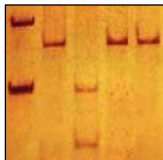


Correlación entre el polimorfismo 572C/G de la interleuquina 6 y la periodontitis crónica



Liu Jingjin, MSc¹/Guan Zemin, BSc²/Ma Xin, MSc³
Wu Donghong, MSc⁴/Geng Jianhua, BSc²
Yi Jie, BSc³/Wang Yonggong, MSc²

Los polimorfismos genéticos del gen de la interleuquina 6 (IL-6) se asocian a homeostasis ósea y a enfermedades que están caracterizadas por la pérdida de tejido óseo. El objetivo de este estudio consistió en investigar la correlación entre el polimorfismo 572C/G de la IL-6 y el riesgo de aparición de periodontitis crónica entre la población Han china. Este polimorfismo se genotipificó en 93 pacientes que sufrían periodontitis crónica y en 96 sujetos control mediante la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. Se extrajo una muestra de ADN de sangre periférica de los pacientes y de los sujetos control y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los genotipos de la IL-6 se identificaron usando para ello un gel de electroforesis. El genotipo 572 GG de la IL-6 y el alelo G se encontraban con más frecuencia entre los pacientes con periodontitis crónica que en los sujetos control ($P < 0,05$). Cuando se compararon con el genotipo CC la odds ratio para la periodontitis crónica fue de 1,88 (intervalo de confianza del 95 %, 1,04 a 3,40, $P < 0,05$) para el genotipo CG + GG. La frecuencia del genotipo -572 CG + GG era significativamente diferente entre el grupo control y el grupo experimental (con periodontitis crónica). Por ello, el polimorfismo 572C/G de la IL-6 puede contribuir a la susceptibilidad por la periodontitis crónica entre la población Han de la República China. (Rev Int Odontol Restaur Period 2010;14:300-305.)

¹Researcher, Dental College, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China.

²Professor, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Henan, China.

³Lecturer, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Henan, China.

⁴Associate Professor, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Henan, China.

Correspondencia: Dr Guan Zemin, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China 450003; fax: 0371-65964376; e-mail: gzm195005@126.com.

Entre la población Han de la República China es frecuente la aparición de periodontitis crónica (PC) y constituye una importante causa de pérdida dental entre la población adulta. A pesar de que se cree que existen factores de tipo microbiano y otros de tipo ambiental que influyen y modulan la aparición y en la progresión de la enfermedad periodontal, existen pruebas científicas sólidas que sugieren que la existencia de una base genética puede ejercer una importante influencia en la predisposición y progresión de las periodontopatías¹. No obstante, hasta el momento no ha podido definirse claramente la base genética de la PC.

La interleuquina 6 (IL-6) es una citquina multifuncional que interviene en el proceso de reabsorción ósea y de la degradación del colágeno, así como en las reacciones inflamatorias²⁻⁶. Los polimorfismos genéticos en el gen de la IL-6 también se asocian a homeostasis ósea. El polimorfismo de los alelos de la IL-6 puede producir diferentes cantidades de ARNm. El sitio polimórfico en la posición -572 del gen de

la IL-6 ha sido ampliamente estudiado, y existen informes sobre la asociación entre el genotipo IL-6 y los niveles de osteocalcina, así como asociaciones con la densidad mineral ósea en estudios poblacionales. La respuesta inflamatoria es uno de los componentes más importantes de la patogénesis de la PC, y la reabsorción ósea es uno de los principales cambios patológicos asociados a la PC. Por ello, la IL-6 es un gen candidato para determinar la susceptibilidad a esta patología.

Sin embargo, tan sólo se han realizado estudios limitados para investigar el papel que desempeñan los polimorfismos genéticos del gen de la IL-6. Los polimorfismos genéticos del gen de la IL-6 pueden ser útiles como marcadores para diagnosticar la susceptibilidad a la periodontitis. El objetivo de este estudio consistió en explorar la correlación entre el polimorfismo -572C/G del gen de la IL-6 y el riesgo de contraer PC en la población Han china.

Método y materiales

Población objeto de estudio

La población de estudio integró a 93 pacientes Han chinos con PC que habían sido referidos a la Clínica Periodontal del Hospital Popular de la Provincia de Henan y 96 sujetos control sanos emparejados por la raza (CS) que fueron incluidos para poder realizar la comparación. Los sujetos participaron en este estudio una vez hubieron firmado el consen-

timiento informado para el protocolo, que había sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Popular de la Provincia de Henan. Los criterios de inclusión para todos los participantes consistían en que tuvieran como mínimo 14 dientes, tener una edad comprendida entre los 25 y los 65 años, y el diagnóstico y la clasificación de la PC debían cumplir con los estándares descritos por Armitage y cols.⁷ El grupo de PC estaba compuesto de 52 hombres y 41 mujeres, y el grupo CS estaba constituido por 50 hombres y 46 mujeres. La edad media era de 48,6 para el grupo con PC y de 45 para el grupo de CS. Todos los individuos eran no fumadores. Ningún participante tenía antecedentes ni signos actuales de enfermedad sistémica ni llevaba aparatos ortodónticos.

Toma de muestras y análisis del polimorfismo IL-6 572

Se extrajo de cada participante una muestra de sangre periférica de 2 ml. Se aisló la leucomonocitosis de la sangre periférica con la ayuda de un medio separador de mono-leucocitos, y a continuación se extrajo el ADN por el medio de extracción de ADN a base de fenol-cloroformo.

La amplificación de las secuencias de IL-6 se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los genotipos para el polimorfismo -572C/G se determinaron utilizando imprimadores con las secuencias 5'-GGAGACGCCTT-GAAGTAACTGC-3' y 5'-GAGTTT-

Figura 1 Electroforesis con gel de agarosa al 2 % y tinción de bromuro de etidio. Como marcador se empleó DL2000; el producto de la RCP fue 163 bp.

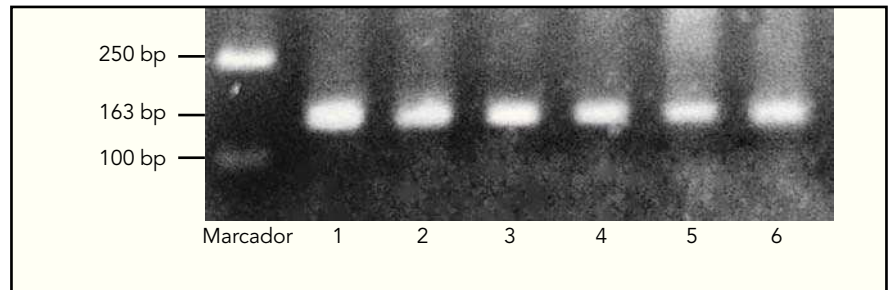
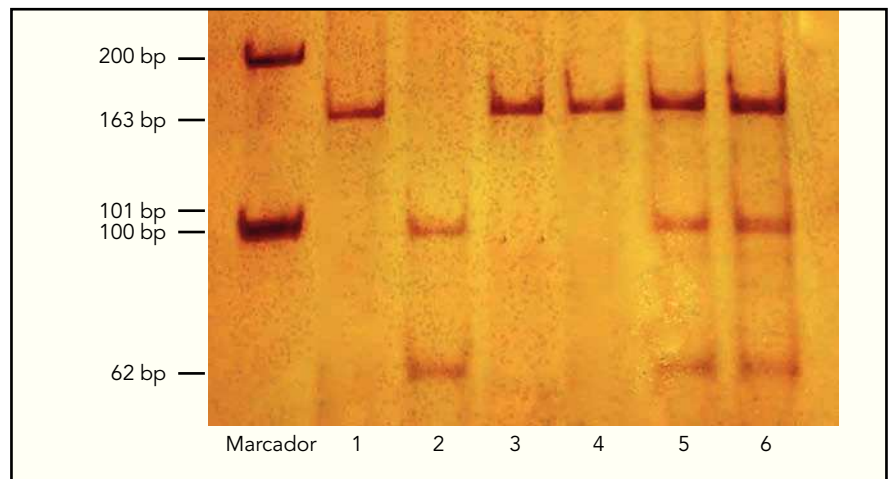


Figura 2 Electroforesis con gel de acrilamina al 10 % y tinción de plata. Como marcador se empleó DL100. Los pasos 1, 3 y 4 contienen muestras con el genotipo CC; las vías 5 y 6 contienen muestras con el genotipo CGC; la vía 2 contiene una muestra con el genotipo GG. La segmentación con Mbil derivó en la producción de múltiples fragmentos para cada genotipo; las muestras con un fragmento de 163 bp son CC; las muestras con tres fragmentos de 163 bp, 101 bp y 62 bp son CG, y las muestras con dos fragmentos de 101 bp y 62 bp son GG.



CCTCTGACTCCATC-GCAG-3'⁸ para generar un fragmento de RCP de 163 bp (figura 1). Posteriormente, este producto de la RCP fue metabolizado utilizando el enzima de restricción Mbil. La mezcla de CRP contiene 5 µL de ADN genómico, 12,5 µL de Martemis x 2 (Tiangen Bio), 0,5 µL de cada imprimador y 6,5 µL de agua doblemente destilada. El termociclado se realizó en un ciclador térmico y consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94 °C

durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 40 segundos, 55 °C durante 40 segundos, 72 °C durante 1 minuto y un paso final adicional de extensión de la cadena a 72 °C durante 5 minutos. Los fragmentos de RCP se metabolizaron por el enzima Mbil a 37 °C durante toda una noche y fueron separados posteriormente mediante electroforesis sobre un gel de poliacrilamida al 10 %, con tinción de plata (figura 2).

Resultados

Determinación de los genotipos

Tanto en la población con PC como en la HC se hallaron tres posibles genotipos. El más común fue el genotipo CC, seguido del genotipo CG y del GG, respectivamente. Las frecuencias del genotipo -572 en los pacientes con PC fueron del 52,69 % para el CC, 40,86 % para el CG y

Tabla 1 Frecuencia del genotipo de IL-6-572 en los grupos de PC y CS					
Genotipo	PC (%)	CS (%)	Odds ratio	95 % IC	P
CC	49 (52,69)	65 (67,71)	1,00		
CG	38 (40,86)	30 (31,25)			
GG	6 (6,45)	1 (1,08)	1,88	1,04–3,40	0,035
Total	93 (100)	96 (100)			

Test de tendencia, $P < 0,05$.

Tabla 2 Frecuencia del alelo IL-6-572 en los grupos de PC y CS					
Clase	Alelo (%)		Odds ratio	95 % IC	P
	G	C			
PC	50 (26,88)	136 (73,12)	1,84	1,12–3,03	0,016
CS	32 (16,67)	160 (83,33)			

6,45 % para el GG. Las frecuencias para el grupo de control del genotipo fueron del 67,71 % para el CC, 31,25 % para el CG y 1,08 % para el GG. Las distribuciones de cada genotipo en cada grupo eran congruentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). Sin embargo, se apreciaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos de la IL-6 entre ambos grupos ($P < 0,05$, tabla 1). Los individuos con cualquier forma del alelo G (genotipos GC o GG) eran 1,88 veces más susceptibles a sufrir una periodontopatía (*odds ratio*, 1,88; 95 % de intervalo de confianza, 1,12 hasta 3,03) y la probabilidad de que se produjera una invasión de PC aumentaba al incrementar el porcentaje de alelos G (χ^2 , 6,14; $P < 0,05$) (tabla 2).

Las frecuencias de los alelos G y C fueron 26,88 y 73,12 % en los

pacientes con PC, respectivamente, y 16,67 y 83,33 % para los sujetos del grupo control, respectivamente. Tanto el genotipo IL-6-572GG como el alelo G aparecieron con mayor frecuencia en los pacientes con PC que en el grupo de control ($P < 0,05$). La prevalencia del alelo -572 fue menor que la del alelo C en ambos grupos. Se registró una diferencia significativa en las frecuencias de los alelos G y C entre los dos grupos experimentales ($P < 0,05$). Al compararlo con el alelo C, la *odds ratio* del alelo G fue de 1,84.

Discusión

La PC es una enfermedad multifactorial, resultado de placas microbianas, reacciones inmunológicas del huésped, factores ambientales

y otros factores desconocidos. Previamente, los autores habían demostrado, en base a pruebas científicas, la existencia de agregación familiar en la PC, y que la gravedad de la PC está estrechamente relacionada con los factores genéticos⁹.

Son diferentes los genes que pueden influir en los distintos aspectos de la patología de la enfermedad¹⁰. El gen de la IL-6 humano se localizó en 7p (15-21) y consistió en 5 intrones y 4 exones. Se han identificado polimorfismos genéticos en la región promotora en las posiciones -597G/A, -597G/C, -373AnTn y -174G/C¹¹. Todos estos polimorfismos podrían cambiar la secuencia a la que se unen los factores de transcripción, de manera que inducirían o reducirían potencialmente la expresión y la regulación génica, que a su vez podría contribuir a la susceptibilidad de la enfermedad¹².

En este estudio se evaluó la asociación de los polimorfismos en el locus IL-6-572 con la PC entre la población Han china, y se compararon los genotipos de 93 pacientes con PC con los genotipos de 96 controles sanos mediante la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de longitud de fragmentos restringidos. Estos resultados mostraron que existía una correlación entre la PC y el polimorfismo genético en el locus IL-6-572, y que el alelo -572 G podría ser un factor de riesgo para contraer PC.

Todos los sujetos de este estudio eran no fumadores; esto se debe a que son conocidas las interacciones entre la enfermedad periodontal y el hábito tabáquico.

Por ello, la inclusión tanto de sujetos fumadores como no fumadores podía haber alterado los resultados. Estos resultados fundamentan la hipótesis de que existen diversos factores involucrados en la patogenia de la enfermedad periodontal.

Las frecuencias de los genotipos IL-6 y los alelos hallados en este estudio difieren ligeramente de las aportadas por Holla y cols.¹³ En este último estudio, el alelo C era protector, y no fue posible hallar el genotipo CC entre la población checa estudiada. Estas diferencias en la distribución de los genotipos puede ser el resultado de diferencias de tipo étnico. Sin embargo, tales diferencias también pueden indicar que existen distintos mecanismos huéspedes involucrados en la etiología de la periodontitis. Además, los resultados de este estudio citado

y los del presente estudio indican que los polimorfismos en el gen IL-6 pueden usarse para establecer las diferencias entre paciente con PC y sujetos sanos.

Conclusión

El resultado del estudio demostró que un 32,3 % de los portadores de -572G no sufrían PC, lo que demuestra a su vez que un factor de riesgo como el genotipo IL-6 puede estar presente, pero no está necesariamente siempre asociado a la enfermedad clínica. Por ello, estos individuos deberían estar controlados con objeto de evitar que desarrollen PC. Puede ser de gran importancia diagnóstica y terapéutica comprender la base genética de la susceptibilidad a la enfermedad periodontal.

Agradecimientos

Los autores recibieron becas del Fondo de Investigación Periodontal del Departamento de Salud de la Provincia de Henan.

Bibliografía

1. Michalowicz BS, Aeppli DP, Virag JG, et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991;62:293-299.
2. Naruishi K, Takashiba S, Nishimura F, et al. Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/slIL-6R. *J Dent Res* 2001;80:1421-1424.
3. Ling Y, Mingzhen X, Zhongying N. Experimental study on the growth of human pulpal cells and periodontal ligament cells by effects of IL-6. *Chinese J Conserv Dent* 1998;8:232-233.

4. O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, Puzas JE, Rosier RN, Hicks DG. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Invest* 1997;76:457-465.
5. de la Mata J, Uy HL, Guise TA, et al. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:2846-2852.
6. Omori K, Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, Takashiba S. High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:6643-6649.
7. Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* 2000;71:164-171.
8. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, et al. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1458-1463.
9. Zemin G. Family survey of periodontitis [abstract]. *J Huaxi Dent* 1999;3:217.
10. Inagaki K, Krall EA, Fleet JC, Garcia RI. Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. *J Periodontol* 2003;74:161-167.
11. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18134-18144.
12. Müller-Steinhardt M, Fricke L, Müller B, Ebel B, Kirchner H, Härtel C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 2004;4:402-406.
13. Holla LI, Fassmann A, Stejskalová A, Zhojil V, Vaněk J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75:30-36.