



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Polimorfismos de M1, T1 y P1 ante la
susceptibilidad a la caries”**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

C.D. Albino Campos Díaz

Comité de Tutores

Tutor Académico: Dra. en C.Q.B Julieta Castillo Cadena

Tutor Interno: Ph. D. Antonio Laguna Camacho

Tutor Externo: M. en Tan. Quetzalcóatl Hurtado Sánchez

Toluca, Estado de México

2018

RESUMEN

La caries dental es una enfermedad infecciosa, multifactorial que afecta a los tejidos del diente, deteriora su función además que incapacita a los individuos a sufrir dolor. Se desarrolla desde la infancia y no se limita a esta etapa de la vida. La Organización Mundial de la Salud la define como un proceso patológico y ocasiona reblandecimiento del tejido duro dental, evolucionando hacia la formación de la cavidad.

Desde hace mucho tiempo se ha intentado encontrar una explicación sobre el origen de la caries dental, dando diversas teorías, que van desde el gusano de los dientes en Asiria en el siglo VII a.C., hasta la actual que indica que las bacterias y sus procesos químicos son las causantes y solo es uno de los múltiples factores etiológicos que desencadena la enfermedad.

Los factores etiológicos más estudiados son la dieta, la saliva, el estado físico del huésped y el tiempo. Hoy en día se ha estudiado que la carga génica participa en el desarrollo de la caries, ya que se ha observado individuos que muestran una menor tendencia a desarrollar caries con respecto a otros en igualdad de condiciones.

Este proyecto de investigación se enfoca en los polimorfismos de los genes de la familia Glutación S-Transferasa, específicamente M1, T1 y P1, los cuales sintetizan la enzima Glutación S-Transferasa que metaboliza los xenobióticos al conjugar al Glutación en biotransformación fase II, y su influencia ante la incidencia de la caries.

Se obtuvieron el índice oral simplificado, hábitos dietéticos, índice CPOD y el genotipo de GSTT1, GSTM1 y GSTP1 por medio de PCR-RFLP punto final, de 64 participantes del Estado de México. El promedio de edad fue 35.5 ± 10.3 . El 67.2% tuvo hábitos higiénicos buenos y el 32.8% malos, un índice CPOD 5.5 ± 1.3 y 8.1 ± 1.6 respectivamente (U de Mann-Whitney $p=0.046$). El 59.4% informaron dieta no cariogénica y 40.6% cariogénica, índice CPOD 5.4 ± 1.4 y 7.8 ± 1.2 respectivamente (U de Mann-Whitney $p=0.043$). Se encontraron 12 diferentes fórmulas de genotipos. El menor índice CPOD fue 3 y corresponde al genotipo silvestre para todos los genes (M1+/+; T1+/+; P1b a/a; P1 a/a). El mayor índice fue de 12, y correspondió al genotipo M1-/-; T1-/- P1b a/b; P1c a/a. El análisis con U de Mann-Whitney mostró diferencia significativa entre ellos, $p=0.027$.

MARCO TEÓRICO

1.1 CARIES DENTAL

Definición

La caries dental es una enfermedad infecciosa, multifactorial que afecta los tejidos del diente, deteriora su función y en el mayor de los casos incapacita a los individuos a sufrir dolor causado por la afección en la pulpa dental [1, 2, 3].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la caries como un proceso patológico que se origina después de la erupción del diente ocasionando un reblandecimiento del tejido duro del mismo, tanto a la corona anatómica de la pieza dental como a las raíces expuestas de los dientes, evolucionando hacia la formación de la cavidad [4].

Etiología

Se ha intentado encontrar una explicación sobre el origen de la caries dental, dando diversas teorías, que van desde el gusano de los dientes en Asiria en el siglo VII a.C., hasta la actual, que indica que las bacterias y sus procesos químicos son los causantes de la enfermedad, conocida como la teoría Químico-Bacteriana de Miller formulada en 1882 [1]. Años después se introdujo a estos descubrimientos el concepto de placa dento-bacteriana como reservorio de las bacterias causantes de la producción de ácidos que destruyen el tejido dental [3]. De forma natural la superficie dental está recubierta por una capa de placa dento-bacteriana, constituida por proteínas salivales, bacterias y el producto del metabolismo de ambas, llamado biofilm dental [2].

Normalmente el diente sufre episodios de desmineralización debidos a los alimentos que se consumen, mismos que no resultan significativos gracias al proceso de remineralización, sin embargo, cuando los procesos de desmineralización superan a la remineralización se presenta el fenómeno de cavitación y desarrollo de caries [5, 4].

Los factores etiológicos más estudiados y de mayor relevancia son:

Los microorganismos.

Se estima que en la cavidad oral habitan más de mil especies, cada una de ellas representada por una gran variedad de cepas. Entre las bacterias presentes en la boca se presentan tres especies principalmente relacionadas con la caries: *Streptococcus*, con las

subespecies *S. mutans* y *S. sobrinus*. *Lactobaillus* con las subespecies *L. caseí*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. oris*. Los *Actinomyces* con las subespecies *A. israelis* y *A. naslundii* [6, 7].

Las bacterias cariogénicas transportan los polisacáridos intra y extracelulares y los sintetizan rápidamente, mientras compiten con otras bacterias del biofilm dental. Su capacidad de crecer y producir ácido a bajos niveles de pH es lo que las caracteriza para que puedan provocar caries dental. El pH el cual los tejidos dentales se disuelven, oscila entre 5.3 y 5.7 a nivel adamantino y de 6.5 a 6.7 en dentina [8, 9].

La dieta.

Características de los alimentos azucarados tales como la consistencia, textura, adhesión y las condiciones en las cuales son ingeridos, son las más importantes en su potencial cariogénico. Los alimentos adhesivos son más cariogénicos que los no retentivos. Si la frecuencia de consumir alimentos azucarados entre comidas es alta, mas cariogénicos se vuelven [10].

La saliva.

El papel protector de la saliva se logra a través de la dilución y lavado de los azucares de la dieta diaria, neutralización y amortiguación de los ácidos de la placa dental y la provisión de iones para el proceso de remineralización. Por ejemplo, la lactoferrina, glicoproteína presente en la saliva, inhibe el crecimiento microbiano por secuestro de hierro. La lactoferrina libre de hierro llamada apolactoferrina, posee un efecto bactericida contra varias cepas bacterianas incluyendo *S. mutans* [11].

Estructura dental.

La anatomía y la oclusión de los dientes guardan una estrecha relación con la aparición de las lesiones cariosas. También las anomalías de los dientes de forma y composición contribuyen en la formación de caries. Las zonas anatómicas con mayor predisposición a la caries, son los surcos, fisuras y áreas interproximales [11].

Tiempo.

Es determinante para el desarrollo de la caries; cuando los factores etiológicos ya mencionados interactúan por un largo período, se produce una desmineralización y daño

irreversible en el esmalte o dentina, mientras que si la interacción se da en un período corto no se presenta el daño [1].

Carga génica.

Hoy en día, además de todos los factores antes mencionados involucrados en la caries, se ha encontrado que la carga génica y posiblemente eventos epigenéticos participan en el desarrollo de la caries. Se ha observado individuos que muestran menor tendencia a desarrollar caries con respecto a otros en igualdad de condiciones [12]. La variación en los factores inherentes al huésped, como la herencia, los trastornos en la formación del esmalte y la dentina, la respuesta inmunológica alterada a microorganismos cariogénicos y su asociación con el antígeno leucocitario humano, también se han considerado como factores de riesgo a caries [13].

Por otro lado las variantes entre los genes en hombre y mujer, muestran efectos diferentes en la erupción dental, hábitos dietéticos, funciones fisiológicas salivales y otros factores de riesgo a caries. Se denominan interacciones gen por sexo, es decir, asociados a los cromosomas sexuales [14].

Los polimorfismo en los genes que codifican las proteínas involucradas en la formación del esmalte como la amelogenina (AMELX), enamulina (EMAN), turfetina (TUFT1), enamolisina (MMP-20), ameloblastina (AMBN) y calicreína (KLK-4) causan amelogénesis imperfecta, ante un trastorno hereditario y heterogéneo, localizado o generalizado. La variación genética de la amelogenina (AMELX) mostró estar asociada con un alto riesgo de caries en adultos [11].

La contribución del estudio de la carga genética a la etiología de la caries se ha observado en gemelos homocigotos y dicigotos, en quienes se han observado diferencias ante los índices de caries, en igualdad de condiciones [12].

Clasificación de la caries

Black clasifica la caries en:

- Clase I: cavidades formadas en las fosas y fisuras, de las superficies oclusales en premolares y molares, superficies linguales de incisivos.
- Clase II: cavidades en las superficies proximales de premolares y molares.

- Clase III: cavidades en las superficies proximales en incisivos y caninos que no afectan al ángulo incisal.
- Clase IV: cavidades en las superficies proximales de incisivos y caninos que afectan al ángulo incisal.
- Clase V: cavidades en el tercio gingival de los dientes (no en fosas) y por debajo del contorno máximo en las superficies vestibulares y linguales de los dientes.
- Clase VI: (que no forma parte de la clasificación original de Black): cavidades en los bordes incisales y en las superficies lisas de los dientes por encima del contorno máximo [15].

Epidemiología

Actualmente la caries se conoce como el principal problema de salud pública bucal debido a su alta incidencia a nivel mundial de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). En su informe realizado en abril 2012, menciona que 60-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo [16].

En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles en el 2015, reportó que en varios estados de la república mexicana, el 93.2% de la población tenía caries [17]. En San Luis Potosí un grupo de estudiantes entre 6 y 12 años de edad, se encontró que el 85.6% presentó caries, el índice significativo de caries (SIC, por sus siglas en inglés) global fue de 4.65 en la dentición temporal y de 5.45 en la dentición permanente a los 6 años de edad [18]. Igualmente, en una comunidad indígena ubicada en Oaxaca se reportó 88% de caries para la dentición temporal y 71% en la dentición permanente, el índice de dientes permanentes perdidos, cariados y obturados (CPOD) fue de 2.07 y el índice de dientes temporales cariados, extraídos y obturados (CEOD) de 5.4. Los factores que en este caso se asociaron a este fenómeno fueron principalmente el aislamiento, aunado a la situación de pobreza en la que viven, lo que les impide, acudir a una consulta con el odontólogo y restringe de manera negativa al acceso a la información que les podría permitir adquirir hábitos adecuados para la disminución de esta enfermedad [19].

1.2. DIVERSIDAD GENÓMICA

La diversidad del genoma dentro de una misma especie hace que cada individuo sea único e irrepetible, el polimorfismo genético o de secuencia del ADN es el responsable de la gran variabilidad existente entre los individuos de la misma especie [19].

Los polimorfismos pueden encontrarse en las regiones codificantes del genoma, es decir, regiones que codifican para una proteína, recibiendo el nombre de polimorfismos génicos. También pueden encontrarse en las regiones no codificantes, que pueden tener una función reguladora o simplemente estructural, reciben el nombre de polimorfismos genéticos [19, 20].

Los polimorfismos génicos son los más comunes y son los responsables de la diversidad genética normal entre individuos. Cuando el polimorfismo génico da como resultado una alteración fenotípica, puede ser perjudicial, desencadenando procesos patológicos o incluso influir en la susceptibilidad a presentar distintas enfermedades [19].

Entre ellos se tienen los genes que codifican la enzima Glutación S-Transferasa, son altamente polimórficos y para comprender la función de esta enzima en el organismo es preciso puntualizar términos, que a continuación se muestran.

Estrés oxidante (EO)

Es la pérdida del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros en la célula [19]. El daño oxidante puede ocurrir por aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS en inglés *reactive oxygen species*), debido a que se encuentran en una concentración elevada y no alcanzan el último eslabón de la reducción de oxígeno, se produce la oxidación de moléculas biológicas, tales como proteínas, hidratos de carbono, ADN, lípidos, enzimas de transporte y mecanismos celulares de transcripción. Se asocia con enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, procesos inflamatorios mediados por citocinas, isquemia, metástasis y enfermedades bucales [20, 21].

Las ROS y los xenobióticos se asocian a diversos padecimientos o alteraciones en el organismo, que pueden ir desde efectos tóxicos leves hasta carcinogénicos. Los radicales libres son ROS, con grupo hidroxilo, superóxido y alcóxido, existen otras especies que no son radicales libres, como el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso y el oxígeno, que también pueden causar EO [22]. Producen daño en los tejidos a través de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran el deterioro protéico, la peroxidación lipídica, la estimulación de citocinas pro-inflamatorias, liberadas por monocitos y macrófagos, daño en el ADN y la oxidación de enzimas importantes en el organismo. Por tal motivo, su estudio es de suma importancia en diferentes enfermedades [20].

Sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en 3 grupos: el primero, de antioxidantes preventivos que suprimen la formación de radicales libres, incluye la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), carotenoides, transferrina, albúmina, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. El segundo, que se encarga de secuestrar radicales libres y eliminarlos, está formado por el ácido úrico, bilirrubina, vitaminas A, C y E. El tercer grupo, repara el daño ocasionado por los radicales libres en el entorno de la membrana celular, lo conforman enzimas de reparación del ADN, lipasa, proteasas y transferasas [20, 21].

Glutatión (GSH)

Antioxidante que participa en la inhibición enzimática, reducción de ROS e inactivación de xenobióticos, controla la permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos, también funciona como coenzima, e interviene en el proceso de apoptosis y síntesis de proteínas [21, 22].

Su grupo tiol libre le permite reducir diversos compuestos con características electrofílicas, como pueden ser los peróxidos y disulfuros, al donar un protón y lograr la ruptura de diversos enlaces, proteínas, factores de transcripción y moléculas previamente oxidadas, en el proceso de biotransformación de fase II [23].

Glutatión S-transferasa (GST)

Es una enzima dimérica responsable en la biotransformación fase II, que le permite al Glutatión conjugarse con compuestos electrofílicos de las especies reactivas de oxígeno y xenobióticos, para su degradación y eliminación, al crear en ellos un coeficiente de solubilidad mayor. Además de estas reacciones, la GST efectúa reacciones de reducción e isomerización, interviene en la biosíntesis de prostaglandinas y esteroides, catabolismo de tirosina y la apoptosis celular [24].

La presencia de polimorfismos en los genes que codifican para GST, alteran su función. El estudio de éstos puede ayudar al entendimiento del riesgo de exposición a diferentes xenobióticos en la población y de manera individual. La presencia de polimorfismos en estas enzimas explica las diferencias en cuanto a la susceptibilidad individual ante diferentes enfermedades [25].

Algunos genes que codifican esta enzima se describen a continuación.

- a) GSTM1 (μ): La secuencia de este gen está conformado por cinco regiones, M1, M2, M3, M4 y M5. El cual M1 hasta ahora el más estudiado, el cual está ubicado en el cromosoma 1, región p13.3, formado por 8 exones, tiene una longitud de 4.2 kb. y es polimórfico, ya que cuenta con 4 variantes alélicas: A, B, C y 0 (alelo nulo). Entre los posibles polimorfismos que presenta, GSTM1 nulo es el más frecuente. Las deleciones homocigóticas de GSTM1 nulo dan lugar a la ausencia de la actividad enzimática. Estudios epidemiológicos han propuesto que los individuos que portan genotipo nulo para este gen o sea deleción en ambos alelos, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, vejiga, colon y mama.
- b) GSTT1: La secuencia de este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 22, región p11.2, está conformado por cinco exones. Es polimórfico y posee una variante, GSTT1 nulo. Es consecuencia de una recombinación homóloga de las regiones HA3 y HA5 que dan como resultado una deleción de 5.4 kb y en consecuencia el gen no se traduce.
- c) GSTP1: La secuencia de este gen se localiza en el cromosoma 11, región q13, está conformado por nueve exones, tiene una longitud aproximada de 3 kb. Es polimórfico, cuenta con tres variantes alélicas: GSTP1a, alelo silvestre; GSTP1b, ubicado en el exon 5 y es resultado de una mutación en el codón 104 de ATC (Ile) a GTC (Val); GSTP1c, la cual posee la misma mutación en el codón 104 que GSTP1b, pero cuenta con una segunda mutación ubicada en el exón 6, en el codón 113 de GCG (Ala) a GTG (Val) [26]. Los polimorfismos GSTP1b y GSTP1c se asocian con un mayor riesgo a desarrollar diferentes tipos de patologías, debido a que las proteínas codificadas por los alelos mutantes influyen en la actividad enzimática, en su capacidad de metabolizar agentes carcinógenos y medicamentos contra el cáncer, ya que cada uno otorga distinta estabilidad térmica y afinidad por el sustrato [27].

1.3 ANTECEDENTES

Glutación S-Transferasa y enfermedades bucales

Bonola Garrardo y col. mencionan que durante la fase secretoria de los ameloblastos, las ROS reducen la producción de proteínas, lo que afecta directamente a los ameloblastos en los proceso de transcripción del esmalte, que se traducen en zonas hipo-mineralizadas, aumentando la porosidad del diente, creando susceptibilidad al proceso carioso [20].

En la misma investigación mencionan que la gingivitis presenta aumento de las ROS, producto del proceso inflamatorio, la cantidad de GST disminuye, por lo cual no se eliminan,

provocando que la enfermedad aumente gradualmente en un periodo de tiempo más corto, creando daño irreparable en tejidos bucales [20].

Pengfei, He y col. realizaron un meta-análisis en artículos desde el 2000 hasta 2015 sobre la asociación de T1, P1, M1 y el riesgo de padecer leucoplasia oral, una lesión predominantemente blanca de la mucosa oral en la que existe un riesgo de desarrollar cáncer, pudieron observar que los polimorfismos de M1 y T1 se vinculan con un mayor riesgo de padecer leucoplasia (OR= 1.838, IC del 95% para M1 y OR= 1.337, IC del 95% para T1), mientras que P1 no demostró significancia (OR= 1.139, IC del 95%) [28].

Por otro lado, Maximilran y col. realizaron un estudio de casos y controles sobre el análisis de M1 y T1 con relación al riesgo de cáncer oral, específicamente carcinoma oral de células escamosas, encontrando que la frecuencia de M1 nulo en pacientes sanos fue similar a los pacientes con carcinoma oral, lo cual no permite la conclusión de mayor riesgo. Mientras que para T1 nulo es meramente asociado con un riesgo alto para pacientes con carcinoma oral [29]. Zhi Jang y col. observaron que M1 nulo se asocia al riesgo de padecer cáncer oral en personas asiáticas, mientras que T1 nulo no se observó tal relación [30].

Estos estudios muestran que la GST participa de manera importante en las enfermedades de la cavidad oral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental es el proceso de desmineralización del esmalte o la dentina causada por el ácido producido por las bacterias cariogénicas, causando dolor por la afección de la pulpa dental, se caracteriza por ser crónica, infecciosa, contagiosa y de origen multifactorial [1].

Entre los factores etiológicos que intervienen en el desarrollo de la caries, se tienen las bacterias cariogénicas, específicamente *Streptococcus*, la subespecie *S. mutans*, la dieta, la saliva, la estructura dental, la salud del huésped y el tiempo en que interactúan los mismos, entre otros [11]. Además de los factores antes mencionados, la carga génica participa en el desarrollo de la caries, ya que se han observado gemelos homocigotos y dicigotos que muestran diferencias en los índices de caries en igualdad de condiciones [12].

La Organización Mundial de la Salud en abril 2012, reveló que del 60 al 90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo [3]. En México es el principal problema de salud pública bucal, sólo en San Luis Potosí en un grupo de estudiantes entre 6 y 12 años de edad, se encontró que el 85.6% presentó caries. También en una comunidad indígena ubicada en Oaxaca se reportó el 88% de caries para la dentición temporal y 71% en la dentición permanente. La prevalencia es alta aún con toda la información de los factores que se han estudiado y las medidas preventivas que ofrecen los programas de salud bucal [18, 19].

La cavidad bucal está en interacción con muchas sustancias a lo largo del día y productos de las bacterias cariogénicas durante la noche considerados xenobioticos, los cuales traspasan la membrana celular del epitelio circundante y crean estrés oxidante en las células. El estrés oxidante tiene que ser eliminado por los sistemas antioxidantes, principalmente el glutatión, y la enzima Glutatión S-Transferasa, que cataliza la conjugación del glutatión con los xenobioticos para metabolizarlos. Sin embargo, la presencia de polimorfismos en los genes que codifican para Glutatión S-Transferasa puede alterar su función, causando susceptibilidad a diferentes enfermedades entre ellas la caries. En la fase secretoria de los ameloblastos, el estrés oxidante reduce la producción de proteínas, lo que afecta directamente al proceso de transcripción del esmalte, que se traduce en zonas hipo-mineralizadas, aumentando la porosidad del diente y creando susceptibilidad al proceso carioso.

La participación de los genes de susceptibilidad, principalmente la familia Glutatión S-Transferasa, como protectores del aparato estomatognático de las enfermedades bucales ante

xenobióticos fue explorado en este trabajo de investigación, el cual tuvo la siguiente pregunta de investigación:

¿Los polimorfismos de los genes Glutación S-Tranferasa M1, T1 y P1 influyen en la susceptibilidad a la caries?

3. HIPÓTESIS:

Hipótesis alterna: La incidencia de la caries está influenciada por los polimorfismos de GSTM1, GSTT1 y GSTP1.

Hipótesis nula: La incidencia de la caries no está influenciada por los polimorfismos de GSTM1, GSTT1 y GSTP1.

4. OBJETIVOS:

General:

Determinar si los polimorfismos de GSTM1, GSTT1 y GSTP1 influyen en la incidencia de caries en individuos que acudan al Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED).

Específicos:

- Evaluar el índice de caries, en individuos participantes que acudieron al Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED).
- Evaluar los hábitos higiénicos y dietéticos en los mismos participantes.
- Determinar los polimorfismos de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en los mismos participantes.
- Relacionar los polimorfismos de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 con la incidencia de caries.

5. JUSTIFICACIÓN:

El análisis del estrés oxidante por los xenobióticos en las células orales y el daño que ocasiona en las mismas, es muy poco referido en los antecedentes encontrados, al igual, a las enfermedades bucales a la que predispone o hace susceptibles a los individuos. Entre los mecanismos de la Glutación S-Transferasa en las células, para la eliminación de los xenobióticos, es de vital importancia. Sin embargo los polimorfismos en estos genes ocasionan que las reacciones no se lleven adecuadamente, como algunos artículos lo marcan, son genes que confieren susceptibilidad.

En los padecimientos de alta prevalencia en la cavidad bucal, es necesario realizar más estudios que profundicen en la relación de la carga génica que codifica la enzima Glutación S-Transferasa y las enfermedades bucodentales, destacando entre ellas la caries como la de mayor incidencia en la población mexicana. La etiología de la misma enfermedad la marca como multifactorial, sin embargo, los factores más estudiados no explican completamente el desarrollo y la prevalencia de la misma, es por ello necesario observar la participación del sistema antioxidante de la enzima Glutación S-Transferasa en relación con la susceptibilidad a la caries, para poder aportar más conocimiento sobre el desarrollo de la caries.

El esfuerzo de esta investigación se pretende demostrar si la susceptibilidad a la caries se asocia con la presencia de los polimorfismos de los genes de la familia Glutación S-Transferasa particularmente GSTM1, GSTT1 y GSTP1.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño de Estudio

Tipo de estudio

Transversal

Universo

Fueron pacientes adultos o niños que acudieron al Centro de Investigaciones de Ciencias Médicas (CICMED) ubicado en el municipio de Toluca Edo, de México, en el periodo de enero 2017 a enero 2018.

Método de muestreo

Por conveniencia.

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta fueron.

- Personas adultos o niños con 20 o más dientes permanentes o temporales (da en automático la edad de los niños que pueden participar que es a partir de los 6 años cuando tienen este número de dientes), que permitió evaluar la incidencia de caries con el índice CPOD.
- Personas adultos o niños que de manera voluntaria aceptaron participar en el estudio.
- Personas adultos o niños que firmaron el consentimiento o asentimiento informado.

Los criterios de exclusión que se tomaron en cuenta fueron:

- Aquellos que no aceptaron participar en el estudio.
- Individuos con restauraciones múltiples de coronas que impidió determinar el índice de caries CPOD.
- Individuos con prótesis bucales completas o parciales con unidades de 4 a 12 que impidió determinar el índice de caries CPOD.

Aquellas muestras de sangre contaminadas, hemolizadas, aquellos individuos que abandonaron el estudio fueron eliminados del estudio.

6.3. Procedimientos

Se invitó a las personas que acudieron a consulta en el CICMED a participar en el estudio. Se les explicó en qué consistiría, igualmente se les pidió que firmaran un consentimiento o asentimiento informado (Anexo 1 y 2). En una sesión se realizó;

- La aplicación de los cuestionarios de hábitos higiénicos bucales y dietéticos (Anexos 3 y 4 respectivamente).
- El diagnóstico clínico de caries clínicamente con ayuda de un explorador y espejo bucal. Se llevó el registro en el Odontograma (Anexo 5) para su análisis y obtener el índice de dientes perdidos, cariados y obturados (CPOD).
- Se les tomó una muestra de 5mL de sangre periférica en tubos vacutainer con heparina y se rotuló para su identificación. Las muestras de sangre se mantuvieron a una temperatura de 4-6°C hasta su procesamiento en el laboratorio de biología molecular del CICMED.
- Se le ofreció al paciente un tratamiento preventivo, de aplicación de selladores de fosas y fisuras o aplicación de flúor, como agradecimiento por participar.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit Quick-g DNA Mini Prep (Zymo Research), técnica de columnas (Anexo 6). Los productos fueron verificados por electroforesis horizontal en agarosa al 1%.

Genotipificación de GSTM1 y GSTT1

La identificación de polimorfismos de T1 y M1 se realizó mediante PCR múltiple (Anexo 7) con el gen CYP1A1 como control. La mezcla tenía un volumen final de 50 μL , contenía 5 μL de PCR buffer 5x (Promega), 4 μL de MgCl_2 25 mM (Promega), 1 μL de dNTPs, 25 μM (Fermentas), 32.7 μL de H_2O grado biología molecular, 0.3 μL Taq polimerasa 5 U/ μL (Promega), 2 μL de ADN y 1 μL de cada cebador CYP1A1-f, CYP1A1-r, GSTM1-f, GSTM1-r, GSTT1-f, GSTT1-r. Todos los cebadores tenían una concentración de 30 pM/ μl . Las condiciones de PCR fueron 5 min a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización durante 45 segundos a 94 °C, alineación 45 segundos a 62 °C, 45 segundos de extensión a 72 °C, y una elongación final de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis con agarosa al 1,5%. La determinación del polimorfismo de GSTT1 se basó en la presencia de una banda de 480 bp, correspondiente a GSTT1 silvestre, mientras que su ausencia arroja GSTT1 nulo. De manera similar, para GSTM1 la presencia de una banda de 215 pb indicó GSTM1 silvestre mientras que su ausencia implicó GSTM1 nulo. Finalmente, una banda de 312 pb, correspondiente a CYP1A1.

Genotipificación de GSTP1

La identificación de P1b (exón 5) y P1c (exón 6), se llevó a cabo en dos PCR diferentes, una para cada polimorfismo, ambos con un volumen final de 25 μL para obtener una cantidad suficiente de producto para enzimas de digestión. La mezcla para la reacción de PCR contenía 2 μL de ADN, 5 μL de PCR 5x buffer (Promega), 1.5 μL de MgCl_2 25 mM (Promega), 0.3 μL de Taq polimerasa 5 U/ μL (Promega), 0.5 μL 50 μM dNTPs (Fermentas), 13.7 μL de H_2O grado biología molecular y 1 μL de cada cebador según el gen que se utilizará GSTP1b-f, GSTP1b-r, GSTP1c-f o GSTP1c-r; todos los cebadores tenían una concentración de 30 pM/ μl . Para GSTP1c, las condiciones de la PCR fueron las mismas que las usadas para GSTT1 y GSTM1, mientras que las condiciones para la PCR de GSTP1b fueron: 5 minutos a 94°C, desnaturalización de 45 segundos a 94°C, alineación de 45 segundos a 62°C, extensión 45

segundos a 72°C y una elongación final de 5 minutos a 72°C para un total de 35 ciclos. Para la identificación de polimorfismos P1, las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo utilizando BsmAI (Fermentas) para P1b (exón 5) y AciI (Fermentas) para P1c (exón 6). La mezcla de digestión consistió en 17 µL de H₂O grado biología molecular, 2 µL Digest Green buffer (Fermentas), 1 µL Digest Enzyme (Fermentas) y 10 µL de ADN producto de PCR, para un volumen total de 20 µL. Ambas reacciones de digestión se incubaron a 37°C durante 8 horas. Los productos de digestión se verificaron mediante electroforesis horizontal, usando una concentración de agarosa al 2%. La identificación de polimorfismos se basó en la presencia de fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Para el exón 5, los fragmentos de 176 pb, 91 pb y 85 pb corresponden al heterocigoto P1b, mientras que los fragmentos P1b de 91 pb y 85 pb corresponden a homocigoto y un fragmento de 176 pb corresponde a P1a silvestre. En cuanto a los polimorfismos del exón 6, el fragmento de 332 pb corresponde al homocigoto P1c; tres fragmentos, 332 pb, 174 pb y 158 pb corresponden a heterocigotos P1c y dos fragmentos, 158 pb y 174 pb, a P1a silvestre.

6.4. Variables de Estudio

Dependiente:

- Caries

Independientes:

- GSTM1
- GSTT1
- GSTP1

Intervinientes:

- Dieta cariogénica
- Hábitos higiénicos bucodentales
- Edad
- Sexo

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Caries	Proceso patológico de origen externo que se inicia después de la erupción y ocasiona un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad.	Detección clínica y visual de la presencia de caries en todos los órganos dentarios de los participantes.	Variable dependiente Cualitativa Categoría	Diente con caries 1 Diente obturado por caries 2 Diente perdido por caries 3 Diente sano 0	U de Mann-Whitney
GSTM1	El gen GSTM1 ubicado en el cromosoma 1, región p13.3, está formado por 8 exones, tiene una longitud de 4.2 kb. Es polimórfico, ya que cuenta con 4 variantes alélicas.	Detección de presencia o ausencia del gen GSTM1 en cada participante.	Variable independiente Cualitativa Categoría	Presente Nulo	Correlación entre variables
GSTP1	La secuencia de este gen se localiza en el cromosoma 11, Es polimórfico, cuenta con tres variantes alélicas: GSTP1a, alelo silvestre; GSTP1b, este polimorfismo se encuentra ubicado en el exon 5. GSTP1c, posee la	Detección de las variantes alélicas del gen GSTP1 en cada participante.	Variable independiente Cualitativa Categoría	Silvestre • GSTP1a Polimórfico • GSTP1b	Correlación entre variables

	misma mutación que GSTP1b en el exón 5 y una segunda mutación en el exón 6.				
GSTT1	Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 22, región p11.2, está conformado por cinco exones y se encuentra flanqueado por dos regiones homologas HA3 y HA5. Es polimórfico y posee dos variantes, GSTT1 silvestre y GSTT1 0 o nulo. Este último polimorfismo es consecuencia de una recombinación homóloga de las regiones HA3 y HA5 que dan como resultado una deleción de 5.4 kb y en consecuencia la enzima no se traduce.	Detección de las variantes alélicas del gen GSTT1 en cada participante.	Variable independiente Cualitativa Categórica	Presente Nulo	Correlación entre variables
Dieta cariogénica	Aquella de consistencia blanda, con alto contenido de hidratos de carbono, especialmente azúcares fermentables como la sacarosa, que	Se analizara lo referente a la ingestión de dulces sólidos, refrescos con azúcar y refrigerios o comidas saladas	Variable interviniente Cualitativa Categórica	Ingestión: Cariogénica= >15 alimentos	No aplica

	se deposita con facilidad en las superficies dentarias retentivas.	por ser estos 3 grupos de alimentos los que se asocian más frecuentemente a riesgo cariogénico.		azucarados entre comidas en 5 días. No Cariogénica= < 15 alimentos azucarados entre comidas en 5 días.	
Hábitos higiénicos bucodentales	Acciones necesarias para mantener la salud bucodental.	Frecuencia de uso de los elementos necesarios para la higiene bucodental.	Variable interviniente Cualitativa Categoría	Índice Oral Simplificado Malos Buenos	No aplica
Edad	Duración de la vida de una persona, medida en unidades de tiempo, desde su nacimiento.	La edad de los participantes comprende desde el nacimiento a la fecha de estudio.	Variable interviniente Cuantitativa Continua	Años	No aplica
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas.	Se le preguntara el sexo de los participantes para observar la influencia sobre la variable dependiente.	Variable interviniente Cualitativa Categoría	Masculino Femenino	No aplica

6.5 Implicaciones Bioéticas

- Este proyecto de investigación se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en el código de Helsinki del 2013.
- Al igual lo que marca la norma mexicana **NOM-012-SSA3-2012**: que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.
- Este proyecto fue presentado y aceptado ante el Comité de Ética de la Investigación del Centro de Investigaciones de Ciencias Médicas (CICMED) con el número de registro 2017/03.
- Los participantes firmaron una carta de consentimiento informado, como también se le ofreció su diagnóstico de caries, la evaluación de sus hábitos bucales (higiénicos y dietéticos), además de una aplicación de flúor, como medida preventiva a padecer caries.

6.6 Recolección de Datos

Se elaboró una base de datos donde se concentraron todos los datos para su análisis.

6.7 Análisis Estadísticos

Se analizó la distribución de los datos. Se aplicaron análisis de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para la comparación entre índice de caries CPOD, los hábitos higiénicos, dietéticos y los polimorfismos de GTS M1, T1 y P1.

7. Resultados

Características sociodemográficas

Un total de 64 participantes, 24 hombres y 40 mujeres, con un promedio de edad de 35.5 ± 15.3 , originarios del Estado de México. El 85.7% aparentemente sano y 14.3% cursan con una enfermedad sistémica, entre ellas Hipertensión en el 8.9%, Artritis reumatoide 3.6% y Diabetes tipo II en el 1.8%, el promedio del índice CPOD en hombres y mujeres fue de 5.8 ± 1.2 y 5.7 ± 1.5 respectivamente.

Índice CPOD vs Edad

Se agruparon los participantes de acuerdo a la edad. Se consideraron grupos etarios de 5 años. Se calculó el promedio del índice CPOD en cada grupo. El grupo de edad con más participantes fue de 15-19 con 9 y el menos frecuente con 1 participante fue de 65-69 años. El grupo de edad de 10-14 años obtuvo el índice CPOD más bajo y el grupo de 60-64 presentó el índice más alto. En general, conforme la edad va progresando la media en los dientes Perdidos, Obturados y el índice CPOD se va elevando. En la Tabla 1 se muestran los resultados desglosados de cada grupo de edad y su promedio del índice CPOD.

Tabla 1. Índice CPOD vs grupos de edad

Edad	n(%)	Cariados	Perdidos	Obturados	CPOD
5-9	2(3.1)	2.5±1.6	0±0	1±0.8	3.5±2.1
10-14	5(7.8)	1±0.4	0±0	1±0.6	2±1.8
15-19	9(14.1)	2±2.1	0±0	0.6±1.1	2.6±2.3
20-24	5(7.8)	1.6±1.5	0±0	1.6±2.3	3.2±2.4
25-29	7(10.9)	2.3±2	0.1±0.3	3.3±1.8	5.7±4.4
30-34	5(7.8)	2±2.1	0.2±0.4	3±2.1	5.2±3.2
35-39	8(12.5)	2.6±1.8	1.1±1.1	2.2±3.2	6±4.5
40-44	2(3.1)	3.5±3.5	2±2.2	5±5.6	10.5±4.9
45-49	5(7.8)	4.6±4.5	1.6±2.5	1.4±0.8	7.6±6.3
50-54	3(4.7)	1.1±1	2.6±3.8	2.3±2	5.6±5
55-59	7(10.9)	2±2.8	2.1±2.1	5.2±2.7	9.4±3.1
60-64	3(4.7)	7.7±6.6	1.7±1.5	2.6±3.7	12±3
65-69	1(1.6)	0	2	0	2
70-74	2(3.1)	7±8.5	0	2.5±3.5	9.5±4.9
Total	64(100)				

Índice CPOD vs Hábitos Higiénicos Bucales

Los 64 participantes en el estudio, 43(67.2%) informaron buenos hábitos higiénicos bucales, en ellos, el promedio del índice CPOD fue de 5.53±4.63. En los 21(32.8%) restantes, informaron malos hábitos y su promedio del índice CPOD fue 8.05±4.66. El análisis estadístico con U de Mann-Whitney, mostró diferencia significativa entre ambos grupos, p=0.046. En la Tabla 2 se muestra el desglose de los datos.

Tabla 2. Índice CPOD vs Hábitos Higiénicos Bucales

HHB	n(%)	Cariados	Perdidos	Obturados	CPOD
Buenos	43(67.2)	1.5±1.9	1±2.1	3±2.1	*5.5±4.6
Malos	21(32.8)	5±4.3	1.2±1.6	1.8±2.6	8±4.6

Total	64(100)
--------------	---------

* *U de Mann-Whitney, p=0.04*

Índice CPOD vs Hábitos Dietéticos

Con relación a los hábitos dietéticos en los 64 participantes, 38(59.4%) de ellos informaron una dieta no cariogénica y el promedio del índice CPOD fue de 5.37 ± 4.19 . En los 26(40.6%) restante informaron dieta cariogénica y el promedio del índice CPOD fue 7.81 ± 5.22 . El análisis estadístico con U de Mann-Whitney, mostró diferencia significativa entre ambos grupos, $p=0.043$. En la Tabla 3 se muestra el desglose de los datos.

Tabla 3. Índice CPOD vs Hábitos Dietéticos

HD	n(%)	Cariados	Perdidos	Obturados	CPOD
No Cariogénica	38(59.4)	1.6 ± 2.3	0.9 ± 1.7	2.8 ± 2.9	$*5.4 \pm 4.2$
Cariogénica	26(40.6)	4 ± 2.1	1.3 ± 2.3	2.4 ± 2.9	7.8 ± 5.2

* *U de Mann-Whitney, p=0.04*

7.1. Nombre del Artículo

Importancia de los polimorfismos de Glutathión S-Transferasa M1, T1 y P1 en el desarrollo de la caries

The Importance of Polymorphisms of Glutathione S-Transferase M1, T1 and P1 in the Development of Dental Caries

7.1.1. Carta de envió

7.1.2. Resumen

La caries es una enfermedad infecciosa, localizada, multifactorial. La OMS estimó que del 60-90% de los escolares y el 100% en adultos tienen caries. La presencia de polimorfismos en los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1, alteran la función enzimática, ocasionando susceptibilidad a diferentes enfermedades, entre ellas las bucales. Objetivo.

Determinar los polimorfismos de GSTM1, GSTT1 y GSTP1 vs su relación con el índice de caries. Método. Estudio transversal. Se cuantificó el índice CPOD y se identificaron los polimorfismos de GSTT1, GSTM1 y GSTP1 por medio de PCR-RFLP punto final, de 64 participantes del Estado de México. Resultados. El promedio de edad fue 35.5 ± 10.3 . El promedio del índice CPOD fue 6.4. Se encontraron 12 diferentes fórmulas del genotipo considerando a los tres genes. El menor valor del índice CPOD fue 3 y corresponde al genotipo silvestre para todos los genes (M1+/+; T1+/+; P1b a/a; P1 a/a). El mayor valor del índice fue de 12, y correspondió al genotipo M1-/-; T1-/- P1b a/b; P1c a/a. El análisis con U de Mann Whitney mostró diferencia significativa entre ellos, $p=0.021$. Conclusión. En este estudio piloto, el índice CPOD se asoció a la presencia de los polimorfismos de los genes GST M1, T1 y P1. Es deseable continuar y aumentar el tamaño de la muestra.

Palabras clave

Caries, Glutación S-Transferasa, Polimorfismos GSTM1, T1, P1, Susceptibilidad.

7.1.3. Abstract

Dental caries is an infectious, localized, multifactorial disease. The WHO estimates that 60-90% of school children and 100% of adults have dental cavities. The presence of polymorphisms in genes GSTM1, GSTT1 and GSTP1 alter the enzymatic function, causing susceptibility to different diseases, among them the buccal ones. Objective: Determine the polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and their relation to Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index. Method: Cross-sectional study. The DMFT index was quantified and the polymorphisms of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 were identified by endpoint PCR-RFLP in 64 participants from the State of Mexico. Results: The average age was 35.5 ± 10.3 years. The average DMFT index was 6.4. We found 12 different genotype formulas considering the three genes. The lowest DMFT index value was 3, corresponding to the wild genotype for all the genes (M1+/+, T1+/+, P1b a/a, P1 a/a). The highest value of the index was 12, corresponding to genotype M1 -/-; T1 -/- P1b a/b; P1c a/a. The analysis with the of Mann-Whitney U test showed significant difference between them, $p=0.021$. Conclusion. In this pilot study, the DMFT index was associated with the presence of polymorphisms of the GST M1, T1 and P1 genes. It is desirable to follow up this study and increase the sample size.

7.1.4. Introducción

La caries es una enfermedad multifactorial, crónica, acumulativa, evitable, considerada la principal causa de dolor y pérdida de órganos dentarios en sus estadios más avanzados y cuyas secuelas tienen impacto a largo plazo [1]. La Organización Mundial de la Salud en el 2012 estimó que del 60-90% de los niños del mundo tienen caries y en adultos casi el 100%. En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales en el 2015, reportó que en varios estados de la república mexicana, el 93.2% de la población tenía caries, datos que no son alentadores [3].

En el código genético se presentan variaciones llamadas polimorfismos genéticos [4,5]. Las enzimas de la familia Glutación S-Transferasa (GST) responsables del metabolismo de xenobióticos en fase II, protegen a la célula del daño oxidativo a través de la conjugación de glutación con sustratos electrofílicos y genera compuestos más solubles [5, 6]. La presencia de polimorfismos en los genes que codifican para las isoenzimas de GST, pueden alterar su función. El estudio de éstos ayuda al entendimiento del riesgo por exposición a diferentes xenobióticos en la población y de manera individual. La presencia de polimorfismos en estos genes explica las diferencias en cuanto a la susceptibilidad individual ante diferentes xenobióticos, que se han asociado con mayor riesgo de desarrollar algunas enfermedades, tal como el cáncer bucal [7, 8].

Los genes de la familia GST más estudiadas son Mu (μ), Pi (π) y Theta (θ) [8]. El gen GSTM1 (μ), ubicado en el cromosoma 1p13.3, consta de ocho exones con una longitud de 4.2 kb y cuatro variantes alélicas: A (silvestre), B, C y 0 o nulo. GSTM1 nulo es el polimorfismo más frecuente, y da como resultado la pérdida de la actividad enzimática [9]. El gen GSTT1 (θ) se encuentra en el cromosoma 22p11.2, consta de seis exones, se encuentra entre dos regiones homólogas HA3 y HA5. Tiene dos variantes alélicas: GSTT1A silvestre y GSTT1-0 o nulo. Este polimorfismo se debe a una recombinación homóloga de las regiones HA3 y HA5 que dan como resultado una eliminación de 5.4 kb [9, 10]. El gen GSTP1 (π) se encuentra en el cromosoma 11q13, consta de nueve exones, con una longitud de 3.2 kb y tiene tres variantes alélicas: GSTP1A, GSTP1B y GSTP1C. El alelo silvestre es GSTP1a. El alelo GSTP1b es polimórfico, se encuentra en el exón 5 y es el resultado de una sustitución de una base de ATC (Ile) a GTC (Val) en el codón 104. El tercer alelo, GSTP1c, el polimorfismo se encuentra en el exón 6 en el codón 113, resultado de una sustitución de una base de GCG (Ala) a GTG (Val) [4, 11].

Durante la fase secretoria de los ameloblastos, los xenobióticos reducen la producción de proteínas, lo que afecta directamente a los ameloblastos en el proceso de transcripción del esmalte, que se traducen en zonas hipo-mineralizadas, aumentando la porosidad del diente, creando susceptibilidad a la caries [11]. La participación de la carga génica en el desarrollo de la caries ha sido poco explorada. Hoy en día y particularmente sobre la asociación de los polimorfismos genéticos específicamente de la familia GST y el índice de caries se tienen pocos estudios. El objetivo de este estudio fue buscar la relación entre los polimorfismos de GSTM1, GSTT1 y GSTP1 con la incidencia de caries en individuos de origen mexicano.

7.1.5. Material y métodos

Grupo de estudio

Estudio transversal. Se realizó la invitación a participar a los individuos que acudían al Centro de Investigaciones en Ciencias Médicas, UAEM en el periodo de enero de 2017 a enero de 2018. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación en Ciencias Médicas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los que aceptaron participar, firmaron una carta de consentimiento o asentimiento informado. Se evaluó clínicamente el estado de salud de los dientes de acuerdo al odontograma. Se les tomó una muestra de sangre periférica de 4 mL en un tubo Vacutainer con heparina, mantenido en refrigeración hasta su procesamiento.

Evaluación del índice de caries

Se utilizó el índice cariado, perdido y obturado (CPOD), con la ayuda del odontograma, de acuerdo con los parámetros de la OMS [12, 13 ,14].

Identificación de los polimorfismos de GSTT1, GSTM1 y GSTP1

Con la muestra de sangre heparinizada se realizó la extracción de ADN. Se empleó el kit Quick-g DNA Mini Prep (Zymo Research), técnica de columnas. Los productos fueron verificados por electroforesis horizontal en agarosa al 1% [15, 16].

Polimorfismos de GSTM1 y GSTT1

La identificación de polimorfismos de T1 y M1 se realizó mediante PCR múltiple de punto final, empleando al gen CYPA1 como control. La mezcla tuvo un volumen final

de 50 μL . Contení 5 μL de PCR buffer 5x (Promega), 4 μL de MgCl_2 25 mM (Promega), 1 μL de dNTPs, 25 μM (Fermentas), 32.7 μL de H_2O grado biología molecular, 0.3 μL Taq polimerasa 5 U/ μL (Promega), 2 μL de ADN y 1 μL de cada iniciador CYP1A1-f, CYP1A1-r, GSTM1-f, GSTM1-r GSTT1-f, GSTT1-r. Todos los iniciadores tenían una concentración de 30 pM/ μL . Las condiciones de PCR fueron: 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de desnaturalización durante 45 segundos a 94°C, alineación por 45 segundos a 62°C, 45 segundos de extensión a 72°C, y elongación final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis con agarosa al 1.5%. La determinación del polimorfismo de GSTT1 se basó en la presencia de una banda de 480 pb, correspondiente a GSTT1 silvestre, mientras que su ausencia arroja GSTT1 nulo. De manera similar para GSTM1, la presencia de una banda de 215 pb indicó GSTM1 silvestre mientras que su ausencia implicó GSTM1 nulo. Finalmente, una banda de 312 pb, corresponde a CYP1A1 [4, 15, 16, 17].

Polimorfismos de GSTP1

La identificación de P1b (exón 5) y P1c (exón 6), se llevó a cabo en dos PCR diferentes. Una para cada polimorfismo, ambos con un volumen final de 25 μL , suficiente para la digestión enzimática. La mezcla de PCR contenía 2 μL de ADN, 5 μL de PCR 5x buffer (Promega), 4 μL de MgCl_2 25 mM (Promega), 0.3 μL de Taq polimerasa 5 U/ μL (Promega), 0.5 μL dNTPs 25 μM (Fermentas), 13.7 μL de H_2O grado biología molecular y 1 μL de cada iniciador según el gen que se amplificó: GSTP1b-f, GSTP1b-r; GSTP1c-f o GSTP1c-r. Todos los iniciadores tenían una concentración de 30 pM/ μL [4, 15, 16].

Para GSTP1c, las condiciones de la PCR fueron las mismas que para GSTT1 y GSTM1. Las condiciones de la PCR de GSTP1b fueron: 5 minutos a 94°C, desnaturalización de 45 segundos a 94°C, alineación de 45 segundos a 62°C, extensión 45 segundos a 72°C y una elongación final de 5 minutos a 72°C por 35 ciclos.

Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo utilizando BsmAI (Fermentas) para P1b (exón 5) y AciI (Fermentas) para P1c (exón 6). La mezcla de digestión consistió en 7 μL de H_2O grado biología molecular, 2 μL Digest Green buffer (Fermentas), 1 μL Digest Enzyme (Fermentas) y 10 μL de ADN producto de PCR, para un volumen total de 20 μL . Ambas reacciones de digestión se incubaron a 37°C durante 8 horas. Los productos de digestión se verificaron mediante electroforesis horizontal, usando una concentración de agarosa al 2%. La identificación de polimorfismos se basó en la presencia de

fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Para el exón 5, la presencia de los fragmentos de 176 pb, 91 pb y 85 pb corresponden a P1b heterocigoto. Mientras que los fragmentos de 91 pb y 85 pb corresponden a P1b homocigoto. Un solo fragmento de 176 pb indica P1b silvestre. En cuanto a los polimorfismos del exón 6, el fragmento de 332 pb corresponde a P1c homocigoto, tres fragmentos, 332 pb, 174 pb y 158 pb corresponden a P1c heterocigoto y dos fragmentos, 158 pb y 174 pb, a P1c silvestre [4, 15, 16, 17].

7.1.6. Resultados

Características sociodemográficas

Un total de 64 participantes, 24 hombres y 40 mujeres, con un promedio de edad de 35.5 ± 15.3 , originarios del Estado de México. El 85.7% aparentemente sano y 14.3% cursaban con una enfermedad crónica, entre ellas Hipertensión (8.9%), Artritis reumatoide (3.6%) y Diabetes tipo II (1.8%).

Índice CPOD vs polimorfismos de los genes GST M1, T1 y P1

Los polimorfismos de los genes GSTM1, T1 y P1 fueron: para M1 silvestre el 48.4% y M1 nulo 51.6% con un promedio CPOD de 6.1 ± 1.2 y 5.5 ± 1.4 respectivamente. Para T1 silvestre fue 73.4% y T1 nulo 26.6%, con un promedio CPOD de 6.6 ± 1.2 y 5.8 ± 1.1 respectivamente. Para P1, exón 5 (P1b), fueron 23.4% silvestres (a/a), 53.2% heterocigotos (a/b) y 23.4% homocigotos (b/b). El promedio CPOD fue 4.3 ± 0.9 , 6.6 ± 1.2 y 5.9 ± 1.3 respectivamente. Para el exón 6 (P1c), el 100% mostraron el genotipo silvestre y el promedio del índice CPOD fue de 6.4 ± 1.5 . Se realizó el análisis estadístico para buscar diferencias intra-génicas, es decir, entre los polimorfismos de cada gen. Para GSTM1 y T1 se aplicó U de Mann Whitney y para GSTP1 Kruskal Wallis. Ninguna de las comparaciones mostró diferencia significativa. En la Tabla 1 se muestra el detalle de los datos de cada gen, el promedio respectivo del índice CPOD \pm la desviación estándar y el valor de p.

Tabla 1. Índice CPOD vs los polimorfismos de cada uno de los genes GST

Genes	n (%)	Cariados $\square \pm Sd$	Perdidos $\square \pm Sd$	Obturados $\square \pm Sd$	CPOD $\square \pm Sd$	<i>p</i>
M1						
Silvestre	31(48.4)	2.9 \pm 0.8	1.5 \pm 1.1	2.9 \pm 0.3	6.1 \pm 1.2	0.64
Nulo	33(51.6)	2.4 \pm 1.8	0.7 \pm .1	2.4 \pm 0.9	5.5 \pm 1.4	
T1						

Silvestre	47(73.4)	2.2±0.4	1.1±0.9	2.7±1.1	6.6±1.2	0.94
Nulo	17(26.6)	2.3±1.2	1.1±0.8	2.4±0.7	5.8±1.1	
P1b						
a/a	15(23.4)	1.1±0.6	2.1±2.9	3.1±3.7	4.3±0.8	0.32
a/b	34(53.2)	3.3±0.3	0.7±0.6	2.6±1.6	6.6±1.2	
b/b	15(23.4)	2.7±1.2	0.9±0.3	2.3±0.9	5.7±1.3	
P1c						
a/a	64(100)	2.6±0.3	1.1±0.9	2.6±1.1	6.4±1.5	

Análisis estadístico de *U de Mann Whitney* para M1 y T1, *Kruskal Wallis* para P1b.

Índice CPOD vs Genotipos de GST combinados

Se agruparon los resultados de los genes identificados. Se encontraron 12 combinaciones diferentes en los 64 participantes. El genotipo más frecuente fue M1-/-; T1+/-; P1b a/b; P1c a/a en un 26.6%. Los menos frecuentes fueron M1 -/-; T1 -/-; P1b b/b; P1c a/a y M1-/-; T1-/-; P1b a/b; P1c a/a con 1.5% para cada uno. Se obtuvo el promedio del índice CPOD de cada uno de los 12 diferentes genotipos. Se organizaron de acuerdo a la magnitud del índice CPOD. En la figura 1 se presentan los resultados, ordenados del menor al mayor índice CPOD. En la parte superior de cada barra, se muestra el número de individuos que presentaron ese genotipo. El menor índice CPOD fue de 3 y el genotipo que lo obtuvo fue silvestre para todos los genes (M1+/-; T1+/-; P1b a/a; P1c a/a). El mayor índice CPOD registrado fue de 12 y el genotipo que lo presentó fue M1-/-; T1-/- P1b a/b; P1c a/a. Se consideró el índice CPOD del genotipo silvestre en los tres genes como basal, ya que además presentó el menor valor. Se realizó el análisis estadístico con U de Mann Whitney, para buscar diferencias entre el genotipo basal (# 1) vs cada uno de los otros genotipos. Se encontró una diferencia significativa entre el genotipo #1 y el #10, $p=0.021$. El análisis estadístico no fue posible para los genotipos #11 y 12, pues solo hubo un individuo con cada uno de ellos.



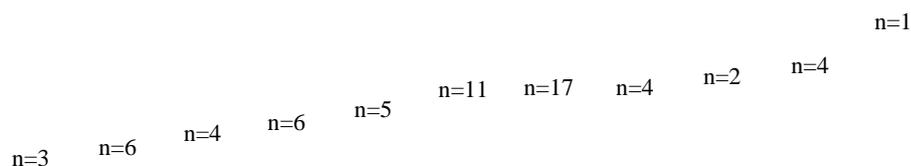


Figura 1. Resultados del Índice CPOD vs Genotipos combinados.
* *U de Mann Whitney*, genotipo #1 vs. #10 $p=0.021$.

7.1.7. Discusión

La caries es una enfermedad de etiología multifactorial, irreversible y acumulativa [18]. Dentro de los factores desencadenantes más conocidos de la caries se han identificado a los hábitos higiénicos bucales, la dieta y la edad. Recientemente, se tiene información de que los factores hormonales, diferente composición y tasa de flujo de salival así como el rol social en la familia también influyen. Los menos explorados son las variaciones genéticas [19].

La frecuencia del polimorfismos de GSTM1 nulo (51.6%) en este estudio, es similar a lo reportado por Mejía et al. y Montero et al. en una población mexicana, con 47.5% y 46.2% respectivamente [20, 21]. Comparándolos con las por frecuencias por etnias, Ye et al. reportaron GSTM1 nulo 50% en caucásicos y 51% en asiáticos. Salah et al. con 53.9% en la población de Túnez para este polimorfismo [22, 23]. Para GSTT1 nulo fue 26.6%, frecuencia semejante a lo reportado por Pérez et al. y Molina et al. 12% y 15% respectivamente en población mexicana [24, 25]. Esto difiere con la alta frecuencia reportada por Mejía et al. con 65% también en población mexicana [20]. Con respecto a GSTP1 exón 5, la frecuencia fue 53.2% heterocigoto (a/b) y 23.4% homocigoto (b/b), similar a lo reportado por Mejía et al. y Molina et al. en población mexicana de 51.9%, 50% en el genotipo heterocigoto y 35.6%, 21.1% en genotipo homocigoto respectivamente [20, 25]. En el genotipo GSTP1 exón 6, el 100% fue silvestre, en contraste con Mejía et al. y Ye et al. reportando 25.6% y 1% con genotipo heterocigoto [20, 22].

Existen pocos estudios en relación con la asociación de los genes de la familia GST y enfermedades de la cavidad oral. Pengfei y col. en 2016, encontraron que los polimorfismos de M1 y T1 se vinculan con un mayor riesgo de padecer leucoplasia oral. Al aplicar la razón de monomios para M1 y T1 encontraron diferencia significativa. Sin embargo en P1 no demostró significancia en relación con la leucoplasia oral [10]. De manera semejante ocurrió en un estudio de casos y controles realizado por Maximilran et al. 2015, quienes no encontraron riesgo de padecer carcinoma oral de células escamosas cuando se presenta M1 nulo. Mientras que para T1 nulo se asoció con un mayor riesgo de padecer carcinoma oral de células escamosas [26]. Esto difiere de nuestros resultados, ya que al comparar cada gen en forma individual contra sus índices CPOD, no obtuvimos diferencias significativas.

En los últimos años, la influencia de la carga génica con las diferentes enfermedades de la cavidad oral, ha sido el objetivo de algunos estudios. Wang et al. 2012, mediante el Genome Wide Association Study, encontraron que existe asociación entre los genes involucrados en la vía de señalización de MAPK como *RPS6KA2* y *PTK2B*, también los genes *TLR2*, involucrados en la respuesta inmune, con la caries [27]. Shimizuet et al. 2013, analizaron genotipos de familias en Filipinas asociados a la caries de la región *5q12.1-5q13.3*. Obtuvieron como resultados que el gen *BTF3* de la saliva, se encuentra asociado con un alto índice de caries [28]. En el presente estudio, al hacer las combinaciones de los tres genes de GST M1, T1 y P1, encontramos diferencias significativas entre el genotipo basal #1 y el genotipo #10. Los dos genotipos #11 y 12 tienen el índice CPOD aún más alto y además una fórmula con las mutaciones en los tres genes. Aumentar el tamaño de la muestra y como consecuencia el número de individuos de cada genotipo combinado, posiblemente permita establecer las diferencias significativas entre ellos, así como explorar otros genes con la misma enfermedad.

La presente investigación contribuye a demostrar que la carga génica juega un papel importante en el desarrollo de las enfermedades de la cavidad oral. Por otro lado, la aplicación de estos resultados en la consulta dental, tanto en la operatoria como en la prescripción de fármacos, permitirá ofrecer un manejo personalizado, si se conoce el genotipo del paciente.

7.1.8. Agradecimientos

A todos los individuos que voluntariamente participaron en la investigación. A los Maestros en Ciencias Fernando Mejía Sánchez, Jesús Enrique Sánchez Flores y a la QFB Diana Bautista Albiter personal del laboratorio de Biología Molecular, CICMED por su asesoría. Proyecto parcialmente financiado por COMECyT con número de convenio FECYT-2016-04.

7.1.9. Referencias del artículo

1. Fort A, Aida F, Alberto V, Silvia P, Ximena P, Pablo S, et al. Distribution of dental caries and its association with variables of social protection in children 12 years of age in the county of Avellaneda, Province of Buenos Aires. *Salud Colectiva*. 2017; 1(17):91-104.
2. World Health Organization. The WHO publishes a new report on the global problem of oral diseases [Online report]. Geneva. 2012. [Accessed on August 9, 2017]. Available at: www.who.int/medicacentre/factsheets/fs318/es/.
3. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales. Prevalencia de caries en México [online]. Mexico. 2015. [Accessed on November 5, 2017]. Available at: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212323/SIVEPAB-2015.pdf>.
4. Mejia F, Castillo J, Sanchez J. Development and application in Mexico of a method for the identification of polymorphisms of GSTP1. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2013; 4: 287-290.
5. Wu B, Dong B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012; 33: 656-668.
6. Hayes J, Jack U, Ian R. Glutathione transferases. *Pharmacology and Toxicology*. 2005; 45: 51-88.
7. Rodriguez M, Mejia F, Lecourtois M, Dominguez V, Castillo J. Influence of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms on the development of breast cancer. *Journal of Cancer Therapy*. 2014; 5: 552-559.
8. Hayes J, Pulford D. The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance Part II. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1995; 30: 521-600.
9. Osman F, Olanike A, Gamil A, Jia-Xi M, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human Glutathione S-Transferase P1 gene variants. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 272(15): 10004–10012.

- 10.- Pengfei H, Minghui W, Yuhong W, Qing L. Associations among Glutathione S-Transferase T1, M1 and P1 polymorphisms and the risk of oral leukoplakia. Genetic testing and molecular biomarkers. 2016; 20(6): 60-75.
11. Bonola I, Irigoyen E, Vera I, Campero A, Hamdan A. Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. Ciencias clínicas. 2015; 14(1): 3–11.
12. Katz S, James L, McDonald, George K. Odontología preventiva en acción. Médica Panamericana. 1975; 150-260.
13. World Health Organization. Oral Health Surveys: Basic methods 3rd. Geneva: WHO; 1997.
14. Molina N, Durán D, Castañeda C, Adriana M. Dental caries experience and its relation to oral hygiene in Mexican children. Gaceta Médica de México. 2015; 151: 455-9.
15. Quintana O, Cabrera P, Trevilla G, Barrera F, Juárez A, Castillo J. Relationship of polymorphisms of Glutathione S-Transferase GSTT1 and GSTM1 with the response to chemotherapy in Mexican women with advanced Breast Cancer. Journal of Cancer Therapy. 2011; 2: 354-361.
16. Mejia F, Castillo J, Sánchez J. Development and application in Mexico of a method for the identification of polymorphisms of GSTP. Journal of Medicine and Medical Sciences. 2013; 4(7): 287-290.
17. Rodríguez M, Mejia F, Lecourtois M, Sánchez J, Castillo J. Influencia de los polimorfismos de GSTT1, GSTM1 y GSTP1 en el desarrollo de cáncer de mama. Journal of Cancer Therapy. 2013. Published online <http://www.scirp.org/journal/jct>.
18. Kojima A, Ekuni D, Mizutani S, Furuta M, Irie K, Azuma T, et al. Relationships between self-rated oral health, subjective symptoms, oral health behavior and clinical conditions in Japanese university students: a cross-sectional survey at Okayama University. BMC Oral Health. 2013; 13: 62.
19. Sergei N, Tormod B, Tordis A. Dental caries experience and determinants in young adults of the Northern State Medical University, Arkhangelsk, North-West Russia: a cross-sectional study. BMC Oral Health. 2017; 17: 136.
20. Mejia F, Enríquez G, Flores M, Laguna A, Castillo J. Frequency of single and combined genotypes of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Mexican individuals: a pilot study. Biomedical Research 2017; 28 (7): 2961-2965.
21. Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía V, Serrano L. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. Human biology. 2007; 79: 299-312.

22. Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Danesh J. Five. Glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLoS medicine*. 2006; 3: e91.
23. Salah G, Kallabi F, Maatoug S, Mkaouar E, Fourati A, Fakhfakh F, et al. Polymorphisms of Glutathione S-transferases M1, T1, P1, and A1 genes in the Tunisian population: An intra and interethnic comparative approach. *Gene* 2012; 498: 317-322.
24. Perez R, Mendez I, Moreno H, Mendoza A, Martinez O. Genetic susceptibility to lung cancer based on candidate genes in a sample from the Mexican mestizo population: a case control study. *Lung*. 2014; 192: 167-173.
25. Molina E, Perez R, Rubio J, Petrosyan P, Cadena L. The GSTM1null (deletion) and MGMT84 rs12917 (Phe/Phe) haplotype are associated with bulky DNA adduct levels in human leukocytes. *Mutation Research*. 2013; 758: 62-68.
26. Maximilran K, Pabst A, Mahmoodi B, Becker B, Kämmerer P, Koch F. The impact of M1 and T1 polymorphism for the risk of oral cancer. *Clinical Oral Investigations*. 2015; 62: 10-28.
27. Wang X, Shaffer R, Zhen Zeng, Begum F, Vieira A, Noel J, et al. Genome-wide association Scan of dental caries in the permanent dentition. *BMC Oral Health*. 2012; 12: 57.
28. Shimizu T, Deeley K, Briseño J, Faraco M, Poletta F, et al. Fine-mapping of 5q12.1–13.3 unveils new genetic contributors to caries. *Caries Research*. 2013; 47(4): 273-83.

8. CONCLUSIONES

- Los hábitos higiénicos orales y dietéticos se relacionaron con el índice de caries.
- Se puede considerar la presente investigación como un estudio piloto.
- Aún con un tamaño de muestra pequeña, se encontró tendencia de incremento del índice de caries de acuerdo al genotipo con los tres genes.

8.1. RECOMENDACIONES

- Es deseable aumentar el tamaño de la muestra y como consecuencia el número de individuos de cada genotipo combinado, posiblemente permita establecer las diferencias

significativas entre los genotipos No. 1 (Basal) y los genotipos 11 y 12, además de encontrar nuevos genotipos donde se observe la participación del polimorfismo de GST P1c.

- Estos resultados invitan a la exploración de polimorfismos de otros genes de susceptibilidad relacionándolos con la frecuencia de caries.

9. REFERENCIAS TESIS

- 1.- Norman O. y F. García. (2005) *Odontología Preventiva Primaria*. 2° Edición. México. Editorial El manual moderno. Pp. 33-52.
- 2.- Ireland R. (2007) *Higiene Dental y Tratamiento*. 1° Edición. México. Editorial El Manual Moderno. Pp. 55-70.
- 3.- Thomas G. y H. Goldman. (1980) *Patología Oral*. 1° Edición. Barcelona. Editorial Salvat. Pp. 264-270.
- 4.- Organización Mundial de la Salud. (1984) “Metodología y programa de prevención de las enfermedades buco-dentales”. *Serie de Informes Técnicos*. Número 173. OMS. Pp. 10-19.
- 5.- Castellanos J. et al. (2013) “Remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental”. *Universidades Odontológicas*. Vol. 2. Oct 2013. Pp. 49-59.
- 6.- Barrios M. (1993) *Odontología: su fundamento biológico*. 1° Edición. Bogotá. Editorial Latros. Pp. 143-170.
- 7.- Anderson M. (2001) “Current concepts of dental caries and its prevention”. *Oper Dent*. Vol. 1. Oct. 2001. Pp. 11-18.
- 8.- Krasse B. (1985) *Caries Risk*. 1° Edición. Chicago. Editorial Quintessence. Pp. 15-29.
- 9.- Atkinson J. y A. Wu. (1994) “Salivary gland dysfunction: Causes, symptoms, treatment”. *Dent Assoc*. Vol. 15. 1994. Pp. 409-416.
- 10.- Jensen M. (1999) “Diet and dental caries”. *Dent Clin North Am*. Vol. 43. 1999. Pp. 615-633.
- 11.- Higashida B. (2000) *Odontología preventiva*. 1° Edición. México. Editorial McGraw-Hill interamericana. Pp. 158-179.
- 12.- Gutiérrez S. et al. (2013) “Caries dental: ¿Influyen la genética y la epigenética en su etiología?”. *Universitas Odontológica*. Vol. 32. Num. 69. Julio-diciembre 2013. Pp. 83-92.

- 13.- Conry J. et al. (1993) “Dental caries and treatment characteristics in humans twins reared apart”. *Arch Oral Biol.* Núm. 83. 1993. Pp. 937-943.
- 14.- Shaffer J. et al. (2015) “Genetic susceptibility to Dental Caries Differs between the Sexes: A Family-based Study”. *Caries Res.* Vol. 67. Núm. 3. January 2015. Pp. 133–140.
- 15.- Barrancos M. y P. Barrancos. (2006) *Operatoria Dental*. 4° Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. Pp. 289-310.
- 16.- Organización Mundial de la Salud (2012). “La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales”. [En línea]. Ginebra. Abril 2012. Disponible en: www.who.int/medicacentre/factsheets/fs318/es/. [Accesado el día 22 de septiembre de 2016].
17. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales. Prevalencia de caries en México [En línea]. México. 2015. [Consultado el día 5 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212323/SIVEPAB-2015.pdf>.
- 18.- Martínez K. et al. (2010) “Estudio epidemiológico sobre caries dental y necesidades de tratamiento en escolares de 6 a 12 años de edad en San Luis Potosí”. *Rev. de investigación Clínica*. Vol. 62. Núm. 3. 2010. Pp. 206-213.
- 19.- Torrades S. (2012) “Diversidad del genoma humano: los polimorfismos, Genética”, *OFFARM*, Vol. 21, Núm. 5. Mayo 2012. Pp. 156-170.
- 20.- Bonola I. et al. (2015) “Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal”. *Ciencias Clínicas*. Vol. 14. Núm. 1. Mayo 2015. Pp. 3–11.
- 21.- Klaassen C y Watkins J. *Fundamentos de Toxicología de Casarett y Doull*. 2005. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid. 1° Edición. Pp. 130-162.
- 22.- Martínez M. et al. (2016) “Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis”. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Vol. 40. Enero 2016. Pp.45-51.
- 23.- Sheehan D. et al. (2001) “Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily”. *Biochem J.* Vol. 360. 2001. Pp.1-16.
- 24.- Wu B. y D. Dong. (2012) “Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery”. *Trends Pharmacol Sci.* Vol. 33. 2012. Pp. 656-668.
- 25.- Hayes J. y J. Fanagan. (2005) “Glutathione transferases”. *Pharmacol Toxicol.* Vol. 45. March 2005. Pp. 51-88.

- 26.- Oliveira A. et al. (2010) “GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer”. *Gene Molec Res.* Vol. 9. Núm. 2. 2010. Pp. 1045-1053.
- 27.- Osman F. et al. (2011) “Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human Glutathione S-Transferase P1 gene variants”. *J Biol Chem.* Vol. 272. Núm. 15. 2011. Pp. 10004–10012.
- 28.- Pengfei H. et al. (2016) “Associations among Glutathione S-Transferase T1, M1 and P1 polymorphisms and the risk of oral leukoplakia” *Genetic testing and molecular biomarkers.* Vol. 20. Núm. 6. 2016. Pp. 60-75.
- 29.- Maximilran K. et al. (2015) “The impact of M1 and T1 polymorphism for the risk of oral cancer”. *Clin oral invest.* Vol. 62. January 2015. Pp. 10-28.
- 30.- Zhi-Jiang, et al. (2011) “Glutathione S-Transferase M1 and T1 null polymorphisms, smoking and their interaction in oral cancer”. *American Journal of Epidemiology.* Vol. 173. Núm. 8. 2011. Pp. 15-29.
- 31.- Sampieri, R. et al. (2014), *Metodología de la Investigación.* 6° Edición. México. Editorial Mc Graw Hill. Pp. 382-466.
- 32.- Wayne, D. (2006) *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud.* 4° Edición. México. Editorial Limusa Wiley.

10. ANEXOS:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ANEXO 1)



Título de la investigación: DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES M1, T1 Y P1 EN LA SUCEPTIBILIDAD A CARIES.

Se le está invitando a usted a participar, en este estudio de investigación médica. Antes de aceptar, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formato de consentimiento.

En este proyecto de investigación se: Identificarán las diferentes variaciones de los genes de la familia Glutación S-Transferasa particularmente M1, T1 y P1, para buscar su relación con la vulnerabilidad de presentar caries. Esta enfermedad es de alta prevalencia tanto en niños como en adultos, debido a que interactúan muchos factores hereditarios como ambientales en su desarrollo.

Procedimientos del estudio: Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder a un cuestionario acerca de sus hábitos higiénicos y dietéticos. Se realizará la detección de caries en todos los dientes y se tomará una muestra de 3 ml de sangre.

Es importante que usted esté enterado que el material que se utilizará es nuevo y estéril.

Posibles riesgos: Al hacer la toma de muestra, debido a la inserción de la aguja para extraer sangre, las personas sienten ligero dolor. Eventualmente el paciente puede presentar un moretón después de la toma de sangre.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se obtenga será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al cuestionario serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto anónimas.

Los beneficios que obtendrá al participar en el estudio, es el conocer el diagnóstico de caries de su boca, la evaluación de sus hábitos bucales (higiénicos y dietéticos), además de una aplicación de flúor, como medida preventiva a padecer caries, se le ofrecerán información suficiente para tratamiento oportuno de la caries al igual consejos como medidas preventivas a desarrollar la enfermedad. Si usted lo desea se le puede facilitar la obtención de los resultados de genotipificación.

Cualquier duda que tenga, siéntase en libertad de expresarla de manera que quede satisfecho. De antemano le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación. He sido informado (a) del objetivo de este estudio.

Me han indicado también que tendré que responder un cuestionario, me realizarán un diagnóstico de caries, y me tomarán una muestra de sangre.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona.

Entiendo que puedo conocer los resultados de este estudio cuando esté concluido.

Responsables de la investigación:

C.D. Albino Campos Díaz

Cel. 7225510882

Dra. en C.Q.B. Julieta Castillo Cadena

M. en Tan. Quetzalcóatl Hurtado Sánchez

Ph D. Antonio Laguna Camacho

CICMED

(7222) 12-80-27, ext. 157 y 130

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FIRMA TESTIGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



ASENTIMIENTO INFORMADO
(ANEXO 2)

Título de la investigación: DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES M1, T1 Y P1 EN LA SUCEPTIBILIDAD A CARIES.

Se te invita a participar, en esta investigación médica. Antes de aceptar, debes conocer y comprender en que consiste. Siéntate en libertad para preguntar sobre cualquier duda que tengas.

En esta investigación se: Observaran las diferentes variaciones de tu sangre, que se encuentran en unas partes muy pequeñas en tus células, llamadas genes, para buscar la relación con el desarrollo de que los dientes se piquen o tengan caries. La caries ataca a todos los niños y adultos por igual, y depende de muchos factores, entre ellas las que se encuentran en tu sangre.

Procedimiento: Si deseas participar en este estudio, se le pedirá responder a un cuestionario muy sencillo de tu alimentación y si te cepillas los dientes. Te revisaremos los dientes y te tomaremos una muestra de tu sangre.

Todo el material que se utilizará contigo es nuevo.

Posibles riesgos: Al hacer la toma de muestra, sentirás un ligero dolor. Puede presentarse un moretón después de la toma de sangre.

Los **beneficios** que tendrás si deseas participar, es saber en qué condiciones están tus dientes, saber si los estas cepillando adecuadamente, si estas comiendo muchos alimentos que te están picando los dientes, además se te aplicara un gel protector contra la caries.

Tu participación en el estudio es **voluntaria**, es decir, aun cuando tus papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema.

Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas, sólo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio y a tus padres.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una (X) en el cuadrito de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre. Si no quieres participar, no pongas ninguna (X), ni escribas tu nombre.

Sí quiero participar

Nombre: _____

Nombre y firma del padre o tutor:

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FIRMA TESTIGO

Responsables de la investigación:

C.D. Albino Campos Díaz

Cel. 7225510882

Dra. en C.Q.B. Julieta Castillo Cadena

M. en Tan. Quetzalcóatl Hurtado Sánchez

Ph D. Antonio Laguna Camacho

CICMED

(7222) 12-80-27, ext. 157 y 130



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FORMATO DE HÁBITOS HIGIÉNICOS BUCALES
(ANEXO 3)



Nombre: _____

Edad: _____

Folio: _____

Fecha: _____

Sexo: F ___ M ___

Lugar en la Familia: _____

Nota: marque la respuesta con una X.

- 1.- ¿Con qué frecuencia te lavas los dientes al día?
- | | |
|----------------|-----|
| -2 veces | () |
| -3 o más veces | () |
| -1 vez | () |

2.- ¿Usas cepillo dental?

-Si ()

-No ()

3.- ¿Usas pasta dental?

-Si ()

-No ()

4.- ¿Te cepillas la lengua?

-Si ()

-No ()

5.- ¿Conoces la técnica de cepillado?

-Si ()

-No ()

6.- ¿Cuándo es más frecuente que te laves los dientes?

Puedes marcar más de una opción

-Después del desayuno ()

-De la comida ()

-De la cena ()

7.- ¿Utilizas un auxiliar que ayude en tu higiene dental?

-Si ()

-No ()

8.- ¿Cuál?

9.- ¿Utilizas hilo dental?

-Si ()

-No ()

10.- ¿Con que frecuencia utilizas el hilo dental?

-1 a 2 veces al día ()

-1 vez a la semana ()

-1 o 2 veces mensual ()

11.- ¿Utilizas enjuague dental?

-Si ()

-No ()

12.- ¿Con que frecuencia utilizas enjuague bucal?

-1 a 2 veces al día ()

-1 vez a la semana ()

-1 o 2 veces mensual ()

13.- ¿Entre comidas te lavas los dientes?

-Si ()

-No ()

¡GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**



**FORMATO DE HÁBITOS DIETÉTICOS
(ANEXO 4)**

Título de la investigación: **DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES M1, T1 Y P1 EN LA SUCEPTIBILIDAD A CARIES.**

Nombre: _____

Edad: _____ Folio: _____ Fecha: _____

Sexo: F ___ M ___ Lugar en la Familia: _____

Nota: registre **TODOS LOS ALIMENTOS, CONSUMIDOS SÓLIDOS O LÍQUIDOS, DURANE 5 DIAS** incluyendo sábados y domingos. Anote todo lo que coma dentro y fuera de los horarios habituales, sean comidas en casa, en el auto, en el cine o mirando televisión. Asegúrese de incluir los caramelos, galletitas, dulces, chicles, jarabes para la tos y suspensiones. Esto es útil para indicar el camino a seguir para poder ayudar a mejorar sus condiciones bucales.

DÍA	DESAYUNO	COMIDA	MERIENDA	ALMUERSO	ENTRE COMIDAS
1					
2					
3					
4					
5					

EVALUACIÓN DE LA DIETA CARIOGENICA

FORMA DE ALIMENTO	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	1	2	3	4	5	CANTIDAD TOTAL DE EXPOSICIONES
AZUCARES EN SOLUCIÓN	DURANTE COMIDAS						
	ENTRE COMIDAS						
	AL ACOSTARSE						
ALIMENTOS SÓLIDOS RETENTIVOS QUE CONTENGAN AZUCAR	DURANTE COMIDAS						
	ENTRE COMIDAS						
	AL ACOSTARSE						

(ANEXO 6)

Método por columna para la extracción de DNA consta de los siguientes pasos:

- 1) Adicionar 400 μL de Genomic Lysis Buffer a 100 μL de sangre total.
- 2) Mezclar en el vortex de 4 a 6 segundos y dejar reposar a temperatura ambiente 5 minutos.
- 3) Transferir la mezcla a una columna colocada sobre un tubo colector,
- 4) Centrifugar la mezcla a 10 000 rpm durante 1 minuto.
- 5) Decantar el centrifugado y llevar la columna a un nuevo tubo colector.
- 6) Adicionar 200 μL de DNA Pre-Wash Buffer al interior de la columna.
- 7) Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto.
- 8) Adicionar 500 μL de g-DNA Wash Buffer al interior de la columna.
- 9) Centrifugar a 10 000 rpm por 1 minuto.
- 10) Transferir la columna a un tubo eppendorf.
- 11) Adicionar 50 μL de DNA Elution Buffer a 60 °C al interior de la columna.
- 12) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 13) Centrifugar a 14 500 rpm por 30 segundos para eluir el DNA de la columna.

Se verificara la efectividad de la extracción de DNA, mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 %, mezclándolo 8 μL de la muestra con 1 μL de buffer de carga Orange, dejándolo correr por 30 minutos a 100 V/35 A.

(ANEXO 7)**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. La reacción se lleva a cabo en un termociclador. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde de ADN, la enzima Taq polimerasa, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O .

La reacción en cadena de la polimerasa consta de varios pasos:

Desnaturalización, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T.

Hibridación, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.

Extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C

Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases que deberá ser conocido por el investigador.

(ANEXO 8)



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Toluca, México a
3 de Febrero del 2017

DR. J. AMADO LÓPEZ ARRIAGA
COORDINADOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICAS, UAEM
PRESENTE

Por medio de la presente, y de acuerdo a la plática sostenida en días pasados, me permito solicitar de manera formal, se nos permita el uso las instalaciones del Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) a su digno cargo, específicamente el consultorio dental (Lu Mi y Vi de 12 a 13 horas; y Ma y Ju de 12 a 18 horas) y el Laboratorio de Biología Molecular y Celular (Lu a Vi de 12 a 18 horas), para la realización del proyecto **"DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES M1, P1 Y T1 ANTE LA SUSCEPTIBILIDAD A CARIES"** del alumno **Albino Campos Díaz**, de la Maestría en Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina. Dicho proyecto es dirigido por el **M. en Tan. Quetzalcóatl Hurtado Sánchez**, el **Ph. D. Antonio Laguna Camacho** y su servidora como tutor académico.

Sin más por el momento, y en espera de una respuesta favorable, me despido enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO


DRA. en C.Q.B. JULIETA CASTILLO CADENA

C.c.p. Archivo






www.uaemex.mx