta es una entidad patológica dinámica, la cual puede ser modificada por factores comportamentales /estilos de vida, fármacos, condiciones sistémicas, inmunológicas, y trastornos hematológicos(121). Se ha establecido que los patógenos periodontales y mediadores inflamatorios no solo están confinados al tejido periodontal, pueden diseminarse vía sérica y generar un gran impacto en la inflamación sistémica como también predisponer a enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades cardiacas coronarias, infartos, aterosclerosis, partos pretérminos, artritis reumatoide, y recientemente, apnea obstructiva del sueño (6,122,123).

La relación de la enfermedad periodontal con AOS se enmarca en dos razones fundamentales: 1) mediadores inflamatorios que presuntamente desempeñan un rol importante en la patogénesis de ambas entidades y, 2) factores de riesgo comunes (15,124). Factores de riesgo para el desarrollo de PC como el género, edad, hábito de fumar, consumo de alcohol, obesidad y diabetes son también relativamente comunes en AOS (125,126). La respiración bucal y las intermitentes disminuciones en la oxigenación de tejidos durante el sueño pueden crear una predisposición a PC en sujetos con AOS(124). La biopelícula formada y establecida en la periodontitis es capaz de aumentar la carga inflamatoria sistémica preexistente a través de la elevación de los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios importantes. La respuesta inflamatoria resultante junto con factores genéticos y ambientales podría potenciar cualquier enfermedad inflamatoria existente(127).

Gunaratnam y Cols (2009) fueron pioneros en hipotetizar la asociación entre enfermedad periodontal y apnea obstructiva del sueño. Ellos obtuvieron una prevalencia del 77% de PC en pacientes con AOS. Así mismo, demostraron que la prevalencia de PC en pacientes con AOS fue cuatro veces mayor que el promedio nacional australiano. Seo y Cols (2013) reportaron una mayor prevalencia de AOS en pacientes con PC (17). La AOS puede actuar como un mediador inflamatorio para la periodontitis y viceversa(128). Estudios de asociación han demostrado que el 60% de pacientes con PC mostraron un elevado riesgo de AOS comparado con solo un 28% de individuos controles. Pacientes con PC moderada a severa poseen 4.1 veces más probabilidad de estar en riesgo de desarrollo de AOS que pacientes controles con gingivitis o periodontitis leve, concluyéndose una relación significativa entre PC moderada o severa y riesgo de AOS(17,129). La AOS ha sido positivamente asociada con periodontitis en sujetos ≥ 55 años, pero no en sujetos menores de esta edad. En población latina, Cuervo A. y Cols (2016) realizaron un estudio en 166 pacientes en la ciudad de Bogotá, Colombia con el objetivo de evaluar la condición periodontal en individuos con AOS, sus resultados mostraron una prevalencia de PC del 60.1% en individuos con AOS, siendo más prevalente la forma severa en un 74% (27). Para el diagnóstico de PC se tienen en cuenta parámetros clínicos como profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, los cuales han sido empleados para identificar una

asociación con indicadores de AOS y establecer una posible relación entre ambas enfermedades. Nizam N. y Cols (2014) reportaron una correlación significativa entre profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica con índice de apnea-hipoapnea, índice de desaturación de oxígeno, saturación nocturna de oxígeno más baja (SpO₂), tiempo de sueño con SpO₂ < 90% (min), tiempo de sueño con SpO₂ < 90% (%)(124). Seo WH y Cols (2013) reportaron una correlación significativa entre un alto índice de apnea-hipoapnea (>10/h) con profundidad al sondaje y pérdida de inserción clínica en una forma dosis-respuesta(17). Sin embargo, no está totalmente elucidada esta relación entre parámetros clínicos en estas entidades debido a contrariedades reportadas, Loke W. y Cols (2014) describieron que la profundidad al sondaje, pérdida de inserción clínica \geq 3mm, profundidad de \geq 5mm no fueron significativamente correlacionadas con el índice de apnea- hipoapnea(127). Así mismo, observaron en su estudio que la proporción de sujetos con periodontitis moderada/severa incrementaba progresivamente con la severidad de AOS (índice apnea-hipoapnea), sin embargo, la asociación no fue estadísticamente significativa. El porcentaje promedio de sitios con pérdida de inserción \geq 3 mm, sangrado al sondaje y porcentaje placa bacteriana habían incrementado junto con el aumento en la severidad del índice apnea-hipoapnea, pero solo se obtuvo significancia estadística con el porcentaje de sitios con *biofilm*, concluyendo que no existió una relación dosis-respuesta entre la PC y la severidad de la AOS (127).

La etiología de la inflamación sistémica y AOS no es clara, pero podría estar relacionada a la inflamación en la cavidad bucal y enfermedad periodontal(17).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar SNVs en la región promotora de los genes IL-1 β c.-511C>T, c.-31T>C; TNF- α c.-308 G>A; IL-6 c.-572G>C, c.-174C>G, y establecer los niveles de estas citoquinas proinflamatorias en saliva en los fenotipos de AOS y PC.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de variantes en la región promotora de los genes IL-1 β c.-511C>T, c.-31T>C (rs16944, rs1143627); TNF- α c.-308 G>A (rs1800629); IL-6 c.-572G>C, c.-174C>G (rs1800796, rs1800795) en individuos con fenotipos de AOS y PC.
- Calcular el riesgo de susceptibilidad de desarrollar AOS y PC asociado a variantes en la región promotora de los genes IL-1 β c.-511C>T, c.-31T>C; TNF- α c.-308 G>A; IL-6 c.-572G>C, c.-174C>G.
- Describir los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 en saliva de individuos con fenotipos de AOS y PC.
- Correlacionar las variantes IL-1 β c.-511C>T, c.-31T>C; TNF- α c.-308 G>A; IL-6 c.-572G>C, c.-174C>G con los niveles de citoquinas proinflamatorias en saliva en los individuos con fenotipos de AOS y PC.

3. Metodología

3.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional analítico de tipo de casos y controles

3.2 Muestreo

La selección de la muestra se realizó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, donde los sujetos casos fueron agrupados de la siguiente manera: individuos con diagnóstico clínico de AOS sin PC, individuos con diagnóstico clínico de PC sin AOS, sujetos con diagnóstico conjunto de AOS y PC. Los Individuos controles correspondieron a aquellos sujetos que no presentaron diagnóstico de AOS ni de PC, los cuales fueron emparejados por criterios por edad, sexo, origen étnico y estrato socioeconómico similar al grupo de casos. En el diseño del estudio, se tuvo por objetivo una distribución de 30 sujetos por cada subgrupo.

3.3 Criterios de selección

La muestra estuvo conformada por individuos ≥ 30 años los cuales fueron seleccionados en la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

3.3.1 Criterios de inclusión

Fueron seleccionados aquellos individuos con diagnóstico de periodontitis crónica. Para el diagnóstico se realizó examen periodontal de boca completa basados en los criterios del último sistema de clasificación de enfermedades y condiciones periodontales definidos por la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP), siendo los parámetros clínicos de profundidad de sondeo (PS > 3 mm en dos o más dientes), nivel de inserción clínica (pérdida NIC ≥ 2 mm en zonas interdetales en dos o más dientes no adyacentes, o pérdida NIC vestibular ≥ 3 mm) y sangrado al sondeo en seis sitios por diente (mesiovestibular a distovestibular y de mesiolingual/palatino a distolingual/palatino) excluyendo terceros molares(90). Todos estos parámetros clínicos

fueron llevados a cabo por un examinador experto docente del posgrado de periodoncia usando una sonda periodontal de la OMS.

En relación con los individuos que fueron parte del grupo de casos con apnea obstructiva del sueño, su diagnóstico se llevó a cabo mediante polisomnografía en la Pontificia Universidad Javeriana. Adicionalmente, para el diagnóstico se tuvo en cuenta el índice de apnea-hipoapnea (AHÍ) ≥ 5 , desaturación de oxígeno $\geq 4\%$, reducción del flujo de aire continuo >10 segundos (115).

Fue requerida la firma del consentimiento informado de todos los individuos para la aceptación de su participación en el presente estudio (anexo 1).

3.3.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos sujetos que presentaron cuadros infecciosos, diabetes, hábito de fumar, individuos con enfermedades neurológicas o psiquiátricas, individuos bajo tratamiento con corticoides, anticonvulsivantes y antiepilépticos en los últimos 6 meses previos al examen clínico para diagnóstico de periodontitis crónica y apnea obstructiva del sueño y sujetos con índice de masa corporal correspondiente obesidad.

3.4 Extracción de ADN y genotipificación

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de saliva, las cuales fueron recolectadas usando el dispositivo Oragene DNA Sample Collection Kit (OG-500 DNA Self-Collection Kit, Genotek, Ottawa, Ontario, Canadá). Según las recomendaciones del fabricante, los participantes no debieron haber ingerido alimentos y/o bebidas por al menos 30 minutos antes de la recolección de saliva. Si esto no se cumplía, se realizó un enjuague con agua y se esperó al menos 15 minutos para proceder a donar la muestra. Para la recolección de saliva, se solicitó a los sujetos frotar suavemente su lengua contra el interior de su boca por 15 segundos y proveer una cantidad de saliva (sin burbujas) hasta alcanzar

la marca de llenado en el vial de recolección. Posteriormente, el vial fue cerrado, rotulado e invertido suavemente 10 veces para mezclar la saliva con la solución de almacenamiento y preservación del kit Oragene.

El ADN se extrajo a partir de 0.5 mL de muestra utilizando el reactivo PT-L2P (DNA Genotek, Inc., Ottawa, ON, Canadá) acorde al protocolo del fabricante y almacenado a -20°C. Se evaluó la cantidad y calidad del ADN mediante espectrofotometría usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y electroforesis en geles de agarosa 1.5% para 60 muestras (50% del total). Se amplificaron segmentos de regiones promotoras mediante reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) para genotipificar cinco SNVs, los cuales, según cada gen fueron:

Gen	Localización	Primer Forward	Primer Reverse
IL-6	-572 -174	TGGCAAAAAGGAGTCACACA (130)	TTTGTTGGAGGGTGAGGGTG
IL-1 β	-511 -31	CTCTGCCCCAGCCAAGAAAG	GCTGAAGAGAATCCCAGAGCA
TNF α	-308	AACACAGCTTTTCCCTCCAA	TAGCTGGTCCTCTGCTGTCC (131)

Los primers para la PCR fueron diseñados en la herramienta de Primer-Blast de la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) perteneciente a los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés) y algunos obtenidos mediante revisión de literatura, tales como el primer forward para IL-6 (130) y el primer reverse para TNF- α (131). La síntesis de los primers se realizó en Macrogen Inc (Geumcheon-gu, Seoul, Corea). Todos los ensayos de genotipificación fueron validados y/o estandarizados antes de procesar las muestras del estudio. Se verificó la calidad de la totalidad de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa 2% y su visualización en un transiluminador.

3.4.1 Condiciones de PCR

IL-6

95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 62°C por 40 segundos y 72°C por 45 segundos, seguido de 72°C por 10 minutos (130).

IL-1 β

95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 59.2°C por 40 segundos y 72°C por 45 segundos, seguido de 72°C por 10 minutos (130).

TNF- α

95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 40 segundos y 72°C por 45 segundos, seguido de 72°C por 10 minutos(131).

Una vez obtenidos los productos de PCR con su previa verificación de la calidad, se procedió a realizar su purificación con acetato de amonio 5M y posterior envío para secuenciación Sanger en un laboratorio de genética molecular en Colombia y Estados Unidos.

3.5 Cuantificación de proteínas IL-6, IL-1 β , TNF- α en saliva

El proceso de cuantificación de citoquinas en saliva se realizó por duplicado mediante el kit HCYTOMAG60K MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (Millipore, Billerica, MA, USA) procesados en la plataforma Luminex. Se siguió el protocolo del fabricante. Las tres citoquinas principales de nuestro interés fueron analizadas: IL-6, IL-1 β , TNF- α , así mismo, se adicionaron otras citoquinas para futuros análisis exploratorios aparte de esta investigación: sCD40L, EGF, FGF-2, Flt-3 ligand, Fractalkine, G-CSF, GM-CSF, GRO, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1,

MCP-3, MDC (CCL22), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-AB/BB, RANTES, TGF- α , TNF- β , VEGF, Eotaxin/CCL11, PDGF-AA.

3.6 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva (promedio, desviación estándar y frecuencias) para el análisis de variables sociodemográficas, distribución de diagnósticos según severidad de periodontitis crónica y apnea obstructiva del sueño. En adición, se comparó la edad promedio de casos y controles mediante el test U de Mann-Whitney con corrección de continuidad.

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas de forma global para casos y controles, y según cada subgrupo de casos. Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias alélicas observadas respecto a las esperadas en el grupo control mediante la prueba chi-cuadrado (χ^2) con un grado de libertad. Se determinó si existían diferencias en estas frecuencias entre los diferentes grupos mediante el test χ^2 con corrección de continuidad de Yates o mediante el test exacto de Fisher.

Para la elección de las pruebas estadísticas se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos.

Un valor de $p < 0.05$ y ≤ 0.01 con corrección de significancia fueron considerados estadísticamente significativos. La asociación entre los SNVs IL-6 (rs1800796, rs1800795), IL-1 β (rs16944, rs1143627), TNF- α (rs1800629) y el riesgo de susceptibilidad de PC y/o AOS se determinó mediante la estimación de coeficientes *Odds ratio* (OR) utilizando intervalos de confianza de 95% y prueba de Wald para su significancia.

Los niveles de proteínas IL-1 β , TNF- α , IL-6 fueron comparados entre los genotipos formados por los alelos de interés c.-511C>T, c.-31T>C; c.-308 G>A; c.-572G>C, c.-174C>G, respectivamente, y relacionando el genotipo según cada fenotipo analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y prueba post-hoc de múltiples comparaciones Wilcoxon con corrección de la significancia con prueba Holm y prueba Dunn.

Las frecuencias alélicas y genotípicas globales, y el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg fue realizado a través de la herramienta SNPStats, el resto de los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico R versión 3.6.2 para Windows (R Core Team, 2019), y la librería GGplot2 en R para la generación de gráficos de los niveles de proteínas.

3.7 Consideraciones éticas

La presente propuesta de investigación se considera como “investigación con riesgo mínimo” de acuerdo con el artículo 11, capítulo 1, título II de la resolución 8430 de 1993 de la república de Colombia. Para todos los sujetos participantes se exigirá por escrito la firma del consentimiento informado y se explicarán los objetivos del proyecto, sus potenciales beneficios y posibles riesgos. Los sujetos participantes aceptaran la donación de la muestra de saliva, la extracción de ADN y su procesamiento para el presente estudio a partir de la firma del consentimiento informado del proyecto macro en conjunto a esta investigación, titulado: “Caracterización de la Microbiota oral asociada a Apnea Obstructiva del Sueño en pacientes con periodontitis”, el cual, ya se encuentra aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (se adjunta consentimiento informado). Es relevante destacar que la presente propuesta de investigación además de generar nuevos hallazgos buscará responder algunas preguntas del macroproyecto, por ende, se tomarán las muestras de saliva recolectadas en la Pontificia Universidad Javeriana bajo el macroproyecto mencionado, por lo tanto, en la Universidad Nacional de Colombia no se realizará ningún tipo de muestreo. La información obtenida de los sujetos de investigación solo será manipulada por los miembros del presente proyecto de investigación, con el fin de proteger su privacidad y confidencialidad.

La presente investigación fue aprobada por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia mediante acta No. 009-075^a y cofinanciada por la Universidad Nacional con proyecto Hermes N. 50935.

3.8 Consideraciones de bioseguridad y riesgo ambiental

En el presente estudio se tomó una muestra de saliva a los participantes con el dispositivo Oragene DNA Sample Collection Kit (OG-500 DNA Self-Collection Kit, Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). La recolección de la muestra y los productos derivados de esta por su procesamiento serán descartados bajo normas de bioseguridad para garantizar la protección del personal en el área y del ambiente. Este proceso será llevado a cabo bajo condiciones de asepsia y antisepsia.

Según las indicaciones establecidas por el Ministerio de Salud y Protección Social, los dispositivos de recolección de saliva, guantes, residuos biológicos y demás materiales de laboratorio serán recolectados en bolsas rojas específicas para el depósito de utensilios en contacto con material biológico, para finalmente ser descartados por la empresa contratada por la Universidad Nacional de Colombia.

Este proyecto tiene mínimo impacto ambiental, generado de forma indirecta por realizar actividades que producen como cualquier actividad humana, residuos que son desechados de acuerdo con las normas vigentes.

3.9 Propiedad intelectual

El presente proyecto de investigación se rige con base en lo estipulado en el “convenio de cooperación académica entre la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad Nacional de Colombia” del año 2011, enfatizándose en la séptima cláusula sobre **propiedad intelectual**. Los productos de investigación derivados de la realización de este proyecto serán concedidos a la Pontificia Universidad Javeriana, Universidad de Cartagena y la Universidad Nacional de Colombia por su contribución intelectual y económica.

4. Resultados

4.1 Datos descriptivos de la muestra de estudio

En total, se analizó una muestra de 129 individuos provenientes de la ciudad de Bogotá, con un rango de edad igual entre ambos grupos de estudio, siendo la edad promedio de 30 a 40 años más frecuente para los sujetos casos y controles, y siendo el sexo femenino el más prevalente (54%). Es importante resaltar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución de estas variables, lo cual hace ambos grupos comparables (tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas de los sujetos de estudio

<i>Indices clínicos</i>		<i>Control</i> n=64 (49%)	<i>Casos</i> n=65 (51%)	<i>p-valor</i>
Rango de edad (años)	30 - 70	30 - 70	30 - 70	
Edad promedio (DE)	46.4±12	45±13	48±11	0.4679 [‡]
	30 – 40	25	22	
	41 – 50	11	15	
	51 – 60	23	18	
	61- 71	5	10	
Sexo				
	Masculino	26 (40%)	33 (50%)	
	Femenino	38 (59%)	32 (49%)	0.3273 ⁺

[‡] Test U de Mann-Whitney con corrección de continuidad

⁺ Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates ($\chi^2= 0.959$, gl= 1)

Teniendo en cuenta los tres subgrupos de casos, los diagnósticos de periodontitis crónica severa (11%), apnea obstructiva del sueño leve (9%), y la concomitancia de periodontitis crónica severa y apnea obstructiva del sueño severa (8%) fueron los más prevalentes (tabla 2).

Tabla 2. Distribución de diagnósticos entre individuos casos

<i>Diagnóstico</i>	<i>Frecuencia (%)</i>
Periodontitis Leve	1 (0.8)
Periodontitis Moderada	3 (2.3)
Periodontitis Severa	14 (11)
AOS Leve	12 (9)
AOS Moderada	3 (2.3)
AOS Severa	4 (3)
Periodontitis Severa y AOS Moderada	7 (5)
Periodontitis Severa y AOS Severa	11 (8)
Periodontitis Moderada y AOS Severa	1 (0.8)
Periodontitis Moderada y AOS Moderada	3 (2)
Periodontitis Severa y AOS Leve	5 (4)
Periodontitis Moderada y AOS Leve	1 (0.8)
Controles	64 (50)

4.2 Frecuencias alélicas y genotípicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α

Considerando el grupo control, las frecuencias alélicas de TNF- α c.-308 G>A, IL-6 c.-572 G>C, IL-6 c.-174 C>G se mantuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$), mientras que para IL-1 β c.-511 T>C y IL-1 β c.-31 C>T se encontraron en desequilibrio (p -valor < 0.05). Los SNVs IL-1 β c.-511T y IL-1 β c.-31C presentaron asociación al grupo de individuos con los fenotipos estudiados con un efecto de riesgo ($p = 0.00071$ OR: 2.83 (IC 1.57-5.10), $p = 0.001$ OR: 2.81 (IC 1.51-5.20), respectivamente) (tabla 3). La frecuencia de los alelos de riesgo IL-1 β c.-511T y IL-1 β c.-31C fue mayor en sujetos casos (56 y 43%) que en controles (31 y 21%) (tabla 3). Dadas estas asociaciones, se realizó un análisis comparativo entre los subgrupos de casos y controles, evidenciándose que el alelo IL-1 β c.-511T se comportaba como de riesgo para individuos con fenotipo de AOS (OR 3.36 (IC 1.4-7.8)) y para sujetos con PC más AOS (OR 4.8 (IC 2.2-10.3)) (tabla 5). De igual forma, el alelo IL-1 β c.-31C presentó el mismo efecto en los fenotipos de AOS (OR 3.6 (IC 1.5-8.5)) y en PC más AOS (OR 4.8 (IC 2.2-10.3)) (tabla 6). Los alelos de riesgo fueron más frecuentes en sujetos diagnosticados con ambas enfermedades inflamatorias (tabla 4).

A pesar de que no se evidenció asociación estadística del alelo IL6 c.-572 G>C, se observa que esta variante es más frecuente en casos que en controles, 46 y 14%, respectivamente (tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias alélicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α

<i>Gen</i>	<i>Total sujetos</i>		<i>Casos</i>		<i>Controles</i>		<i>p-valor</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>		
TNFA. -308G/A rs1800629								
	129							
G	183	91	110	89	73	94	0.3632 ⁺	1.00
A	19	9	14	11	5	6		0.53 (0.18 – 1.55)
Equilibrio HW			0.56		1			
IL1B -511 C/T rs16944								
	98							
C	110	56	45	44	65	69	0.00071 ⁺	1.00
T	86	44	57	56	29	31		2.83 (1.57-5.10)
Equilibrio HW			0.0001		0.0001			
IL1B -31 T/C rs1143627								
	102							
T	137	67	60	57	77	79	0.00142 ⁺	1.00
C	67	33	46	43	21	21		2.81 (1.51-5.20)
Equilibrio HW			0.00078		0.0001			
IL6 -572 G/C rs1800796								
	21							
G	27	64	15	54	12	86	0.0876 [°]	1.00
C	15	36	13	46	2	14		0.19 (0.03-1.02)
Equilibrio HW			0.32		0.077			
IL6 -174 C/G rs1800795								
	5							
C	6	60	2	50	4	67	1 [°]	1.00
G	4	40	2	50	2	33		0.5 (0.02 – 13.01)
Equilibrio HW			0.33		0.2			

+ Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates ($\chi^2= 0.82676$, gl= 1; $\chi^2= 11.451$, gl= 1; $\chi^2= 10.168$, gl=1, $\chi^2= 2.916$, gl= 1)

° Test exacto de Fisher *p-valor <0.05

Tabla 4. Frecuencias alélicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α según discriminación de casos

Gen	Total sujetos		Casos						Controles		
	n	%	PC		AOS		PC + AOS		n	%	
TNFA -308G/A rs1800629	101										
G	183	91	27	84	35	92	48	89	73	94	
A	19	9	5	16	3	8	6	11	5	6	
IL1B -511 C/T rs16944	98										
C	110	56	19	68	12	40	14	32	65	69	
T	86	44	9	32	18	60	30	68	29	31	
IL1B -31 T/C rs1143627	102										
T	137	67	25	83	16	50	19	43	77	79	
C	67	33	5	17	16	50	25	57	21	21	
IL6 -572 G/C rs1800796	21										
G	27	64	5	42	2	33	8	80	12	86	
C	15	36	7	58	4	67	2	20	2	14	
IL6 -174 C/G rs1800795	5										
C	6	60	0	0	0	0	2	50	4	67	
G	4	40	0	0	0	0	2	50	2	33	

Tabla 5. Comparación Intergrupo de frecuencias alélicas IL-1 β c.-511C>T según discriminación de casos

<i>Subgrupos de casos</i>	Controles p-valor	OR	IC 95%
IL1B -511 PC	0.918 ⁺	0.94	0.3-2.3
IL1B -511 AOS	0.008 ⁺ *	3.36	1.4-7.8
IL1B -511 PC + AOS	0.000079 ⁺ *	4.8	2.2 -10.3

⁺ Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates

* p-valor <0.05

Tabla 6. Comparación Intergrupo de frecuencias alélicas IL-1 β c.-31T>C según discriminación de casos

<i>Subgrupos de casos</i>	Controles p-valor	OR	IC 95%
IL1B -31 PC	0.758 ⁺	1.3	0.46-3.99
IL1B -31 AOS	0.004 ⁺ *	3.6	1.5-8.5
IL1B -31 PC + AOS	0.00007 ⁺ *	4.8	2.2-10.4

⁺ Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates

* p-valor <0.05

Los genotipos conformados por los alelos IL-1 β c.-511C, IL-1 β c.-511T, y IL-1 β c.-31T, IL-1 β c.-31C presentaron asociación estadística al grupo de individuos casos cuando se compararon con sujetos controles, $p= 0.02$ y 0.008 , respectivamente. La frecuencia de los genotipos homocigotos IL-1 β c.-511TT y IL-1 β c.-31CC fue mayor en individuos casos (47 y 30%) que en controles (11 y 8%). Así mismo, los genotipos heterocigotos fueron más prevalentes en el grupo de casos (tabla 7).

Al comparar cada subgrupo de casos con los controles se evidenció diferencia estadísticamente significativa en la distribución de genotipos de IL-1 β c.-511 y c.-31 en individuos con diagnóstico de periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño, donde los estados homocigotos c.-511TT (55%), c.-31CC (36%) y heterocigoto CT (27 y 41%) fueron más frecuentes en sujetos con estas patologías, a diferencia de los genotipos homocigotos *wildtype* que fueron más frecuentes en controles (tabla 8). En adición, la presencia de los genotipos con el alelo variante aumenta más de 7 veces el riesgo de desarrollar simultáneamente PC y AOS en individuos que los posee, obteniéndose OR: 7.9

(IC 2.09-29.8) $p=0.002$ para IL-1 β c.-511C>T, y OR: 7.2 (1.8-27.9) $p=0.0001$ para IL-1 β c.-31T>C (tabla 9 y 10).

Tabla 7. Frecuencias genóticas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α

Gen	Total sujetos		Casos		Controles		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
TNFA -308G/A rs1800629	101						
GG	83	82	49	79	34	87	0.6476°
GA	17	17	12	19	5	13	
AA	1	1	1	2	0	0	
IL1B -511 C/T rs16944	98						
TT	35	36	24	47	11	23	0.0234+*
TC	16	16	9	18	7	15	
CC	47	48	18	35	29	62	
IL1B -31 T/C rs1143627	102						
CC	24	24	16	30	8	16	0.0080+*
CT	19	19	14	26	5	10	
TT	59	58	23	43	36	73	
IL6 -572 G/C rs1800796	21						
GG	11	52	5	36	6	86	0.1023°
GC	5	24	5	36	0	0	
CC	5	24	4	29	1	14	
IL6 -174 C/G rs1800795	5						
CC	3	60	1	50	2	67	1°
CG	0	0	0	0	0	0	
GG	2	40	1	50	1	33	

+ Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates ($X^2=7.5023$, $gl=2$; $X^2=9.6522$, $gl=2$)

° Test exacto de Fisher

* p-valor <0.05

Tabla 8. Frecuencias genotípicas en IL-1 β , IL-6 y TNF- α según discriminación de casos

<i>Gen</i>	<i>Total sujetos</i>		<i>Casos</i>						<i>Controles</i>		
			<i>PC</i>		<i>AOS</i>		<i>PC + AOS</i>				
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
TNFA -308G/A rs1800629	101										
GG	83	82	12	75	16	84	21	78	34	87	
GA	17	17	3	19	3	16	6	22	5	13	
AA	1	1	1	6	0	0	0	0	0	0	
IL1B -511 C/T rs16944	98										
TT	35	36	4	29	8	53	12	55	11	23	
TC	16	16	1	7	2	13	6	27	7	15	
CC	47	48	9	64	5	34	4	18	29	62	
IL1B -31 T/C rs1143627	102										
CC	24	23	1	7	7	44	8	36	8	16	
CT	19	19	3	20	2	12	9	41	5	10	
TT	59	58	11	73	7	44	5	23	36	73	
IL6 -572 G/C rs1800796	21										
GG	11	52	2	33	0	0	3	60	6	86	
GC	5	24	1	17	2	67	2	40	0	0	
CC	5	24	3	50	1	33	0	0	1	14	
IL6 -174 C/G rs1800795	5										
CC	3	60	0	0	0	0	1	50	2	67	
CG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GG	2	40	0	0	0	0	1	50	1	33	

Tabla 9. Comparación Intergrupo de frecuencias genotípicas IL-1 β c.-511 C>T según discriminación de casos

<i>Subgrupos de casos</i>	Controles p-valor	OR	IC 95%
IL1B -511 PC	0.825 [°]	0.85	0.21-3.3
IL1B -511 AOS	0.080 [°]	0.23	0.06-0.88
IL1B -511 PC + AOS	0.002 ^{°*}	7.9	2.09-29.8

[°] Prueba exacta de Fisher

* p-valor <0.05

Tabla 10. Comparación Intergrupo de frecuencias genotípicas IL-1 β c.-31T>C según discriminación de casos

<i>Subgrupos de casos</i>	Controles p-valor	OR	IC 95%
IL1B -31 PC	0.434 [°]	2.44	0.2-21.7
IL1B -31 AOS	0.051 [°]	0.22	0.06-0.8
IL1B -31 PC + AOS	0.0001 ^{°*}	7.2	1.8-27.9

[°] Prueba exacta de Fisher

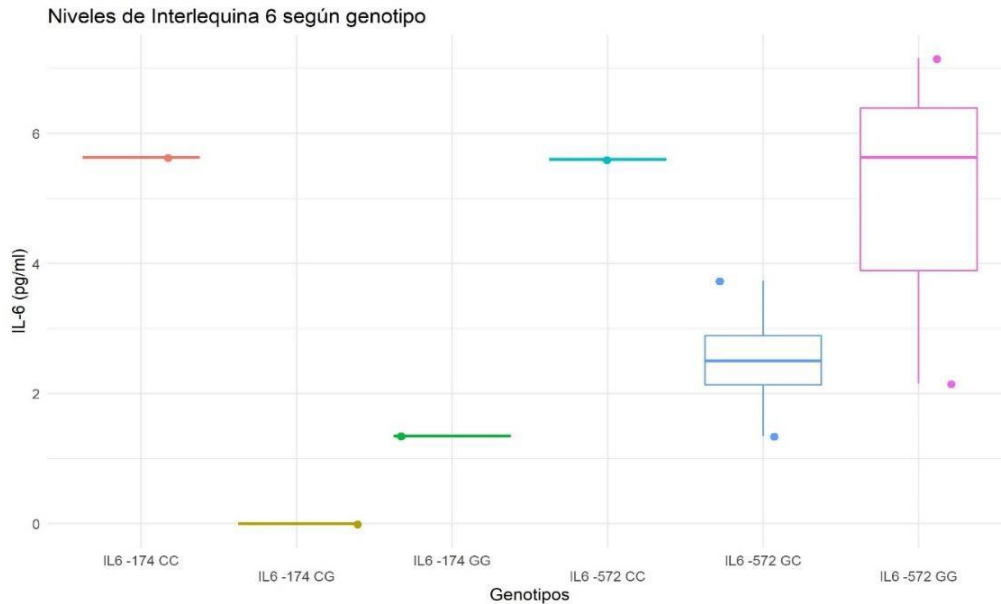
* p-valor <0.05

4.3 Niveles de proteínas IL-1 β , IL-6 y TNF- α según genotipo y fenotipo

Al comparar los niveles de proteína TNF- α entre los individuos teniendo en cuenta los genotipos indistintamente del fenotipo, se observó una mayor distribución y mediana de estos niveles en sujetos homocigotos TNF- α c.-308GG (figura 9).

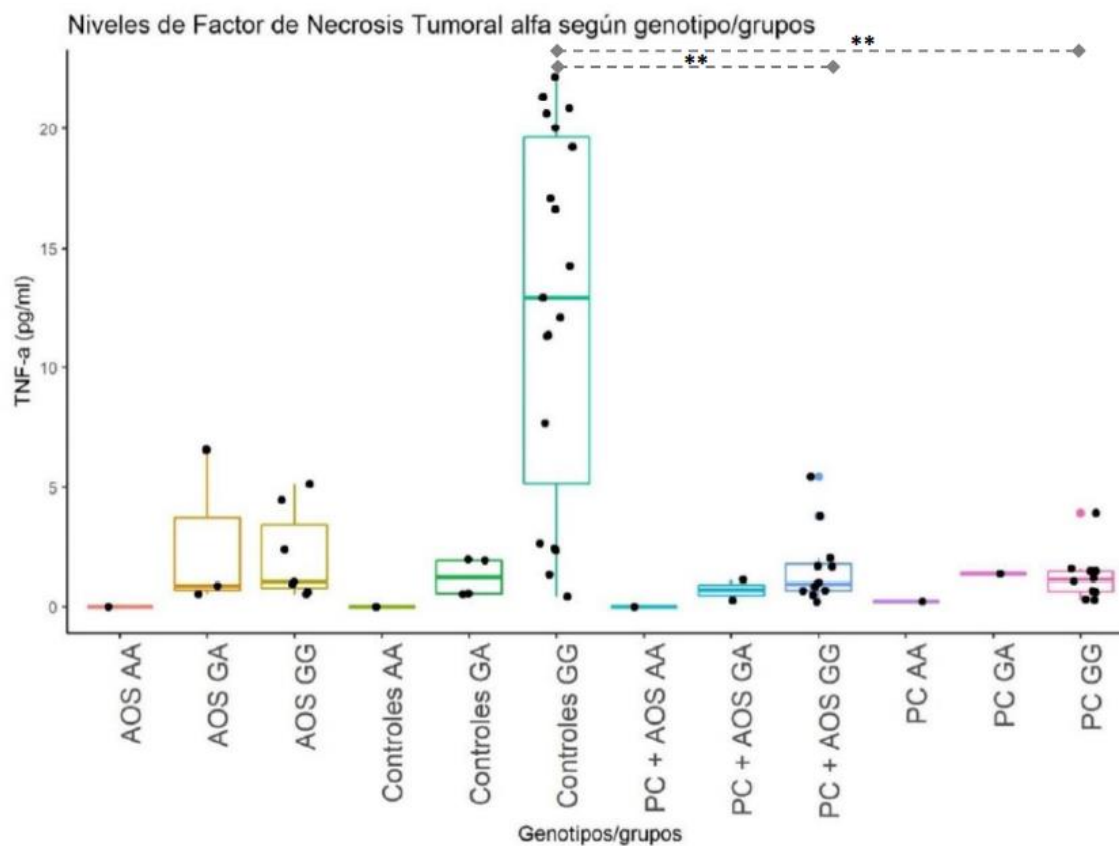
Considerando los niveles de proteínas IL-6, se obtuvieron pocos datos respecto a la variante IL-6 c.-174C>G. Teniendo en cuenta el SNV IL-6 c.-572C>G, se obtuvo una mayor distribución de los niveles de proteínas en genotipo homocigoto GG (figura 11).

Figura 11. Niveles de IL-6 según genotipo en individuos casos



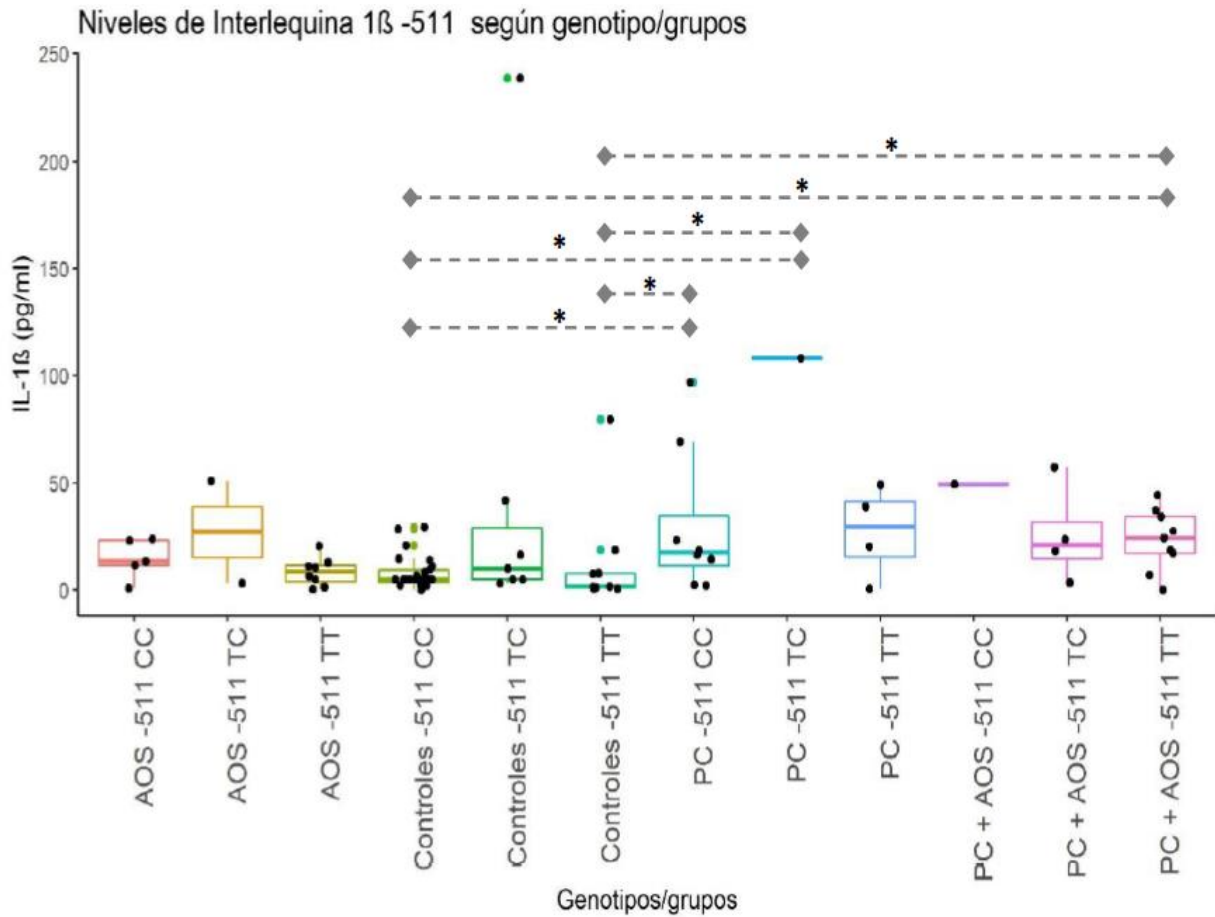
Al comparar los niveles de proteínas de los grupos de fenotipos (PC, AOS, PC más AOS, Controles) según el genotipo de TNF- α se evidenció diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.0002916$), específicamente entre individuos homocigotos GG del grupo control y del grupo de PC más AOS ($p= 0.0013$), y sujetos homocigotos GG del grupo control e individuos homocigotos con PC ($p= 0.0015$) (figura 12).

Figura 12. Niveles de TNF- α según genotipo y fenotipo en individuos casos

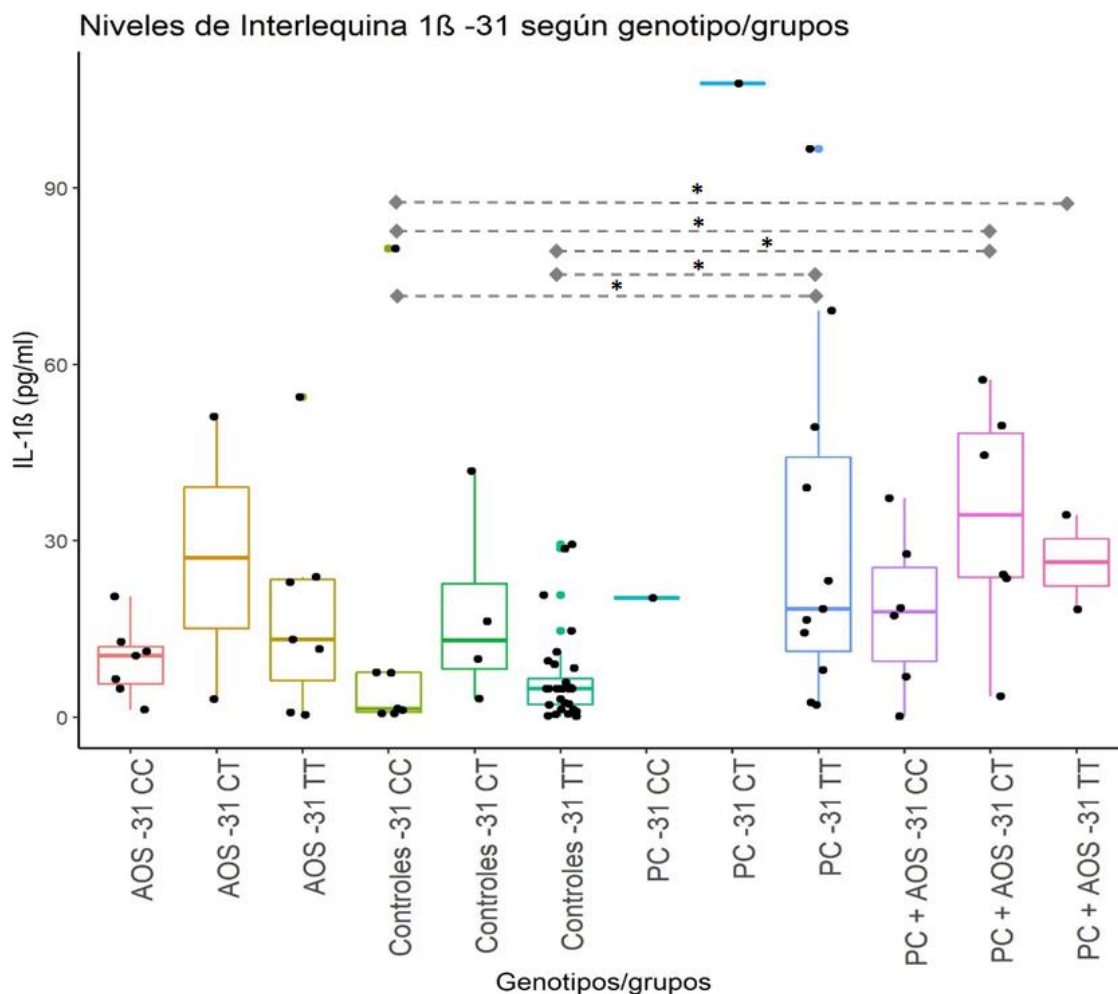


Comparando los niveles de proteína IL-1 β de cada fenotipo según el genotipo de IL-1 β c.-511 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p= 2.2e-16$). Se observaron diferencias entre individuos homocigotos CC del grupo control y con PC ($p=0.039$), controles TT y PC CC ($p= 0.049$), controles CC y PC TC ($p= 0.041$), controles TT y periodontitis crónica TC ($p= 0.036$), controles CC y sujetos con PC y AOS TT ($p= 0.011$), controles TT e individuos con PC y AOS TT ($p=0.013$) (figura 13).

Figura 13. Niveles de IL-1 β c.-511 según genotipo y fenotipo en individuos casos



Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de proteína IL-1 β de los distintos fenotipos según genotipo IL-1 β c.-31 ($p= 2.2e-16$). Se observaron diferencias entre individuos controles CC y casos con PC TT ($p= 0.022$), controles TT y PC TT ($p= 0.0022$), controles CC y sujetos con PC más con AOS CT ($p= 0.010$), controles TT y sujetos con PC más con AOS CT ($p= 0.001$), controles CC e individuos con PC más AOS TT ($p= 0.013$) (figura 14).

Figura 14. Niveles de IL-1 β c.-31 según genotipo y fenotipo en individuos casos

4.4 Frecuencias alélicas y genotípicas en IL-1 β c.G4654A

Se ha identificado una nueva variante de nucleótido único en la localización chr2:112837128 corriente arriba en el extremo 5' del gen IL-1 β , el cual consiste en una transición G>A en el transcrito NG_008851.1 en sentido 3'-5' o C>T en el transcrito GRCh38.p13 (NC_000002.12) en sentido 5'-3'.

Las frecuencias alélicas de IL-1 β c.G4654A se mantuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). En adición, presentaron diferencias estadísticamente significativas

entre el grupo de casos y controles ($p=0.02$), donde el alelo A presentó un efecto protector ($OR: 0.31 (0.11-0.82)$). El alelo IL-1 β c.4654A se observó en un 15% de los casos (tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias alélicas en IL-1 β c.G4654A

Gen	Total sujetos		Casos		Controles		p-valor ⁺	OR (IC 95%)
	n	%	n	%	n	%		
IL1B 4654 G/A	108							
G	194	90	88	85	106	95	0.02714*	1.00
A	22	10	16	15	6	5		
Equilibrio HW			0.58		1			
IL1B -511 C/T rs16944	98							
C	110	56	45	44	65	69	0.00071*	1.00
T	86	44	57	56	29	31		
Equilibrio HW			<0.0001		<0.0001			
IL1B -31 T/C rs1143627	102							
T	137	67	60	57	77	79	0.00142*	1.00
C	67	33	46	43	21	21		
Equilibrio HW			0.00078		<0.0001			

⁺Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates ($X^2= 4.8819, gl= 1; X^2= 11.451, gl= 1; X^2= 10.168, gl= 1$)

*p-valor <0.05

Dada esta asociación, se realizó un análisis comparativo entre los subgrupos de casos y controles, donde el efecto protector del alelo IL-1 β c.4654A se observó en el subgrupo de individuos con periodontitis crónica ($p=0.02, OR 0.22 (0.06-0.7)$), además, se obtuvo una tendencia a la significancia del efecto protector de este alelo en sujetos con PC más AOS ($p= 0.05, OR (0.29 (0.09-0.94))$) (tabla 13). El alelo protector fue más frecuente en sujetos con PC (20%) y en individuos con PC más AOS (16%) (tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias alélicas en IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos

Gen	Total sujetos		Casos				Controles			
			PC		AOS		PC + AOS			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IL1B c.4654 G/A	108									
G	194	90	24	80	27	90	37	84	106	95
A	22	10	6	20	3	10	7	16	6	5
IL1B -511 C/T rs16944	98									
C	110	56	19	68	12	40	14	32	65	69
T	86	44	9	32	18	60	30	68	29	31
IL1B -31 T/C rs1143627	102									
T	137	67	25	83	16	50	19	43	77	79
C	67	33	5	17	16	50	25	57	21	21

Tabla 13. Comparación Intergrupo de frecuencias alélicas IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos

Subgrupos de casos	Controles	OR	IC 95%
IL1B G4654A PC	0.028**	0.22	0.06-0.7
IL1B G4654A AOS	0.399°	0.5	0.11-2.1
IL1B G4654A PC + AOS	0.05°	0.29	0.09-0.94

*Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates

°Test exacto de Fisher

*p-valor <0.05

La distribución de genotipos provenientes de los alelos IL-1 β c.4654G y IL-1 β c.4654A fue estadísticamente diferente entre casos y controles ($p= 0.01$). La frecuencia de individuos con una copia del SNV IL-1 β c.4654A en su genotipo fue del 31% en sujetos casos. El genotipo más frecuente en el grupo de casos y controles fue el homocigoto *wildtype* en un 69 y 89%, respectivamente (tabla 14).

Al comparar cada subgrupo de casos con los controles se evidenció diferencia estadísticamente significativa en la distribución de genotipos en sujetos con PC ($p= 0.02$), donde la presencia de al menos una copia del alelo IL-1 β c.4654A presentaba un efecto protector ($OR 0.18 (0.04-0.68)$). De igual forma, se observó una tendencia a la significancia de la frecuencia genotípica de este SNV en el subgrupo de individuos con PC más AOS con un efecto protector ($p= 0.055$, $OR 0.25 (0.07-0.88)$) (tabla 16). El genotipo heterocigoto GA presentó mayor frecuencia en sujetos con PC (tabla 15).

Tabla 14. Frecuencias genotípicas en IL-1 β c.G4654A

<i>Gen</i>	<i>Total sujetos</i>		<i>Casos</i>		<i>Controles</i>		<i>p-valor</i>
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
IL1B c.4654 G/A	108						
GG	86	80	36	69	50	89	0.0156 ^{o*}
GA	22	20	16	31	6	11	
AA	0	0	0	0	0	0	
IL1B -511 C/T rs16944	98						
TT	35	36	24	47	11	23	0.0234 ⁺
TC	16	16	9	18	7	15	
CC	47	48	18	35	29	62	
IL1B -31 T/C rs1143627	102						
CC	24	24	16	30	8	16	0.0080 ⁺
CT	19	19	14	26	5	10	
TT	59	58	23	43	36	73	

⁺Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates ($X^2= 7.5023$, $gl= 2$; $X^2= 9.6522$, $gl= 2$)

^oTest exacto de Fisher

* p -valor <0.05

Tabla 15. Frecuencias genotípicas en IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos

<i>Gen</i>	<i>Total sujetos</i>		<i>Casos</i>						<i>Controles</i>		
			<i>PC</i>		<i>AOS</i>		<i>PC + AOS</i>				
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
IL1B c.4654											
G/A	108										
GG	86	80	9	60	12	80	15	68	50	89	
GA	22	20	6	40	3	20	7	32	6	11	
AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
IL1B -511											
C/T rs16944	98										
TT	35	36	4	29	8	53	12	55	11	23	
TC	16	16	1	7	2	13	6	27	7	15	
CC	47	48	9	64	5	34	4	18	29	62	
IL1B -31 T/C											
rs1143627	102										
CC	24	23	1	7	7	44	8	36	8	16	
CT	19	19	3	20	2	12	9	41	5	10	
TT	59	58	11	73	7	44	5	23	36	73	

Tabla 16. Comparación Intergrupo de frecuencias genotípicas IL-1 β c.G4654A según discriminación de casos

<i>Subgrupos de casos</i>	<i>Controles</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>
IL1B G4654A PC	0.021 ⁺ *	0.18	0.04-0.68
IL1B G4654A AOS	0.387 [°]	0.48	0.10-2.2
IL1B G4654A PC + AOS	0.055 ⁺ *	0.25	0.07-0.88

⁺ Test χ^2 con corrección de continuidad de Yates

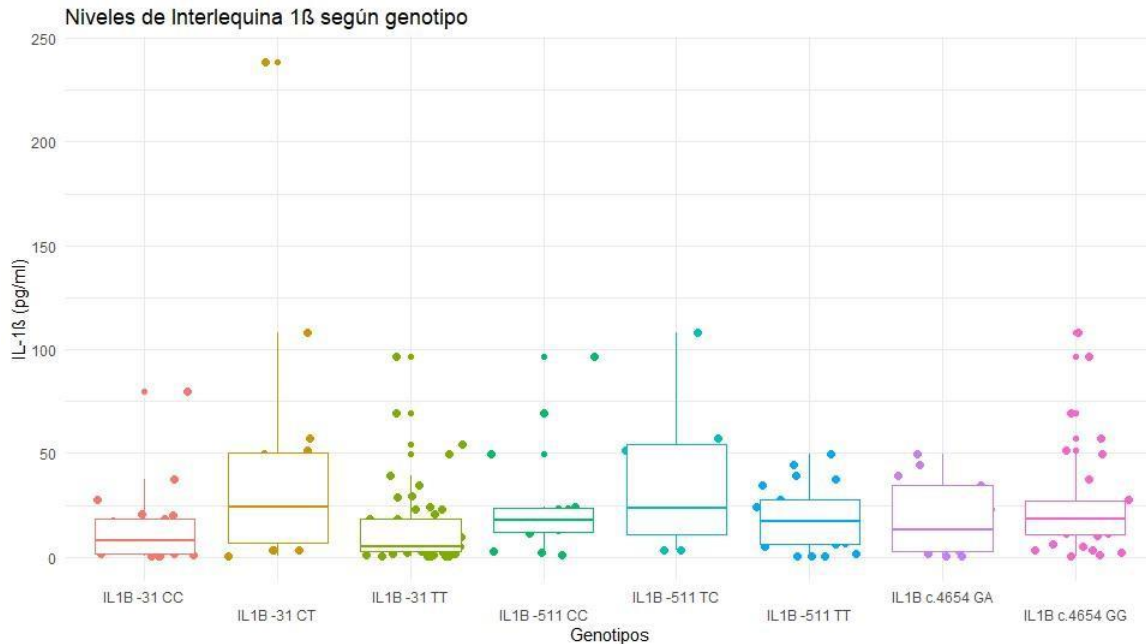
[°] Test exacto de Fisher

*p-valor <0.05

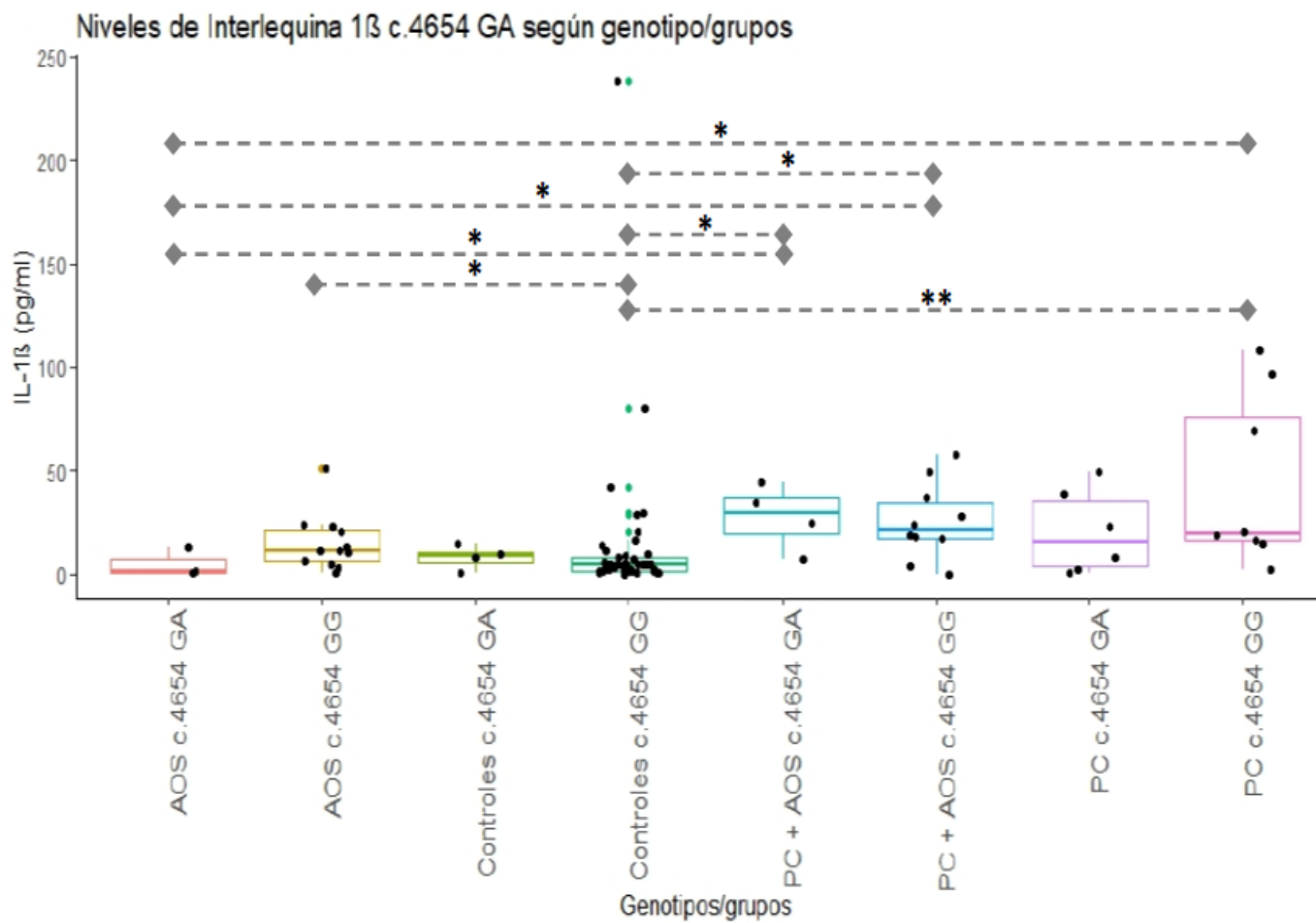
4.5 Niveles de proteínas IL-1 β c.G4654A según genotipo y fenotipo

Al comparar los niveles de proteína IL-1 β entre los individuos teniendo en cuenta los genotipos conformados por los alelos G y A, se observó una amplia distribución y mayor mediana de estos niveles en el genotipo homocigoto *wildtype* (figura 15).

Figura 15. Niveles de IL-1 β c.G4654A según genotipo en individuos casos



Comparando los niveles de proteína IL-1 β de cada fenotipo según el genotipo IL1B c.4654G>A se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p= 2.2e-16$). Este hallazgo estadístico con valor de significancia ajustado se obtuvo entre los niveles de proteína en individuos del grupo control con genotipo homocigoto GG y sujetos homocigotos GG con PC ($p= 0.04$). De igual forma, las siguientes comparaciones sin valores p ajustados fueron significativas: controles GG y AOS GG (p -valor 0.043), AOS GA e individuos con PC más AOS GA ($p= 0.027$), controles GG y PC más AOS GA ($p=0.012$), AOS GA y PC más AOS c.GG ($p= 0.035$), controles GG y PC más AOS GG ($p=0.0042$), AOS GA y PC GG ($p= 0.018$) (figura 16).

Figura 16. Niveles de IL-1 β c.G4654A según genotipo y fenotipo en individuos casos

5. Discusión

Tanto la enfermedad periodontal como la apnea obstructiva del sueño comparten una naturaleza inflamatoria subyacente, lo cual ha conllevado al surgimiento de hipótesis sobre una posible asociación entre ambas patologías. A pesar de ello, existe poca evidencia que explique esta probable asociación. Los mecanismos fisiopatológicos, relación causa-efecto, o dosis-respuesta aún no han sido elucidados(132). Al-Jewair y Cols (2015), Tremblay y Cols (2017), y Lembo D y Cols (2021), recopilaron la evidencia científica disponible sobre la asociación de estas entidades patológicas para realizar una revisión sistemática y un metaanálisis, concluyendo que eran necesarios más estudios de casos y controles acerca de este tópico para clarificar la relación entre periodontitis crónica y apnea obstructiva del sueño(7,15). Hasta la fecha, no existen investigaciones reportadas sobre los mecanismos moleculares convergentes que subyacen el proceso fisiopatológico en individuos con presencia de ambas patologías y mucho menos, no son conocidas las causas genéticas implicadas en la desregulación de vías moleculares que puedan conllevar al desarrollo de estos fenotipos inflamatorios de forma concomitante. Por esta razón, el objetivo de la presente investigación fue determinar variantes de nucleótido único en la región promotora de los genes IL-1 β c.-511C>T, c.-31T>C; TNF- α c.-308G>A; IL-6 c.-572G>C, c.-174C>G, y evaluar su expresión a través de la medición de los niveles de estas citoquinas proinflamatorias en saliva en los fenotipos de apnea obstructiva del sueño y periodontitis crónica para establecer un posible vínculo fenotipo-genotipo.

En la presente investigación, se obtuvo que la distribución de los alelos IL-1 β c.-511T y IL-1 β c.-31C difirió entre ambos grupos de estudios (p-valor <0.05). El SNV IL-1 β c.-511T fue más frecuente en casos (56%) que en controles (31%), específicamente en el subgrupo de individuos con periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño (68%). Lo cual es

concordante con lo reportado por Kornman y Cols, quienes por primera vez en 1997 reportaron la relación entre el SNV rs16944 y la susceptibilidad a periodontitis crónica en individuos con ascendencia europea(22). En adición, el presente hallazgo es coincidente con lo obtenido por Trevilatto P. y Cols (2011), quien reportó una mayor prevalencia del alelo T en sujetos brasileros con periodontitis crónica (52%), y diferencias significativas entre un subgrupo de casos afroamericanos y mulatos (84%) y el grupo control. A pesar de ello, no existió asociación significativa de este SNV con el fenotipo estudiado al evaluar la totalidad de los sujetos de estudio(133). Huang HY y Cols (2004) reportaron un incremento significativo de la frecuencia de este SNV en pacientes con periodontitis crónica severa respecto a sujetos sanos periodontalmente(134).

El genotipo homocigoto IL-1 β c.-511TT y heterocigoto presentaron mayor frecuencia en sujetos casos en un 47 y 18%, respectivamente. La prevalencia fue mayor en sujetos diagnosticados con periodontitis crónica más apnea obstruktiva del sueño (55%). Este hallazgo es consistente con las frecuencias genotípicas de algunos estudios en otras poblaciones, tal como en China, donde se reportó una mayor frecuencia del genotipo TT en una muestra de individuos con periodontitis crónica (37%)(134).

El SNV IL-1 β c.-511C>T incrementa el riesgo de desarrollar periodontitis crónica y apnea obstruktiva del sueño de forma simultánea (p-valor 0.000079, OR 4.8 (2.2 -10.3)), y la presencia de dos alelos duplica el riesgo en aproximadamente ocho veces más (p-valor 0.0002, OR 7.9 (2.09-29.8)), siendo consistente con lo reportado por Trevilatto P. y Cols (2011), quienes sugirieron la variante rs16944 como un indicador de riesgo para periodontitis crónica en brasileros (OR 18 (1.37 -2350.69))(133). Huang HY y Cols (2004), reportaron que este alelo se comportaba como de riesgo para periodontitis crónica en una muestra de individuos de Sichuan, China (OR 2.48 (1.71 -3.59))(134). En contraste, Tanaka K y Cols (2014) reportaron que mujeres japonesas con genotipo heterocigoto presentaban una significativa reducción en el riesgo de desarrollar PC (OR 0.82 (0.41–1.66)), mientras que el genotipo homocigoto no fue frecuente(135). Schulz y Cols (2011), evaluaron individuos caucásicos con PC en Alemania y no evidenciaron relación con la

variante rs1694(136). Ribeiro y Cols (2016) analizaron cuarenta y cinco individuos en Brasil, reportando que el genotipo homocigoto TT presentaba un efecto protector (OR 0.85 (0.24–3.06)) y una copia de este alelo podría comportarse como de riesgo (OR 1.38 (0.50–3.80))(137). Domínguez-Pérez RA y Cols (2017), en una muestra de 280 mexicanos (80 sujetos con PC) reportaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución del SNV rs16944 en estado heterocigoto entre el grupo de sujetos con periodontitis crónica y controles, disminuyendo el riesgo de padecer este fenotipo (OR 0.24 (0.10 -0.55))(138).

Revisiones sistemáticas y metaanálisis sobre IL1B c.-511C>T (rs16944) y periodontitis crónica, reportan que el desarrollo de PC no se asocia con esta variante, excepto en población caucásica, donde una significancia estadística débil (insuficiente poder estadístico) en un modelo recesivo fue detectada (p -valor 0.037)(139). Por otro lado, Wang HF y Cols (2017), indicaron que este alelo podría ser un indicador genético de alto riesgo para susceptibilidad de periodontitis crónica en población china (OR 1.48 (1.19–1.85))(111). Liu X y Cols (2022), concluyeron que IL-1 β c.-511C>T presentó una fuerte asociación con el riesgo de periodontitis, y que este gen es un notable biomarcador en el riesgo de esta patología(140).

Basados en que otras variantes en IL-1 β en el loci 154, 468, -3954 han sido asociadas con contribuir en la incidencia de AOS, posiblemente alterando la expresión de la proteína IL-1 β y aumentando su síntesis(18,141), y que los SNVs IL1B c.-511C>T y c.-31T>C han sido estudiados y relacionados en enfermedad periodontal crónica y agresiva, este es el primer estudio que indagó la relación de estos alelos y el riesgo de susceptibilidad con apnea obstructiva del sueño, evidenciando una relación estadísticamente significativa (p -valor 0.008 y 0.004, respectivamente) y un incremento de 3 veces el riesgo de susceptibilidad de desarrollar este fenotipo ante la presencia de los alelos IL1B c.-511T y c.-31C (OR 3.36 (1.4–7.8), OR 3.6 (1.5-8.5), respectivamente).

El SNV IL-1 β c.-31C fue más frecuente en sujetos casos (43%) que en controles (21%) con diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (p -valor 0.001). Siendo más prevalente en individuos con fenotipo de periodontitis crónica más apnea obstructiva

del sueño (57%), seguido de sujetos con apnea obstructiva del sueño (50%). El genotipo homocigoto c.-31CC (30%) y heterocigoto (26%) fueron más frecuentes en casos que en controles (p -valor 0.008), específicamente en mayor número de sujetos con PC más AOS. En concordancia con lo reportado por Majumder P. y Cols (2019), quienes en su estudio de casos y controles analizaron 357 sujetos en India, obteniendo en un 48%, la mayor distribución alélica en sujetos con periodontitis crónica. Sin embargo, el genotipo CC y CT fue mayor en controles, 40.5 y 49%, respectivamente(142). En contraste, Komatsu y Cols (2008), no reportaron diferencias estadísticamente significativas del alelo c.-31C entre sujetos japoneses con PC y controles, a pesar de ello, este SNV estuvo presente en 47% de los casos(143). En esta misma tendencia, Kobayashi T y Cols (2009), obtuvieron una mayor prevalencia del alelo C en sujetos controles (51.9%). Sin embargo, el genotipo homocigoto CC fue más prevalente en individuos con periodontitis crónica y otra patología inflamatoria sistémica, y el genotipo CT mayor en sujetos con PC (50.8%)(144).

La variante IL-1 β c.-31T>C incrementa aproximadamente 5 veces el riesgo de desarrollar periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño (p -valor 0.00007, *OR* 4.8 (2.2 -10.4)), mientras que su estado homocigoto adiciona un mayor riesgo, siendo este de 7 veces mayor susceptibilidad (p -valor 0.0001, *OR* 7.2 (1.8 -27.9)). Estos hallazgos corresponden con los estudios realizados por Kobayashi T y Cols (2009)(66), Shete y Cols (2010)(145) y Amirisetty y Cols (2014)(146), en sus estudios realizados en Japón, sur y norte de la India, quienes reportaron un incremento del riesgo de periodontitis crónica conferido por el alelo C (*OR* 1.13 (0.78-1.64); *OR* 1.12 (0.64-1.92); *OR* 1.18 (0.57-2.46)). Por el contrario, Komatsu y Cols (2008), reportaron un efecto protector (*OR* 0.9 (0.62-1.31))(143). Huang W. y Cols (2017), Brodzikowska A. y Cols (2019) realizaron un metaanálisis donde evaluaban el rs1143627 y la susceptibilidad a PC, concluyendo que tal relación no estaba dada en la evidencia analizada; pero no era determinante debido que eran necesarios mayores estudios poblacionales con diversidad étnica(147,148). Es importante destacar que la mayoría de los anteriores estudios contrastados no obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas, lo cual evidencia que realmente no tuvieron suficiente poder estadístico de rechazar la hipótesis nula de no asociación de esta variante y periodontitis crónica.

A pesar de que el SNV TNF- α c.-308G>A ha sido asociado con incrementar el riesgo de desarrollo de periodontitis crónica(149) y apnea obstructiva del sueño(150), en el presente estudio el alelo A presentó una baja distribución en sujetos casos (11%), siendo mayor el alelo G (89%), por lo cual el efecto del SNV fue protector (*OR* 0.53 (0.18-1.55)), sin valor estadístico de significancia entre casos y controles (*p*-valor 0.3632). A pesar de ello, este resultado es congruente con otro hallazgo reportado en Latinoamérica, Becerra-Ruiz JS y Cols (2021) analizaron la variante TNF- α c.-308 en 171 sujetos mexicanos con gingivitis, de igual forma el alelo G fue mayor en individuos casos (72.7%) y el alelo A se comportó como protector (*p*-valor 0.02, *OR* 0.5 (0.27-0.90)). La gingivitis es la patología base que puede progresar a periodontitis crónica, y su fisiopatología es netamente inflamatoria(151), por ello es equiparable su comparación. Azab E y Cols (2022), no obtuvieron correlación entre esta variante y susceptibilidad a periodontitis crónica(152).

Acorde al metaanálisis realizado por Shi LX y Cols (2020) sobre TNF- α c.-308G>A y periodontitis crónica, la mayoría de los estudios han sido realizados en población caucásica y asiática, y muy pocos en población latina, especialmente en México y Brasil, concluyendo que TNF- α rs1800629 no presentaba un efecto de riesgo en caucásicos, pero si se asociaba a PC en individuos asiáticos(153). En relación con los estudios realizados en Latinoamérica; Trombone AP y Cols (2009)(154), Moreira PR y Cols (2009)(155), Menezes NG y Cols (2008)(156), realizados en población brasilera, y Domínguez-Pérez RA y Cols (2017)(138) en México, reportaron mayor prevalencia del alelo G en periodontitis crónica y no asociación estadística con el grupo de casos. Respecto a metaanálisis en TNF- α c.-308G>A y apnea obstructiva del sueño, los estudios han sido realizados en población europea y asiática. Huang J y Cols (2012), reportaron que individuos con el alelo A presentaban dos veces más riesgo de presentar AOS que sujetos controles homocigotos GG (*p*-valor 0.003 *OR* 2.0 (1.26-3.18))(157), similar a lo evidenciado por Wu Y y Cols (2014), donde el riesgo que aportaba el SNV en la susceptibilidad de AOS era de aproximadamente dos veces (*OR* 1.67 (1.43-1.95))(158).

Estos hallazgos demuestran que existe una variabilidad en las frecuencias alélicas y genotípicas entre distintos grupos poblacionales, y consigo diferencias en la direccionalidad del efecto en relación con periodontitis crónica y apnea obstructiva del

sueño, que en el caso de este estudio podemos hipotetizar que el SNV TNF- α c.-308G>A no se asocia con el desarrollo de estos fenotipos inflamatorios o simplemente presenta un efecto protector.

Biomarcadores salivares para periodontitis crónica podrían aportar en la valoración del riesgo o la presencia de esta misma. El análisis de marcadores inflamatorios en saliva, como las citoquinas, se basa en la idea de que este fluido biológico contiene altos niveles de citoquinas que puede implicar la presencia de periodontitis(159). De igual forma, los niveles de citoquinas influncian el estado de sueño; en la reducción y fragmentación del sueño se evidencia un aumento de diferentes marcadores inflamatorios(160). En niños y adultos con AOS, se ha observado un aumento de citoquinas proinflamatorias, que a su vez activan vías proinflamatorias a través del factor de transcripción nuclear NF κ B (161). Charles Tremblay (2016), reportó una posible asociación entre periodontitis y apnea obstructiva del sueño a través de marcadores inflamatorios en saliva y plasma(7). Sin embargo, la influencia de diferentes genotipos en los genes de interleuquinas respecto a la producción de citoquinas, no se encuentra completamente elucidado(26). En el presente estudio, se observó una mayor distribución y mediana de los niveles de proteínas en sujetos con genotipos TNF- α c.-308GG; IL-1 β c.-31TC y c.-511CT; IL-6 c.-572GG. Según la estratificación por fenotipo, se obtuvo que sujetos con periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño con el SNV en estado homocigoto IL-1 β c.-511TT, presentaron mayores niveles de citoquinas IL-1 β que aquellos sujetos controles con genotipo silvestre c.-511CC (p-valor 0.011). En adición, la presencia del alelo T en homocigosis puede ser uno de los factores predisponentes para desarrollar PC más AOS dentro de la multifactoriedad de estos fenotipos, se obtuvo que sujetos con estas patologías presentaron mayores niveles de proteína IL-1 β que aquellos sujetos controles con este mismo genotipo, lo cual da un indicio de susceptibilidad de sujetos controles de poder desarrollar estas entidades inflamatorias. Lacoviello L y Cols (2005) destacaron que variantes en la región promotora de este gen, tal como rs16944, están posiblemente asociadas a la regulación de los niveles de IL-1 β (162) . Estos hallazgos coinciden con los resultados de Chen H y Cols (2006) quienes reportaron que las mayores secreciones de IL-1 β fueron correlacionadas con el genotipo c.-511TT(163). Respecto a IL1B c.-31T>C,

obtuvimos que sujetos controles homocigotos TT presentaron niveles inferiores de proteína IL-1 β que sujetos heterocigotos con fenotipo de periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño (p-valor 0.001). Se destaca que la presencia del alelo C puede influenciar en el incremento de la susceptibilidad de desarrollar PC más AOS y periodontitis crónica de manera aislada, teniendo en cuenta que sujetos controles homocigotos TT presentaron una mayor distribución de los niveles de esta proteína que los controles CC, y que sujetos casos (PC, PC + AOS) con este mismo genotipo TT, y heterocigotos presentaron estas patologías, lo cual puede dar un indicio a su susceptibilidad. Hall SK y Cols (2004), reportaron que el alelo c.-511T y c-31C estuvieron significativamente asociados en aumentar la síntesis de proteína IL-1 β (164). En relación con la apnea obstructiva del sueño, no evidenciamos asociación con los niveles de proteína IL-1 β . De igual forma, Nizam y Cols en 2014 no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre sujetos con AOS y controles en la concentración de varias citoquinas, entre ellas IL-1 β (124).

En nuestro estudio, los niveles de proteína TNF- α presentaron diferencias significativas entre controles TNF- α c.-308GG y sujetos con PC + AOS c.-308GG, y controles c.-308GG con PC c.-308GG, esto fue debido a que los niveles de proteínas fueron más elevados y presentaron una mayor distribución en controles en comparación a los pocos casos detectados con presencia del SNV.

Dentro de los hallazgos de esta investigación fue identificada una nueva variante que no ha sido reportada en bases de datos genéticas poblacionales. Se localiza en chr2:112837128 corriente arriba en el extremo 5' del gen IL-1 β , la cual consiste en una transición G>A en el transcrito NG_008851.1 en sentido 3'-5' o C>T en el transcrito GRCh38.p13 (NC_000002.12) en sentido 5'-3'. La distribución alélica fue diferente entre casos y controles (p-valor 0.02), donde el alelo A se presentó en un 15% de los casos. En cuanto a la estimación de su efecto, se observó que se comportaba como protector (*OR* 0.31 (0.11 -0.82)), especialmente en el subgrupo de sujetos con periodontitis crónica (p-valor 0.028, *OR* 0.22 (0.06 -0.7)), presentándose este mismo efecto en individuos con periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño (*OR* 0.29 (0.09 -0.94)). Sin embargo, esta última relación presentó una tendencia a la significancia (p-valor 0.05). Se realizó un

análisis funcional de esta variante a través de su cuantificación de proteínas IL-1 β , y se observó que no hubo diferencias entre sujetos controles homocigotos silvestres y sujetos controles con la presencia de un alelo A. De igual forma entre individuos controles GA y heterocigotos con AOS, PC y PC + AOS, lo cual nos indicaría que ante la presencia de este alelo no se incrementan significativamente los niveles de esta citoquina, y por ende la susceptibilidad a presentar estas patologías inflamatorias es escasa.

Las limitaciones del presente estudio se centran en los pocos datos obtenidos de la genotipificación de los marcadores IL-6 c.-174C>G (rs1800795) y c.-572G>C (rs1800796), debido a dificultades en la interpretación de los cromatogramas de las secuencias Sanger dado por el solapamiento de las señales en una misma posición, lo cual sucedió por el deslizamiento de la DNA polimerasa en secuencias repetitivas de gran extensión(165), propias de la secuencia del fragmento a analizar en este gen. En adición, se obtuvieron pocos datos de cuantificación de esta citoquina en saliva. Por otro lado, los SNVs IL-1 β rs16944 y rs1143627 en controles no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se dispone de datos sobre la distribución étnica y demográfica de los participantes que pueda explicar este fenómeno, sin embargo se puede atribuir una cierta influencia del porcentaje de heterocigotos y del tamaño muestral. Se recomiendan más estudios en diferentes poblaciones con un tamaño muestral mayor, que permitan confirmar estas asociaciones y aquellas asociaciones estadísticas que estuvieron próximas a ser significativas.

La evidencia sobre mediadores inflamatorios que desempeñan un rol en la patogénesis de apnea obstructiva del sueño y periodontitis crónica, y el hecho que comparten factores de riesgo, sugiere una posible asociación entre ellas que se ha hipotetizado ser bidireccional(15). Basados en los presentes resultados con una perspectiva genética-molecular, la presencia de los SNVs IL-1 β c.-511T y c.-31C podría aumentar la susceptibilidad de aparición de una de estas patologías como punto de partida para aumentar los niveles de citoquinas proinflamatorias y por ende incrementar el riesgo de desarrollo de la segunda patología, es necesario un estudio de tipo longitudinal para

conocer cual patología tendría mayores probabilidades de aparecer primero y condicionar a la otra. Además de conocer el rol de la interlequina(IL)- 1 β en la posible asociación de EP y AOS, esta citoquina podría ser un potencial *target* terapéutico contra estas patologías inflamatorias(166).

6. Conclusión

Las variantes en la región promotora de IL-1 β c.-511T (rs16944) y c.-31C (rs1143627) se han asociado al riesgo de periodontitis crónica más apnea obstructiva del sueño, y rs1143627 con apnea obstructiva mediante el incremento de la proteína proinflamatoria IL-1 β . En contraste, la nueva variante identificada IL-1 β c.G4654A ha presentado un efecto protector ante estas enfermedades.

7. Recomendaciones

Son necesarios más estudios en diferentes poblaciones con un tamaño muestral mayor, que permitan confirmar las asociaciones obtenidas y aquellas asociaciones estadísticas que estuvieron próximas a ser significativas. De igual forma es relevante la realización de un estudio de tipo longitudinal para conocer cual enfermedad tendría mayores probabilidades de aparecer primero y condicionar a la otra.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado



Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Odontología

CONSENTIMIENTO INFORMADO ADULTOS

TÍTULO DEL PROYECTO: Caracterización de la Microbiota oral asociada a Apnea Obstructiva del Sueño en pacientes con periodontitis

INVESTIGADORES: Juliana Velosa, Catalina Latorre, Francina Escobar, Mayra Téllez, Patricia Hidalgo, Liliana Otero.

FECHA: _____

Usted está siendo invitado a participar en el proyecto de investigación titulado: **Caracterización de la Microbiota oral asociada a apnea obstructiva del sueño en pacientes con periodontitis**. Si usted decide participar en este estudio, por favor firme este consentimiento informado. Su firma quiere decir que se la ha explicado y ha entendido en qué consiste su participación en el estudio y sus posibles riesgos, incomodidades o molestias.

Esta investigación, se realizará en la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, y está aprobada por el Centro de Investigaciones Odontológicas y por el comité de ética en investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

Es importante que usted sepa este procedimiento representa un riesgo mínimo para su salud, según resolución 008430 de 1993, del ministerio de salud. Usted recibirá las indicaciones pertinentes que lo orientarán en el manejo de la enfermedad periodontal.

El objetivo de este estudio es Identificar si existen factores microbiológicos relacionados con el desarrollo de su enfermedad periodontal y de la apnea del sueño.

El estudio en el que está siendo invitado a participar consiste en: 1. tomar una muestra de su saliva recolectada con enjuagues bucales. 2. Tomar una muestra del líquido presente en las bolsas periodontales presentes en sus dientes. 3. Tomar una muestra de la placa bacteriana adherida a sus dientes.

Su muestra de saliva obtenida del procedimiento será procesada para determinar los microorganismos presentes en su saliva. El excedente de la muestra de saliva será almacenado solamente si es necesario corregir o ampliar los resultados de este estudio.

Las muestras de saliva, bolsa periodontal y placa de la lengua serán utilizadas para determinar los microorganismos presentes en su cavidad oral y después serán desechadas.

Usted puede decidir no participar en la investigación si no lo desea o retirarse en cualquier momento y esta decisión no perjudicará la relación con el odontólogo o médico tratante, quien continuará con el tratamiento pertinente. No habrá ningún costo adicional para usted por participar en el estudio y no interrumpirá con su atención en salud usual.

Los datos de este estudio serán publicados en congresos académicos en medicina del sueño, periodoncia y microbiología y revistas científicas especializadas en Periodoncia y

66 Genotipificación de SNVs de la región promotora de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α asociados a respuesta inflamatoria en los fenotipos de Apnea Obstructiva del Sueño y Enfermedad Periodontal

Medicina del sueño. La información publicada no incluirá su nombre o cualquier otra forma de identificación. Su historia clínica podrá ser consultada por el investigador para el estudio.

La información obtenida en este estudio, podrá ayudar en un futuro a buscar herramientas que detecten tempranamente la enfermedad periodontal y la apnea del sueño, o para diseñar formas de prevención de estas patologías.

Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio dirigiéndose a los investigadores: Patricia Hidalgo Martínez (phidalgo@husi.org.co), Mayra Téllez Corral (tellezm@javeriana.edu.co), al teléfono 3208320 en las extensiones 2899, a la secretaria técnica del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana: Dra. Maddy Ruiz, tel: 3004004387. maddy.ruiz@javeriana.edu.co, a la secretaria a la secretaria técnica del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana: María Margarita Manrique Andrade mmmanrique@husi.org.co, a la secretaria administrativa del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana: meafricano@husi.org.co o al Decano de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana: ciei@husi.org.co

Yo _____ identificado con ___ número _____ declaro que:

**Me han dado una copia de este consentimiento informado.
Me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas sobre la investigación y estas han sido respondidas.
He entendido perfectamente cuáles son los procedimientos que me van a ser practicados durante la investigación y estoy de acuerdo con someterme a ellos.
Estoy de acuerdo con participar en el estudio.
Autorizo que los resultados obtenidos del presente estudio sean publicados.**

DATOS DEL PARTICIPANTE

Nombre _____ C.C No. _____
Teléfono: _____ Firma _____

DATOS DE LOS TESTIGOS

Nombre _____ C.C No. _____
Teléfono: _____ Firma _____
Parentesco con el paciente: _____
Nombre _____ C.C No. _____
Teléfono: _____ Firma _____

Parentesco con el paciente: _____

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Nombre: _____ C.C No.:. _____

Telefono: _____ Firma _____

Juliana Velosa: juliana.velosa@javeriana.edu.co

Catalina Latorre: 1atorre.cata1ina@gmail.com

Francina Escobar: francinaescobar@yahoo.es

Mayra Tellez: tellezm@javeriana.edu.co

Liliana Otero: lotero@javeriana.edu.co

Patricia Hidalgo: phidalgo@husi.org.co

Bibliografía

1. De Pablo P, Chapple ILC, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(4):218–24.
2. Vos T, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211–59.
3. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(2):72.
4. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Blackwell; 2003.
5. Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB IV [Internet]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf>
6. Gunaratnam K, Taylor B, Curtis B, Cistulli P. Obstructive sleep apnoea and periodontitis: a novel association? *Sleep Breath*. 2009;13(3):233–9.
7. Tremblay C, Beaudry P, Bissonnette C, Gauthier CA, Girard S, Milot MP, et al. Periodontitis and obstructive sleep apnea: A literature review. *J Dent Sleep Med*. 2017;4:103–10.
8. Medicine AA of S. International classification of sleep disorders. *Diagnostic coding Man*. 2005;51–5.
9. AIDabal L, BaHammam AS. Metabolic, endocrine, and immune consequences of sleep deprivation. *Open Respir Med J*. 2011;5:31.
10. Goel N, Rao H, Durmer JS, Dinges DF. Neurocognitive consequences of sleep deprivation. In: *Seminars in neurology*. © Thieme Medical Publishers; 2009. p. 320–39.
11. Besedovsky L, Lange T, Born J. Sleep and immune function. *Pflügers Arch J*

- Physiol. 2012;463(1):121–37.
12. Lal C, Strange C, Bachman D. Neurocognitive impairment in obstructive sleep apnea. *Chest*. 2012;141(6):1601–10.
 13. Guilleminault C, Abad VC. Obstructive sleep apnea. *Curr Treat Options Neurol*. 2004;6(4):309–17.
 14. Otero L, del Carmen Figueredo M, Riveros-Rivera A, Hidalgo P. Cognitive impairment and obstructive sleep apnea. In: *Updates in Sleep Neurology and Obstructive Sleep Apnea*. IntechOpen; 2019.
 15. Al-Jewair TS, Al-Jasser R, Almas K. Periodontitis and obstructive sleep apnea's bidirectional relationship: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath*. 2015;19(4):1111–20.
 16. Latorre C, Escobar F, Velosa J, Rubiano D, Hidalgo-Martinez P, Otero L. Association between obstructive sleep apnea and comorbidities with periodontal disease in adults. *J Indian Soc Periodontol*. 2018;22(3):215.
 17. Seo WH, Cho ER, Thomas RJ, An S, Ryu JJ, Kim H, et al. The association between periodontitis and obstructive sleep apnea: a preliminary study. *J Periodontal Res*. 2013;48(4):500–6.
 18. Popko K, Gorska E, Potapinska O, Wasik M, Stoklosa A, Plywaczewski R, et al. Frequency of distribution of inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF-alpha gene polymorphism in patients with obstructive sleep apnea. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(Suppl 6):607–14.
 19. Zhang Z, Wang Q, Chen B, Wang Y, Miao Y, Han L. Association study of genetic variations of inflammatory biomarkers with susceptibility and severity of obstructive sleep apnea. *Mol Genet genomic Med*. 2019;7(8):e801.
 20. Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ. Evolution of interleukin-1 β . *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(6):483–502.
 21. Jingjin L, Zemin G, Xin M, Donghong W, Jianhua G, Jie Y, et al. Correlation between an interleukin-6-572C/G polymorphism and chronic periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010;30(3):301.
 22. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):327–38.
 23. Owens RL, Eckert DJ, Yeh SY, Malhotra A. Upper airway function in the

- pathogenesis of obstructive sleep apnea: a review of the current literature. *Curr Opin Pulm Med*. 2008;14(6):519.
24. Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*. 2003 Jun;30(6):524–31.
 25. Wu X, Offenbacher S, López NJ, Chen D, Wang H, Rogus J, et al. Association of interleukin-1 gene variations with moderate to severe chronic periodontitis in multiple ethnicities. *J Periodontal Res*. 2015;50(1):52–61.
 26. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(9):754–67.
 27. Monguí AC, Pastrana MCM, Quiroga GMS, Torres MH, Uriza CL, Arregocés FE, et al. Condición periodontal de pacientes con apnea obstructiva del sueño/Periodontal Status of Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Univ Odontológica*. 2016;35(74):141–58.
 28. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503–8.
 29. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27.
 30. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1–14.
 31. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21(1):335–76.
 32. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):55–72.
 33. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6325):355–6.
 34. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood, J Am Soc Hematol*. 2011;117(14):3720–32.
 35. Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol*. 1986;124(2):179.
 36. Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology*. 2009;214(7):543–53.

37. Kominato Y, Galson D, Waterman WR, Webb AC, Auron PE. Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU. 1. *Mol Cell Biol.* 1995;15(1):59–68.
38. Adamik J, Wang KZQ, Unlu S, Su A-JA, Tannahill GM, Galson DL, et al. Distinct mechanisms for induction and tolerance regulate the immediate early genes encoding interleukin 1 β and tumor necrosis factor α . *PLoS One.* 2013;8(8):e70622.
39. Hagemeyer C, Bannister AJ, Cook A, Kouzarides T. The activation domain of transcription factor PU. 1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(4):1580–4.
40. Pulugulla SH, Packard TA, Galloway NLK, Grimmatt ZW, Doitsh G, Adamik J, et al. Distinct mechanisms regulate IL1B gene transcription in lymphoid CD4 T cells and monocytes. *Cytokine.* 2018;111:373–81.
41. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519–50.
42. Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(6):480–99.
43. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. 1996;
44. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 2010;3(105):cm1–cm1.
45. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular Cloning and Characterization of a Second Subunit of the Interleukin 1 Receptor Complex*. *J Biol Chem.* 1995;270(23):13757–65.
46. Brikos C, Wait R, Begum S, O'Neill LAJ, Saklatvala J. Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(9):1551–9.
47. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(8):5567–72.
48. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, et al. Sequential

- control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol.* 2008;9(6):684–91.
49. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel D V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature.* 1996;383(6599):443–6.
 50. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37–40.
 51. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3172–84.
 52. Ahn Y-H, Yang Y, Gibbons DL, Creighton CJ, Yang F, Wistuba II, et al. Map2k4 functions as a tumor suppressor in lung adenocarcinoma and inhibits tumor cell invasion by decreasing peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 expression. *Mol Cell Biol.* 2011;31(21):4270–85.
 53. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
 54. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011;30(1):16–34.
 55. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104–7.
 56. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol.* 2009;28:367–88.
 57. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990;10(5):2327–34.
 58. Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev.* 1992;127:25–50.
 59. Costa-Pereira AP. Regulation of IL-6-type cytokine responses by MAPKs. Portland Press Ltd.; 2014.
 60. Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, Nishida K, Kaneko Y, Miyata T, et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3-and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity.* 2000;12(1):95–105.
 61. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;1–38.
 62. Moutabarrik A, Nakanishi I, Ishibashi M. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells. *Scand J Immunol.*

- 1994;40(2):181–6.
63. Oberg H-H, Wesch D, Grüssel S, Rose-John S, Kabelitz D. Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4⁺ CD25⁻ and CD25^{high} regulatory T cells. *Int Immunol*. 2006;18(4):555–63.
 64. Su H, Lei C-T, Zhang C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Front Immunol*. 2017;8:405.
 65. Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med*. 1989;170(4):1409–14.
 66. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, et al. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 2002;196(7):979–90.
 67. Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*. 2006;195(4):173–83.
 68. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic-and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8549–57.
 69. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res*. 2016;1863(6):1218–27.
 70. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*. 1992;4(2):96–100.
 71. Lamas JR, Rodríguez-Rodríguez L, Tornero-Esteban P, Villafuertes E, Hoyas J, Abasolo L, et al. Alternative splicing and proteolytic rupture contribute to the generation of soluble IL-6 receptors (sIL-6R) in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2013;61(3):720–3.
 72. Dimitrov S, Lange T, Benedict C, Nowell MA, Jones SA, Scheller J, et al. Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J*. 2006;20(12):2174–6.
 73. Chalaris A, Gewiese J, Paliga K, Fleig L, Schneede A, Krieger K, et al. ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by γ -secretase. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res*. 2010;1803(2):234–45.
 74. Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, et al.

- Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem.* 2003;278(40):38829–39.
75. Schumacher N, Meyer D, Mauermann A, von der Heyde J, Wolf J, Schwarz J, et al. Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) proteases while a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles. *J Biol Chem.* 2015;290(43):26059–71.
 76. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 2011;1813(5):878–88.
 77. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science (80-).* 1995;267(5202):1349–53.
 78. Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grötzinger J, et al. Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130: II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem.* 1996;271(22):12999–3007.
 79. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 1998;334(2):297–314.
 80. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561–72.
 81. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF- α . *Immunol Ser.* 1992;56:3–34.
 82. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* 1988;53(1):45–53.
 83. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel D V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* 1993;268(25):18542–8.
 84. Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell.* 1995;81(4):495–504.
 85. Hsu H, Huang J, Shu H-B, Baichwal V, Goeddel D V. TNF-dependent recruitment

- of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996;4(4):387–96.
86. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel D V. Anatomy of TRAF2: distinct domains for nuclear factor- κ B activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem*. 1996;271(33):19935–42.
87. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:693–733.
88. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol*. 2005;7(8):758–65.
89. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(1):1–14.
90. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. Vol. 89, *Journal of periodontology*. Wiley Online Library; 2018. p. S1–8.
91. Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006;40(1):107–19.
92. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(12):738–48.
93. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012;91(10):914–20.
94. Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontol 2000*. 2016;72(1):30–53.
95. Kinane DF, Demuth DR, Gorr S-U, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. *Periodontol 2000*. 2007;45:14–34.
96. Kinane DF, Hajishengallis G. Polymicrobial infections, biofilms, and beyond. *J Clin Periodontol*. 2009;36(5):404–5.
97. Benakanakere M, Kinane DF. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. *Periodontol Dis*. 2012;15:41–55.
98. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1997;14(1):112–43.

-
99. Salud M de. IV Estudio Nacional de Salud Bucal. ENSAB IV. Situación en Salud Bucal. Para Saber cómo estamos y saber qué hacemos. Ministerio de Salud, República de Colombia Bogotá; 2014.
 100. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, Garcia FAR, et al. Screening for obstructive sleep apnea in adults: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Jama*. 2017;317(4):407–14.
 101. Eguía VM, Cascante JA. Síndrome de apnea-hipopnea del sueño: Concepto, diagnóstico y tratamiento médico. In: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. SciELO Espana; 2007. p. 53–74.
 102. Tietjens JR, Claman D, Kezirian EJ, De Marco T, Mirzayan A, Sadroonri B, et al. Obstructive sleep apnea in cardiovascular disease: a review of the literature and proposed multidisciplinary clinical management strategy. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(1):e010440.
 103. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010;90(1):47–112.
 104. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García MÁ, Marín JM, Ferrer A, Corral J, et al. Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(3):143–56.
 105. Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2014;383(9918):736–47.
 106. Álvarez-Sala JL, Calle M, Fernández JM, Martínez R, Rodríguez JL. Apnea obstructiva del sueño. *Inf Ter Sist Nac Salud*. 1999;23(5):121–31.
 107. Senaratna C V, Perret JL, Lodge CJ, Lowe AJ, Campbell BE, Matheson MC, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: a systematic review. *Sleep Med Rev*. 2017;34:70–81.
 108. Cruz AA. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. World Health Organization; 2007.
 109. Benjafield A V, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med*. 2019;7(8):687–98.
 110. Hidalgo-Martínez P, Lobelo R. Epidemiología mundial, latinoamericana y colombiana y mortalidad del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS). *Rev la Fac Med*. 2017;65(1Sup):17–20.
 111. Wang HF, He FQ, Xu CJ, Li DM, Sun XJ, Chi YT, et al. Association between the

- interleukin-1 β C-511T polymorphism and periodontitis: a meta-analysis in the Chinese population. *Genet Mol Res.* 2017;16(1):1–9.
112. Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012;83(11):1407–19.
113. Rogus J, Beck JD, Offenbacher S, Huttner K, Iacoviello L, Latella MC, et al. IL1B gene promoter haplotype pairs predict clinical levels of interleukin-1 β and C-reactive protein. *Hum Genet.* 2008;123(4):387–98.
114. Gok I, Huseyinoglu N, Ilhan D. Genetic polymorphisms variants in interleukin-6 and interleukin-1beta patients with obstructive sleep apnea syndrome in East Northern Turkey. *Med Glas.* 2015;12(2).
115. Wu W, Li Z, Tang T, Wu J, Liu F, Gu L. 5-HTR2A and IL-6 polymorphisms and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Biomed reports.* 2016;4(2):203–8.
116. Larkin EK, Patel SR, Zhu X, Tracy RP, Jenny NS, Reiner AP, et al. A Study of The Relationship between The Interleukin-6 Gene and Obstructive Sleep Apnea. *Clin Transl Sci.* 2010;3(6):337–9.
117. Costa AM, Guimarães MCM, de Souza ER, Nóbrega OT, Bezerra ACB. Interleukin-6 (G-174C) and tumour necrosis factor-alpha (G-308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis. *Gerodontology.* 2010 Mar;27(1):70–5.
118. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(5):1313–6.
119. Dosseva-Panova V, Mlachkova A, Popova C, Kicheva M. EVALUATION OF INTERLEUKIN-6, LYMPHOTOXIN-alpha AND TNF-alpha GENE POLYMORPHISMS IN CHRONIC PERIODONTITIS. *J IMAB.* 2015;21(3):868–75.
120. Haffajee AD. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78–111.
121. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol.* 1999;70(1):13–29.
122. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol.* 2013;40:S1–7.

123. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16(3):408.
124. Nizam N, Basoglu OK, Tasbakan MS, Nalbantsoy A, Buduneli N. Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease. *J Periodontol.* 2014;85(7):e251–8.
125. Van Dyke TE, Dave S. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2005;7(1):3.
126. Young T, Skatrud J, Peppard PE. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *Jama.* 2004;291(16):2013–6.
127. Loke W, Girvan T, Ingmundson P, Verrett R, Schoolfield J, Mealey BL. Investigating the association between obstructive sleep apnea and periodontitis. *J Periodontol.* 2015;86(2):232–43.
128. Ahmad NE, Sanders AE, Sheats R, Brame JL, Essick GK. Obstructive sleep apnea in association with periodontitis: a case–control study. *Am Dent Hyg Assoc.* 2013;87(4):188–99.
129. Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Dent Res.* 2001;80(7):1631–6.
130. Zhang X, Liu R-Y, Lei Z, Zhu Y, Huang J-A, Jiang X, et al. Genetic variants in interleukin-6 modified risk of obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Mol Med.* 2009;23(4):485–93.
131. Song Z, Song Y, Yin J, Shen Y, Yao C, Sun Z, et al. Genetic variation in the TNF gene is associated with susceptibility to severe sepsis, but not with mortality. 2012;
132. Lembo D, Caroccia F, Lopes C, Moscagiuri F, Sinjari B, D'Attilio M. Obstructive sleep apnea and periodontal disease: a systematic review. *Medicina (B Aires).* 2021;57(6):640.
133. Trevilatto PC, de Souza Pardo AP, Scarel-Caminaga RM, de Brito Jr RB, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, et al. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Arch Oral Biol.* 2011;56(1):54–62.
134. Huang HY, Zhang JC. Investigation on the association of interleukin-1 genotype polymorphism with chronic periodontitis. *Hua xi kou Qiang yi xue za zhi= Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi= West China J Stomatol.* 2004;22(5):415–9.
135. Tanaka K, Miyake Y, Hanioka T, Arakawa M. Relationship between IL1 gene polymorphisms and periodontal disease in Japanese women. *DNA Cell Biol.* 2014;33(4):227–33.

136. Schulz S, Stein JM, Altermann W, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in interleukin-1 gene cluster and subgingival colonization with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with aggressive periodontitis. *Hum Immunol*. 2011;72(10):940–6.
137. Ribeiro MSM, Pacheco RBA, Fischer RG, Macedo JMB. Interaction of IL1B and IL1RN polymorphisms, smoking habit, gender, and ethnicity with aggressive and chronic periodontitis susceptibility. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(3):349.
138. Domínguez-Pérez RA, Loyola-Rodríguez JP, Abud-Mendoza C, Alpuche-Solis AG, Ayala-Herrera JL, Martínez-Martínez RE. Association of cytokines polymorphisms with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis in a Mexican population. *Acta Odontol Scand*. 2017 May;75(4):243–8.
139. Hong S-J, Kang SW, Kim SK, Kim YS, Ban JY. Lack of association between interleukin-1 β gene polymorphism (rs16944) and chronic periodontitis: from a case-control studies to an updated meta-analysis. *Dis Markers*. 2018;2018.
140. Liu X, Li H. A Systematic Review and Meta-Analysis on Multiple Cytokine Gene Polymorphisms in the Pathogenesis of Periodontitis. *Front Immunol*. 2021;12:713198.
141. Tang TY, Zhou XX, Huang H, Huang QD. Relationship between IL-1 β polymorphisms and obstructive sleep apnea syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(13):3120–8.
142. Majumder P, Panda SK, Ghosh S, Dey SK. Interleukin gene polymorphisms in chronic periodontitis: a case-control study in the Indian population. *Arch Oral Biol*. 2019;101:156–64.
143. Komatsu Y, Galicia JC, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Association of interleukin-1 receptor antagonist+ 2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping method. *Int J Immunogenet*. 2008;35(2):165–70.
144. Kobayashi T, Murasawa A, Ito S, Yamamoto K, Komatsu Y, Abe A, et al. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. *J Periodontol*. 2009 May;80(5):792–9.
145. Shete AR, Joseph R, Vijayan NN, Srinivas L, Banerjee M. Association of Single Nucleotide Gene Polymorphism at Interleukin-1 β + 3954,– 511, and– 31 in Chronic

- Periodontitis and Aggressive Periodontitis in Dravidian Ethnicity. *J Periodontol*. 2010;81(1):62–9.
146. Amirisetty R, Patel RP, Das S, Saraf J, Jyothy A, Munshi A. Interleukin 1 β (+3954,-511 and-31) polymorphism in chronic periodontitis patients from North India. 2015;
147. Huang W, He B-Y, Shao J, Jia X-W, Yuan Y-D. Interleukin-1 β rs1143627 polymorphism with susceptibility to periodontal disease. *Oncotarget*. 2017;8(19):31406.
148. Brodzikowska A, Górska R, Kowalski J. Interleukin-1 genotype in periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;67(6):367–73.
149. Ding C, Ji X, Chen X, Xu Y, Zhong L. TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *J Clin Periodontol*. 2014 Aug;41(8):748–59.
150. Riha RL, Brander P, Vennelle M, Mcardle N, Kerr SM, Anderson NH, et al. Tumour necrosis factor- α (-308) gene polymorphism in obstructive sleep apnoea–hypopnoea syndrome. *Eur Respir J*. 2005;26(4):673–8.
151. Coventry J, Griffiths G, Scully C, Tonetti M. Periodontal disease. *Bmj*. 2000;321(7252):36–9.
152. Azab E, Elfasakhany FM. Effect of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)-308 and-1031 Gene Polymorphisms on Periodontitis among Saudi Subjects. *Saudi Dent J*. 2022;
153. Shi L, Zhang L, Zhang D, Zhou J, Jiang X, Jin Y, et al. Association between TNF- α G-308A (rs1800629) polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2021;56(2):226–35.
154. Trombone APF, Cardoso CR, Repeke CE, Ferreira SBJ, Martins WJ, Campanelli AP, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 2009 Oct;44(5):598–608.
155. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *Open Dent J*. 2009 Sep;3:184–90.
156. Menezes NG de, Colombo APV. Lack of association between the TNF-alpha -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians. *Braz Oral Res*.

- 2008;22(4):322–7.
157. Huang J, Liao N, Huang Q-P, Xie Z-F. Association between tumor necrosis factor- α -308G/A polymorphism and obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(4):246–51.
 158. Wu Y, Cao C, Wu Y, Zhang C, Zhu C, Ying S, et al. TNF- α -308G/A polymorphism contributes to obstructive sleep apnea syndrome risk: evidence based on 10 case-control studies. *PLoS One*. 2014;9(9):e106183.
 159. Saygun I, Nizam N, Keskiner I, Bal V, Kubar A, Açikel C, et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontol Res*. 2011 Apr;46(2):235–9.
 160. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. [Sleep and immune system]. *Rev Alerg Mex*. 2018;65(2):160–70.
 161. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, Nida M, Aggarwal S, Sajid H, et al. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 2013 Oct;9(10):1003–12.
 162. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, Pezzini A, Assanelli D, Lorenzet R, et al. Polymorphisms of the interleukin-1beta gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jan;25(1):222–7.
 163. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet*. 2006 Feb;15(4):519–29.
 164. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TWF, et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1976–83.
 165. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J*. 2001 May;20(10):2587–95.
 166. Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *Int J Oral Sci*. 2020 Jan;12(1):2.