

EFFECTO DE LA INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO A NIVEL
SISTÉMICO A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN
PACIENTES PERIODONTALES Y CON APNEA OBSTRUCTIVA DEL
SUEÑO



VNIVERSITATIS VALÈNCIA
TESIS DOCTORAL

Programa de doctorado en Odontología (3143)

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament d'Estomatologia

Presentada por:

Cristina Collado Llinares

Dirigida por:

Dr. Fco. Javier Silvestre Donat

Dra. Marina Carrasco Llatas

Valencia, abril de 2024

EFFECTO DE LA INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO A NIVEL
SISTÉMICO A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN
PACIENTES PERIODONTALES Y CON APNEA OBSTRUCTIVA DEL
SUEÑO



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Programa de doctorado en Odontología (3143)

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament d'Estomatologia

Presentada por:

Cristina Collado Llinares

Dirigida por:

Dr. Fco. Javier Silvestre Donat

Dra. Marina Carrasco Llatas

Valencia, abril de 2024



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT D'ESTOMATOLOGIA

D. Francisco Javier Silvestre Donat

Catedrático del Departament d'Estomatologia de la Universitat de Valencia

Dña. Marina Carrasco Llatas

Médica Adjunta al Servicio de Otorrinolaringología Hospital Universitario Doctor Peset y
Profesora Asociada Asistencial de Otorrinolaringología de la Universitat de València.

CERTIFICAN

Que la presente tesis doctoral titulada: “Efecto de la inflamación de bajo grado a nivel sistémico a través del estudio de biomarcadores en pacientes periodontales y con Apnea Obstructiva del Sueño.”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Cristina Collado Llinares para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Odontología de la Universidad de Valencia.

Para que así conste a efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia abril de 2024.

D. Fco. Javier Silvestre Donat.

Dña. Marina Carrasco Llatas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis directores de tesis el Dr. Javier Silvestre Donat y la Dra. Marina Carrasco Llatas, por toda la confianza que depositaron en mí, valoro su esfuerzo y tiempo compartido. Gracias a ellos pude llegar hasta aquí.

Del mismo modo agradecer la ayuda incalculable que ha supuesto el trabajo del Dr. Diego Arroyo Andújar, director del laboratorio progenie Molecular y de la Dra. Laura Ramírez Jiménez, responsable del servicio de Genómica y Genética del Centro de Investigación Príncipe Felipe, para hacer frente al reto que supuso sacar adelante la parte de biología molecular de esta tesis.

A mi marido y mi hijo, por vuestro cariño y paciencia. Nunca os podré devolver el tiempo que os he quitado.

A mi hermana Marian y mi hermano Emilio, colaboraron activamente reclutando pacientes.

A mis compañeras y amigas Llanos y Lola, gran ejemplo de profesionalidad, por las horas compartidas en el hospital.

A Marta, mi segunda madre, y Jose, compañeros del servicio, mi soporte emocional.

Al personal de enfermería, Carmen y María, por no dudar en ayudarme con las extracciones de sangre, por esos buenos días “mis princesas”.

Al departamento de farmacia del hospital, concretamente a Ana y M^a Amparo de farmacocinética, por cederme un cajón del congelador para almacenar mis muestras, sus buenos días y consejos en la toma y tratamiento de las muestras.

Como dice un buen amigo las casualidades no existen, solo existe la causalidad y es por ello por lo que se cruzó en mi camino una persona excepcional. Una persona con una gran intuición, con un dominio de la informática y una empatía tan grande que siempre está dispuesto a ayudar a la velocidad de un clic ofreciendo siempre una salida cuando me atasco. Un amigo con nombre propio J.L. Valiño Martínez.

Y, sobre todo, a los verdaderos protagonistas del estudio, los pacientes por su colaboración y continuas muestras de ánimo.

La vida está llena de gente maravillosa.

En este trabajo hay mucho de mí, determinación, pasión, lágrimas y concretamente 157.300 pasos que tuve que correr, desde nuestro servicio hasta el congelador, lo que viene siendo un Ultra Trail, 110 km.

Gracias a todos por dejarme ser.

“La gente nos ve y se fija de dónde venimos
cuando debería fijarse a dónde vamos.”

John Dillinger.

Enemigos públicos.

ÍNDICE GENERAL

1.Introducción	16
2.Revisión de la literatura.	
2.1. Enfermedad periodontal	20
2.1.1. Epidemiología de la enfermedad periodontal.	
2.1.2 Etiopatogenia de la enfermedad periodontal.	
2.1.3. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal.	
2.1.4. Clasificación actual de la enfermedad periodontal.	
2.1.5. Tratamiento de la enfermedad periodontal.	
2.2. Apnea Obstructiva (AOS)	27
2.2.1. Epidemiología: prevalencia de la OAS.	
2.2.2. Diagnóstico de la AOS.	
2.2.3. Anamnesis del sueño.	
2.2.4. Gravedad de la AOS.	
2.2.5. Tratamiento de la AOS.	
2.3. Relación entre la AOS y la periodontitis	34
2.4.¿Qué es un biomarcador?	36
2.5.¿Qué es la inflamación de bajo grado (IGL)?	37
2.6.¿Por qué los marcadores hematológicos pueden ser considerados como biomarcadores?	40
2.7. Conexión grasa-hueso.....	41
3.Las ventajas de la Biología Molecular. La saliva.....	43
4. La Leptina y el Receptor de la Leptina: definición y funciones.....	47
5.CCL2: definición y funciones	52
6.Justificación e hipótesis	54
7.Objetivos.....	56
8.Material y método.....	57
8.1. Diseño y ámbito del estudio.	
8.2. Selección y muestreo de pacientes.	

8.2.1. Criterios de inclusión de los pacientes.	
8.2.2. Criterios de exclusión de los pacientes.	
8.3. Control de sesgos.....	60
8.4. Análisis estadístico	73
9.Resultados	74
9.1. Marcadores inflamatorios según grupo.	
9.2. Marcadores inflamatorios según variables periodontales.	
9.3. Comparativa entre estadio/grado entre grupos noAOS+EP y AOS+EP.	
9.4. Relación entre estadio / grado con nivel ODI en AOS+EP.	
9.5. Relación entre marcadores inflamatorios con nivel de ODI en AOS+noEP y AOS+EP.	
9.6. Relación del IMC con estadio y grado en no AOS+EP y AOS+EP.	
9.7. Correlación entre ARNm de CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPr intra y entre grupos.	
9.8. Relación de la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con parámetros de interés en el grupo noAOS+EP.	
9.9. Relación de la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con parámetros de interés en el grupo AOS+EP.	
9.10. Relación de la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con parámetros de interés en el grupo AOS+noEP.	
10. Discusión.....	106
11.Conclusiones.....	117
12.Bibliografía.....	118
13. Anexos.....	135
13.1. Hoja de información al paciente.	
13.2. Consentimiento informado.	
13.3. Documento del CEIC.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de la periodontitis por estadios. Adaptado de Tonetti y cols. (2018).

Figura 2: Clasificación de la periodontitis por grados. Adaptado de Tonetti y cols. (2018).

Figura 3: Mecanismo inflamatorio del proceso de la pérdida de hueso en la enfermedad periodontal. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystone, pathobionts, and host response. Trends Immunol. 2014 Jan;35(1):3-11.

Figura 4: Esquema de las formas corta y larga del receptor de la leptina.

Figura 5: Efectos de la leptina sobre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.

Figura 6: Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Figura 7: Laboratorio Progenie Molecular.

Figura 8: Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

Figura 9: RNAprotect^R Saliva Reagent.

Figura 10: Gabinete de trabajo del Hospital universitario Doctor Peset.

Figura 11: PCR de ADN de la leptina.

Figura 12: Preparación toma muestra de saliva.

Figura 13: Precipitado.

Figura 14: Curva de amplificación qPCR de LEPR.

Figura 15: Curva de amplificación de RLP19 (housekeeping).

Figura 16: Árbol clínico para la clasificación por estadio.

Figura 17: Árbol clínico para el diagnóstico por grado.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Síntomas nocturnos-diurnos predictivos de la AOS.

Tabla 2: Escala de somnolencia de Epworth.

Tabla 3: Clasificación de la obesidad según la OMS.

Tabla 4: Clasificación de la gravedad de la AOS.

Tabla 5: Valoración de gravedad de la AOS según Documento Internacional de Consenso.

Tabla 6: Primers utilizados.

Tabla 7: Relación ODI con Estadio y Grado en AOS+EP.

Tabla 8: Relación entre marcadores inflamatorios y ODI en AOS+no EP.

Tabla 9: Relación entre marcadores inflamatorios y ODI en AOS+EP.

Tabla 10: Relación entre IMC y Estadio y Grado en noAOS+EP.

Tabla 11: Relación entre IMC y Estadio y Grado en AOS+EP.

Tabla 12: Relación entre ARNm CCL2 y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio para grupo noAOS+EP.

Tabla 13: Relación entre ARNm LEP y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio para grupo noAOS+EP.

Tabla 14: Relación entre ARNm LEPR y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio para grupo noAOS+EP.

Tabla 15: Relación entre ARNm CCL2 y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+EP.

Tabla 16: Relación entre ARNm LEP y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+EP.

Tabla 17: Relación entre ARNm LEPR y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+EP.

Tabla 18: Relación entre ARNm CCL2 y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+noEP.

Tabla 19: Relación entre ARNm LEP y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+noEP.

Tabla 20: Relación entre ARNm LEPR y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, Fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+noEP.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribución ratio NLR.

Gráfico 2: Distribución ratio LMR.

Gráfico 3: Distribución ratio PLR.

Gráfico 4: Distribución de la PCR.

Gráfico 5: Distribución de la IL-6.

Gráfico6: Distribución de HDL.

Gráfico 7: Distribución del Fibrinógeno.

Gráfico 8: Correlación entre la Ratio PO/E y Fibrinógeno en no AOS+EP.

Gráfico 9: Correlación entre Pérdida Ósea y Fibrinógeno en noAOS+EP.

Gráfico 10: Correlación entre la ratio LMR y el Grado de la enfermedad periodontal en AOS+EP.

Gráfico 11: Correlación entre la ratio PLR y el Grado de la enfermedad periodontal en AOS+EP.

Gráfico 12: Correlación entre la ratio NLR y el Grado de la enfermedad periodontal en AOS+EP.

Gráfico 13: Correlación entre la ratio PO/E y la PCR en AOS+EP.

Gráfico 14: Correlación entre Pérdida Ósea y PCR en AOS+EP.

Gráfico 15: Distribución del Estadio periodontal en AOS+EP y no AOS+EP.

Gráfico 16: Distribución del Grado periodontal en AOS+EP y noAOS+EP.

Gráfico 17: Expresión relativa del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR en cada grupo.

Gráfico 18: Correlación entre ARNm LEP y ARNm LEPR en noAOS+EP.

Gráfico 19: Correlación entre ARNm LEP y ARNm LEPR en AOS+noEP.

Gráfico 20: Correlación entre ARNm LEP y ARNm LEPR en AOS+EP.

Gráfico 21: Correlación entre ARNm LEPR y el IMC en noAOS+EP.

Gráfico 22: Correlación entre ARNm LEPR y la ratio NLR en no AOS+EP.

Gráfico 23: Correlación entre ARNm CCL2 y HDL en AOS+EP.

Gráfico 24: Correlación entre ARNm LEP y la ratio NLR en AOS+EP.

Gráfico 25: Correlación entre la expresión de ARNm LEPR y la ratio NLR en AOS+EP.

Gráfico 26: Correlación entre la expresión de ARNm LEP y la ratio NLR en AOS+no EP.

Gráfico 27: Correlación entre el ARNm Lep y ODI en AOS+no EP.

Gráfico 28: Correlación entre ARNm LEPR y el IMC en AOS+no EP.

Gráfico 29: Correlación entre ARNm LEPR y la ratio NLR en AOS+noEP.

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- AKT:** proteína kinasa B.
- AOS:** apnea obstructiva del sueño.
- ARNm:** ARN mensajero.
- CAL:** pérdida de inserción clínica.
- CCL2:** quimiocina CC20.
- CD:** células dendríticas.
- CDI:** Clostridium difficile.
- cDNA:** ADN complementario.
- CPAP:** presión positiva continua en las vías respiratorias.
- Ct o Cq:** ciclo umbral.
- DAM:** dispositivos endo-orales de avance mandibular.
- Dct:** delta Ct.
- 2DDCt:** 2 Delta-Delta Ct.
- DMO:** densidad de masa ósea.
- ECG:** electrocardiografía.
- EEG:** electroencefalografía.
- EFP:** Federación Europea de Periodoncia.
- EMG:** electromiografía.
- EOG:** electrooculografía.
- ERAM:** esfuerzo respiratorio asociado a microdespertar.
- ErK:** quinasa regulada por señales extracelulares.
- G-CSF:** factor estimulador de colonias de granulocitos.
- HDL:** lipoproteína de alta densidad.
- IAH:** índice de apnea hipoapnea.
- IGL:** inflamación de bajo grado.
- IL- β :** interleuquina beta.
- IL-3:** interleuquina 3.
- IL-6:** interleuquina 6.
- IL-8:** interleuquina 8.

IL-11: interleuquina 11.

IL-12: interleuquina 12.

IL-17: interleukina 17.

IMC: índice de masa corporal.

JAK: proteínas-quinasas de la familia Janus.

kDA: KiloDalton.

LEPR: receptor de leptina.

LMR: proporción linfocitos y monocitos.

LPS: polisacárido.

NK: natural killer.

NLR: proporción neutrófilos y linfocitos.

obRb: isoforma larga del receptor de la leptina.

ODI: índice de desaturación de oxígeno.

OPG/RANKL: Osteoprotegerin/ Receptor Activator for nuclear Factor.

PC: periodontitis crónica.

PCR-ultrasensible: proteína C reactiva ultrasensible.

PGE2: prostaglandina E2.

PIC: pérdida de inserción clínica.

PLR: proporción plaquetas y leucocitos.

PR: poligrafía respiratoria.

PSG: polisomnografía.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RI: resistencia a la insulina.

RLO: radicales libres de oxígeno.

RT: retrotranscripción.

RX: radiografía.

SaO2: saturación de oxígeno.

SAT: proteínas transductores de señal y activadoras de la transcripción.

Th1: linfocitos T helper 1.

Th17: linfocitos T helper 17.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

Introducción.

Las enfermedades periodontales constituyen un grupo de patologías de carácter inflamatorio e infeccioso que afectan a los tejidos de soporte, tanto del diente como de los implantes (1). Para que exista salud periodontal es necesario un estado inflamatorio controlado que permita la homeostasis huésped microorganismo. Sin embargo, cualquier defecto en las condiciones genético-ambientales como inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, enfermedades tales como la diabetes, la obesidad, la apnea obstructiva del sueño (AOS), solas o combinadas, pueden contribuir a una inclinación desfavorable del equilibrio periodontal homeostático (2,3).

Dada la elevada prevalencia de la periodontitis, que oscila entre el 20% y el 50% en la población general (4), y en el caso de la AOS, estudios recientes reportan una prevalencia del 3%-17%, con mayor incidencia en varones entre la 5ª y 7ª década de vida (5), podemos deducir que la periodontitis y la AOS, son dos patologías de gran impacto sobre el sistema sanitario.

La evidencia de que los mediadores inflamatorios juegan un importante papel en la patogenia de la AOS y de la Enfermedad Periodontal, así como que ambas comparten factores de riesgo común, podrían sugerir una asociación entre ellas (6).

La integración de biomarcadores en nuestra práctica clínica puede resultar muy útil tanto para el diagnóstico de las enfermedades, como para el seguimiento de estas, incluso para crear protocolos de tratamientos (7).

Si por definición un marcador biológico resulta muy útil como método no invasivo para el diagnóstico (7), partiendo de esa premisa, ¿podríamos buscar posibles biomarcadores en una analítica básica de sangre o una simple muestra de saliva?

¿Qué biomarcadores vamos a considerar en una analítica de sangre?

Los mediadores inflamatorios liberados en la enfermedad periodontal propiciarían un ambiente inflamatorio de bajo grado (IGL) y activarían el sistema inmune iniciando una respuesta de fase aguda.

Después de recibir el estímulo de las citoquinas inflamatorias, las quimiocinas serían secretadas para el reclutamiento celular, por lo que analizar el recuento de elementos

celulares sanguíneos tales como el índice de neutrófilos/linfocitos (NLR), el índice de plaquetas/leucocitos (PLR) y la proporción de linfocitos/monocitos (LMR) podría aportarnos datos sobre el efecto de la IGL que supone la enfermedad periodontal en la inflamación sistémica de los pacientes AOS con enfermedad periodontal y en los pacientes periodontales no AOS. Es decir, el conteo de estas células, se podrían considerar como biomarcadores cuya concentración aumentaría o disminuiría durante estados inflamatorios o infecciosos, lo que nos serviría como elemento diagnóstico y también terapéutico, al poder definir la presencia y el grado del proceso (8). No dejando al margen otros marcadores inflamatorios comunes para ambas patologías tales como el fibrinógeno, la proteína C reactiva ultrasensible (PCR ultrasensible) y la IL-6 (9). Por otra parte, una de las características clínicas más importantes de la enfermedad periodontal es el proceso de reabsorción del hueso que sirve de soporte al diente o al implante, por lo que sería interesante poder disponer de un posible marcador en nuestras analíticas que pudiera estar íntimamente relacionado. La relación entre el tejido óseo y el tejido adiposo ha sido una cuestión ampliamente debatida.

Aunque históricamente se le atribuye a la grasa un efecto protector frente a la pérdida de masa ósea, en la última década hay estudios que evidencian una relación inversa donde niveles altos de lipoproteína de alta densidad (HDL) reducen el número y la función de los osteoblastos (10) por lo que variaciones en su concentración podrían asociarse con procesos reabsortivos en el tejido óseo.

Así pues, si los estadios de la clasificación periodontal nos hablan de la gravedad actual del proceso, el recuento de células sanguíneas nos hablan de la inflamación local, los grados de la enfermedad nos hablan de la dificultad de manejo y progresión, los marcadores inflamatorios hematológicos nos hablan de la inflamación sistémica y los niveles de lípidos se relacionan con el metabolismo óseo ***¿podemos establecer una relación entre las concentraciones de estos marcadores biológicos obtenidos de una analítica básica de sangre y los estadios y grados de la enfermedad periodontal, la severidad de la AOS y el efecto de la periodontitis en el paciente AOS?***

¿Qué biomarcadores vamos a considerar en la muestra de saliva?

La leptina es una citoquina cuyo aumento de nivel puede suponer un mecanismo de defensa del huésped durante un proceso infeccioso. La leptina y el receptor de la leptina deben considerarse para la investigación como un marcador de inflamación y activación del sistema inmune. La leptina y su receptor comparten características estructurales y funcionales (11).

Hay estudios donde se observa una asociación entre los niveles de leptina, la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), concluyendo que durante las infecciones la leptina se libera en respuesta al estrés, actuando como un reactante de fase aguda (12). Es decir, se comporta como una proteína cuya concentración aumenta o disminuye durante estados inflamatorios o infecciosos, lo que nos sirve como elemento diagnóstico y también pronóstico al poder definir la presencia y el grado del proceso.

Las adipokinas son liberadas por los adipocitos y regulan la inflamación induciendo la liberación de TNF- α e IL-6, claves en el inicio y mantenimiento de la inflamación sistémica por los linfocitos, neutrófilos y macrófagos (13).

La fisiopatología de la AOS también contribuye a cambios inflamatorios, con aumento de citoquinas plasmáticas (TNF- α , IL-6) y los niveles de leptina.

A su vez, la saturación mínima de oxígeno (SaO₂) y el volumen de grasa visceral se relaciona con unos niveles altos de IL-6 y PCR ultrasensible, siendo la gravedad de la AOS, predictora de los niveles de IL-6 y PCR ultrasensible (14).

El estudio de Isler y cols. reveló que los niveles de ARNm de leptina, en los tejidos conectivos inflamados de los pacientes periodontales eran más altos que el de los tejidos sanos del grupo control no periodontal (15).

Un estudio anterior, el de Becker y cols. informó de la implicación de ARNm de leptina en los mecanismos fisiopatológicos de la periodontitis, demostrando que la regulación de los transcriptores relacionados con la respuesta a molécula de origen bacteriano se expresa con fuerza en la periodontitis. Estos autores concluyeron que el patrón de expresión de ARNm de la leptina en saliva permitía discriminar entre periodontitis y pacientes sanos obteniendo resultados comparables a los obtenidos en las muestras de biopsia de tejido (16).

Del mismo modo, los niveles de la proteína quimioatrayente de monocitos (CCL2) se encuentran elevados en biopsias gingivales y en suero en los pacientes periodontales (17). La CCL2 es la principal quimiocina implicada en la inflamación endotelial que, como se sabe, supone una de las complicaciones más importantes en la AOS presentando, además, una asociación clara con la enfermedad periodontal. La CCL2, como quimiocina que es, actuaría atrayendo a los monocitos y a los macrófagos para que infiltraran el endotelio al igual que ocurre en el periodonto (18).

Teixerál y cols. realizaron un estudio para analizar los niveles de marcadores inflamatorios en pacientes periodontales en su caso, TREM-1/PGLYRP1/MMP-8 mostrando la utilidad de las muestras de saliva para la determinación de marcadores inflamatorios (19).

En base a esta información y continuando con la premisa de cumplir la característica básica de un biomarcador.

¿Por qué no plantearnos el análisis de la expresión del ARNm de la leptina, del ARNm del receptor de la leptina y el ARNm de CCL2 en la saliva como método sencillo y no invasivo en lugar de una biopsia de tejido?

Así pues, el objetivo del presente trabajo ha sido:

- estudiar el efecto que la inflamación de bajo grado, asociada a la enfermedad periodontal, produce a nivel sistémico en un grupo de pacientes diagnosticados de periodontitis, AOS con periodontitis y AOS sin periodontitis.
- valorar si las concentraciones de NLR, MLR, PLR, HDL, IL-6, PCR ultrasensible y el fibrinógeno obtenido en una analítica de sangre, presentan variaciones entre los distintos grupos de estudio y podrían ser utilizados como posibles biomarcadores.
- determinar si los niveles de expresión de ARNm de la leptina, ARNm del receptor de la leptina y ARNm de la CCL2 obtenidos en la saliva se comportarían como biomarcadores cuyas concentraciones aumentarían o disminuirían según los estadios y grados de la enfermedad periodontal y la gravedad del AOS.

2. Revisión de la literatura.

A continuación, nos disponemos a describir los distintos componentes de esta tesis doctoral con mayor detenimiento, siguiendo el orden en que han sido introducidos, así como la relación existente entre ellos para justificar el objetivo de nuestro estudio.

2.1. Enfermedad periodontal.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a biofilms de placa bacteriana disbiótica con la consecuente destrucción progresiva del aparato de sostén del diente (1). Actualmente se sabe que la exposición bacteriana es imprescindible para que se inicie la enfermedad periodontal, pero el fenotipo de la enfermedad viene determinado por la respuesta del huésped. Las variaciones epigenéticas y los polimorfismos pueden alterar las respuestas tanto innatas como adaptativas, lo que lleva a variaciones en la respuesta de cada individuo, en la expresión clínica de la inflamación, así como la respuesta al tratamiento (20). Esta inflamación iniciada por el biofilm conduce a la pérdida de inserción periodontal.

Se establece como umbral una pérdida de inserción clínica interproximal ≥ 2 mm o ≥ 3 mm en dos o más dientes no adyacentes, una pérdida de inserción clínica vestibular ≥ 3 mm con bolsas > 3 mm en dos o más dientes.

La definición actual de periodontitis se basa en la presencia de uno de estos factores:

- Pérdida de inserción clínica (CAL) interdental en dos o más dientes no adyacentes, o bien
- CAL vestibular ≥ 3 mm con bolsas de > 3 mm en dos o más dientes.

La presencia de elementos multifactoriales como el tabaco actúan en las respuestas inflamatorias del individuo, haciendo que los cambios disbióticos sean más probables en unos pacientes que en otros, pudiendo influir en la gravedad de la enfermedad.

2.1.1. Epidemiología de la enfermedad periodontal.

En la población general, la prevalencia de periodontitis oscila entre el 20% y el 50%, representando las formas leves entre el 45% y el 50% y las formas severas, el 9-11% de la población mundial (4).

El porcentaje de sujetos sin ningún signo de enfermedad periodontal es del 19% en los adultos jóvenes (35-44 años) y del 11% en los adultos mayores (65-74 años) según la última Encuesta de Salud Oral en España del año 2015. El porcentaje de individuos con cálculo (sin bolsas periodontales) es del 41% en la cohorte de 35-44 años y del 36% en los adultos de 65-74 años. La prevalencia de bolsas periodontales de 4-5 mm es de 19% y 27%, y de bolsas profundas (≥ 6 mm) de 6% y de 10%, en las cohortes de 35-44 y 65-74 años, respectivamente (21).

2.1.2. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal.

La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria crónica multifactorial desencadenada por un biofilm disbiótico y perpetuada por una respuesta inmune exagerada del huésped. Hasta hace poco se consideraba que la presencia de determinados organismos tales como *Porphyromona Gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* constituían el principal factor etiopatogénico de la periodontitis. Sin embargo, basándonos en enfoques más recientes se puede sugerir que la patogenia de la periodontitis precisa de un ambiente disbiótico donde distintas especies de microorganismos actúan sinérgicamente.

Para que exista salud periodontal es preciso exista un estado inflamatorio controlado que permita la homeostasis huésped-microorganismo. No obstante, cualquier defecto en las condiciones genético-ambientales, definitorias del concepto “huésped susceptible” como las inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, enfermedades sistémicas tales como diabetes, obesidad, AOS y factores ambientales, como tabaquismo, dieta inadecuada y estrés, solas o combinadas, pueden contribuir a una inclinación desfavorable del equilibrio homeostático (2,3).

La *P.Gingivalis* podría dañar las defensas del huésped (22) actuando como el director de otras especies comensales que en tal situación de desequilibrio presentarían un potencial inflamatorio (23). También le es atribuida a la *P.Gingivalis* la capacidad de modificar la

respuesta inmune adaptativa favoreciendo una inflamación mediada por los linfocitos T Helper 17 (Th17) menos eficaz que si estuviera mediada por los T Helper 1 (Th1) (24). Conforme aumenta la inflamación periodontal aumenta la biomasa bacteriana incrementándose la población de organismos ya presentes que pasan a ser dominantes en lugar de la aparición de especies nuevas (4).

La inflamación supondría una fuente importante de nutrientes para la flora microbiana que depende de fuentes no carbohidratadas para obtener energía, ejerciendo así una poderosa influencia en la composición del microbiota periodontal y estableciendo un cuadro de autoperpetuación entre microorganismos e inflamación.

Por tanto, la transición hacia la periodontitis requiere de un microbiota disbiótica en un huésped susceptible donde las comunidades de microorganismos establecen relaciones de sinergismo para mejorar la colonización y la obtención de nutrientes, manteniendo así el ambiente inflamatorio cuya importancia radica principalmente en continuar proporcionando nutrientes esenciales produciendo daños colaterales en los tejidos periodontales (inflamofilia).

Dicho en términos simples, las bacterias no causan inflamación para destruir el tejido periodontal sino para obtener su alimento.

2.1.3. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal.

Entre los factores de riesgo destacamos características del sujeto como la edad, el sexo y la raza. La prevalencia y severidad de la periodontitis incrementa con la edad, así como existe una mayor prevalencia en los hombres.

Factores de riesgo genéticos que condicionan la respuesta del hospedador frente a las agresiones bacterianas, lo que explica la susceptibilidad individual. Michalowicz y cols. (1991) se centraron en el estudio de gemelos mono y bicigóticos, demostrando que la herencia genética puede suponer un 50% de riesgo para el desarrollo de periodontitis, aunque también puede estar influenciada por exposición a factores comunes dentro de la misma familia, como la educación, el nivel socioeconómico, hábitos de higiene oral, tabaquismo, posible transmisión de bacterias y enfermedades crónicas como la diabetes (25).

Factores de riesgo local: se incluyen características anatómicas y tratamientos odontológicos incorrectos que favorecen la retención de placa bacteriana y cálculo.

Factores de riesgo sistémico: entre las condiciones y enfermedades sistémicas consideradas como factor de riesgo de enfermedad periodontal se encuentran principalmente la diabetes y la obesidad; es decir, aquellos procesos con alteración de la resistencia a la insulina (RI).

También hay fármacos que producen un sobrecrecimiento gingival favoreciendo la retención de placa bacteriana, entre ellos está la ciclosporina, los bloqueadores de los canales del calcio y los anticonvulsivantes. Así como, aquellos fármacos que reducen el flujo salival como los antihipertensivos, los analgésicos sedantes, ansiolíticos y antidepresivos.

Factores de riesgo psicosocial: factores de riesgo relacionados con el estilo de vida y hábitos como el tabaco. El tabaco ejerce un efecto destructivo en los tejidos periodontales e incrementa la progresión de la periodontitis.

Incluimos en este apartado el nivel socioeconómico y el educativo, estableciéndose que un bajo nivel socioeconómico y un bajo grado de formación educativa, se asocian a una mayor prevalencia de periodontitis (12).

2.1.4. Clasificación actual de la enfermedad periodontal.

Se ha seguido el esquema de clasificación definido en el 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions (1).

La actual clasificación identifica tres formas diferentes de periodontitis: la periodontitis necrosante, la periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas y periodontitis clasificada mediante estadios y grados (1).

El estadio hace referencia a la gravedad de la presentación inicial y complejidad prevista del manejo de la enfermedad y el grado describe la velocidad y riesgo de progresión (Grado A riesgo bajo, Grado B riesgo moderado, Grado C riesgo alto), tal y como se muestra en la figura 1 y figura 2.

		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Gravedad	Cal interdental en la zona de mayor pérdida	1-2mm	3-4mm	≥5mm	≥5mm
	Pérdida ósea RX	Tercio coronal (<15%)	Tercio coronal (15-33%)	Extensión al tercio medio	Extensión al tercio apical
	Pérdida dentaria	Sin pérdidas por razón	dentarias periodontal	≤4 pérdidas por razones periodontales	≥5 pérdidas por razones periodontales
Complejidad		PS max≤4mm	PS max≤5mm		
		Pérdida horizontal		Además, complejidad II	Además de complejidad III
				Pérdida ósea vertical≥3mm	Disfunción masticatoria, TO Secundario movilidad≥2
				Afectación de furca grado II o III	Colapso de mordida, migración Abanicamiento dentario
				Defecto de cresta moderado	Defecto cresta grave

RX: radiografías, PS: profundidad de sondaje.

Figura 1: Clasificación de la periodontitis por estadios. Adaptado de Tonetti y cols. (2018).

		GRADO A	GRADO B	GRADO C
Evidencia directa	RX o evolución perio. En los 5 años anteriores	No evidencia pérdida	Pérdida <2mm	Pérdida >2mm
Evidencia indirecta	Pérdida ósea vs. edad (%)	< 0.25	0.25-1.0	> 1.0
	Fenotipo	Grandes depósitos de biofilm con niveles bajos de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos	La destrucción supera las expectativas. Patrones clínicos que sugieren periodos de progresión rápida y/o patología de aparición temprana
Factores modificadores	Tabaquismo	No fumador	< 10 cigarros/día	≥10 cigarros/día
	Diabetes	Normal con/sin diabetes	HbA1c<7 con diabetes	HbA1c>7 con diabetes

Figura 2: Clasificación de la periodontitis por grados. Adaptado de Tonetti y cols. (2018).

Una de las principales ventajas de esta clasificación es que se definen perfectamente los parámetros que tenemos que utilizar para poder categorizar las condiciones que nos vamos a encontrar.

Los estadios, concretamente la clasificación establece cuatro, van a determinar una mayor implicación terapéutica por parte del profesional que no existía en la anterior clasificación.

Los estadios I y II los va a poder resolver un dentista general con un tratamiento periodontal no quirúrgico, el estadio III requerirá la participación de un especialista y tratamiento quirúrgico. El estadio IV la participación de un mayor número de profesionales y un tratamiento multidisciplinar.

Por su parte los grados nos hablan tanto del pasado como del futuro de la enfermedad, de la progresión y el riesgo de seguir perdiendo inserción periodontal. El grado A corresponde a un paciente con mucho factor causal y resistente a la enfermedad, el grado B nos habla de un paciente con factores causales y pérdida equilibrada y el grado C supone

el perfil más difícil de tratar porque es un paciente muy susceptible con poco agente causal, pero con gran destrucción.

2.1.5. Tratamiento de la enfermedad periodontal.

Según la Federación Europea de Periodoncia (EFP) el primer objetivo del tratamiento debería ser conseguir un cambio de comportamiento en el huésped, motivando al paciente para conseguir la eliminación del biofilm supragingival y el control de los factores de riesgo.

Posteriormente se procedería a la eliminación mecánica de placa por parte del profesional. Aquí se incluyen las intervenciones destinadas a eliminar placa dental y cálculo supragingival, así como posibles factores retentivos que dificulten la higiene, al mismo tiempo que se sigue haciendo hincapié en los factores de riesgo reconocidos tanto en la aparición como progresión de la periodontitis tales como el abandono del tabaco, control de la diabetes, ejercicio físico y pérdida de peso.

En una segunda fase se procede al control del biofilm y cálculo subgingival pudiéndose incluir agentes físicos o químicos coadyuvantes, antimicrobianos subgingivales o sistémicos. Este segundo paso debe realizarse en todos los pacientes con periodontitis, independientemente del estadio de la enfermedad.

Tras la reevaluación de esta fase, si no se han alcanzado los objetivos finales del tratamiento (no hay bolsas periodontales $>4\text{mm}$) con sangrado al sondaje o no hay bolsas periodontales profundas $\geq 6\text{mm}$ pasaríamos a la tercera fase del tratamiento cuyo objetivo será tener un mejor acceso para la instrumentación subgingival mediante un tratamiento regenerativo o resectivo.

Con la obtención de nuestros objetivos el paciente pasa a ser integrado en un programa de mantenimiento periodontal.

2.2. Apnea Obstructiva del Sueño (AOS).

La Apnea Obstructiva del Sueño (AOS), es una enfermedad de fisiopatología multifactorial y compleja caracterizada por la aparición de trastornos respiratorios recurrentes durante los cuales las vías respiratorias superiores, normalmente orofaringe, sufren un cierre (apnea obstructiva) o una reducción del calibre (hipoapnea obstructiva) durante el sueño (26).

La apnea obstructiva se caracteriza por la desaparición del flujo aéreo asociado a movimientos de la pared torácico abdominal a diferencia de la apnea central, donde la desaparición del flujo aéreo se produce por la desaparición de los movimientos respiratorios.

La reducción de al menos el 30% del flujo aéreo seguido de una desaturación o microdespertar se define como hipoapnea.

Otros conceptos importantes por definir son:

- Esfuerzo Respiratorio Asociado a Microdespertar (ERAM), se trata de trastornos respiratorios obstructivos que no cumplen los criterios de una apnea o hipoapnea, en los que existe un aumento de los esfuerzos respiratorios y que finalizan con un microdespertar.
- Índice de apnea-hipoapnea (IAH); frecuencia media de apneas e hipoapneas por hora de sueño.
- Índice de desaturación de oxígeno (ODI): número de desaturaciones arteriales de oxígeno por hora de sueño.

2.2.1. Epidemiología: prevalencia de la AOS.

En base a los primeros estudios de cohortes que se realizaron en los E.E.U.U en los años 90, la prevalencia del AOS (moderado-grave, ≥ 15 apneas/hipoapneas por hora de sueño) era del 9% en hombres y del 4% en mujeres (27). Estudios similares que han sido desarrollado posteriormente han demostrado un aumento de la prevalencia de la enfermedad del 13% en hombres y del 6% en mujeres atribuido fundamentalmente a un aumento de la obesidad (28).

La prevalencia es similar en los países asiáticos y en los países europeos, es una enfermedad tanto de los países desarrollados como en vías de desarrollo (29).

En España, la población mayor de 40 años que cumple los criterios de AOS grave representa entre un 4.7 y un 7.8% de la población con una relación 3:1 hombre- mujer y un aumento de la prevalencia con la edad, lo que ha potenciado un fuerte desarrollo en el ámbito asistencial de esta patología (30).

2.2.2. Diagnóstico de la AOS.

Para que se pueda establecer el diagnóstico del AOS, según la 3ª Clasificación Internacional de Trastornos del Sueño (ICSD-3) (31), debe darse:

1. Presencia de uno o varios de estos síntomas: somnolencia diurna, fatiga o insomnio, despertar con sensación de falta de aire, ronquido habitual o interrupción de la respiración durante el sueño, diagnóstico de hipertensión, síndrome coronario agudo, ictus, insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular o diabetes mellitus tipo 2.
2. Polisomnografía (PSG) que muestre 5 o más eventos respiratorios obstructivos por hora de sueño (IAH>5) o por hora de monitorización si se trata de una poligrafía respiratoria (PR).
3. Quince o más eventos respiratorios obstructivos por hora de sueño (IAH>15) en una PSG o por hora de monitorización en la PR.

Para el diagnóstico de la AOS, la técnica considerada como *gold* estándar es la PSG (32). Se requiere de la presencia de los siguientes canales; electroencefalografía (EEG), electrooculografía (EOG), electromiografía (EMG) de superficie de mentón para así poder diferenciar las distintas fases del sueño.

Mediante una cánula de presión nasal y termistor, se detectan las apneas y las hipoapneas. Electrocardiografía (ECG) para ver el ritmo cardíaco, con bandas torácicas y abdominales para detectar el esfuerzo respiratorio.

Un pulsioxímetro para las desaturaciones. Suele recomendarse el uso de micrófono para la audición de los ronquidos, disponer de un sensor de posición corporal, así como EMG de extremidades y todo ello grabado en vídeo con al menos 6.5 horas de registro y 180 minutos de sueño.

La PR es otro método diagnóstico aceptado y mucho más simplificado ya que solo mide variables cardiorrespiratorias.

Estas pruebas, tradicionalmente han sido realizadas en los laboratorios del sueño del hospital.

Otra opción es realizarlo a nivel domiciliario que, aunque presenta como desventaja la ausencia de supervisión directa y la posible falta de registro de algún dato. Pueden subestimar el número de eventos respiratorios por hora, pero suelen ser más cómodas para el paciente y suponen un menor coste económico (33).

2.2.3. Anamnesis del sueño.

Existen una serie de síntomas nocturnos y diurnos que son predictivos de la AOS (26) y que se resumen en la siguiente tabla 1.

	Síntomas nocturnos	Síntomas diurnos
Específicos	Ronquido Apneas referidas <i>Gasping</i> Sueño no reparador Insomnio	Somnolencia Cansancio
Inespecíficos	Nicturia Xerostomía al despertar Diaforesis Cefalea	Trastornos cognitivos Depresión Disfunción sexual
Otros		Accidentes de tráfico

Tabla 1. Síntomas nocturnos y diurnos predictivos de la AOS.

El ronquido es un síntoma fundamental en los pacientes con sospecha de AOS que suele aparecer todas las noches pudiendo estar favorecido por la posición supina.

Las pausas respiratorias aparecen durante el sueño por lo que el paciente no suele ser consciente de ellas. Las mujeres con AOS suelen presentar menor número de apneas referidas (34).

Algunos pacientes refieren despertares con sensación de ahogo o *gasping*.

Este síntoma no es muy frecuente pero su presencia está relacionada con probabilidad de enfermedad (35).

Dentro de los síntomas diurnos, el más importante, pero a la par complejo, es la somnolencia diurna. Tan solo está presente entre el 40-60% de los pacientes con AOS que presentan un $IAH \geq 5$ y no se correlaciona con la gravedad del síndrome (36).

Existen métodos estandarizados para tratar de cuantificar la somnolencia diurna. Estos pueden ser subjetivos (lo percibido y referido por el paciente), objetivos que son pruebas costosas y no suelen estar indicadas y métodos indirectos (que evalúan las consecuencias de la somnolencia).

Uno de los métodos subjetivos más rápidos y precisos es el empleo de cuestionarios estandarizados como la **Escala para la evaluación de la somnolencia de Epworth** (37) que se describe en la tabla 2.

¿Con qué facilidad da Vd. cabezadas o se queda dormido en las situaciones siguientes, a diferencia de encontrarse solamente cansado? Esto se refiere al tipo de vida que lleva últimamente. Aunque no haya realizado este tipo de cosas recientemente, trate de imaginar cómo le habrían afectado. Use la escala y elija el número más adecuado para cada situación.				
	Posibilidades de dormir			
	0	1	2	3
Sentado, leyendo un periódico, una revista, un libro				
Viendo la televisión				
Sentado, sin hacer nada, en un lugar público (por ejemplo, un cine, una reunión familiar, una ceremonia religiosa)				
De pasajero en un coche, al cabo de una hora sin parar				
Acostado tranquilo por la tarde, cuando las circunstancias lo permite				
Sentado, hablando con alguien				
Sentado tranquilo después de una comida sin alcohol				
En un coche, si se para unos minutos por el tráfico				
Versión española: Chiner E et al; Arch Bronconeumol 1999; 35:422-7				
Escala 0 = nunca duermo 1 = ligeras posibilidades de dormir 2 = moderadas posibilidades de dormir 3 = altas posibilidades de dormir				
En España, valores >11 se consideran anormales.				

Tabla 2: Escala de somnolencia de Epworth.

El punto de corte de normalidad es 10. Una puntuación entre 11-14 se atribuye a paciente somnoliento y una puntuación superior a 14 puntos es considerada como somnolencia patológica.

Uno de los factores predisponentes para el AOS suele ser la obesidad. El Índice de masa corporal (IMC) es el parámetro más utilizado para cuantificar el peso corporal.

La clasificación según la OMS de obesidad en relación con el IMC (38) queda resumida en la tabla 3.

clasificación	IMC (kg/m ²)	Riesgo asociado a la salud
Peso normo	18.5-24.9	Promedio
Exceso de peso	≥25	
Sobrepeso o pre obeso	25-29.9	Aumentado
Obesidad grado I o moderada	30-34.9	Aumento moderado
Obesidad grado II o grave	35-39.9	Aumento severo
Obesidad grado III o mórbida	≥40	Aumento muy severo

Tabla 3: Clasificación de la obesidad según la OMS.

Se ha demostrado en estudios epidemiológicos una correlación directa entre el IMC y la prevalencia de AOS (39). En general un IMC ≥ 30 es un importante factor de riesgo para el AOS.

La distribución de la grasa en la zona del cuello-tronco-abdomen está relacionada con el desarrollo del síndrome. Se considera un diámetro patológico de cuello de ≥ 43 cm en hombres y ≥ 41 cm en mujeres (40).

Existen también una serie de enfermedades médicas que se relacionan significativamente con la AOS. Algunas suponen un factor de riesgo como son: la hipertensión arterial, sobre todo la diastólica, diabetes mellitus tipo II, ictus isquémico anterior o accidentes isquémicos recurrentes, fibrilación auricular o arritmias cardíacas nocturnas y enfermedad coronaria.

Otros son considerados como factor agravante o precipitante como la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar y enfermedad por reflujo gastroesofágico (41).

2.2.4. Gravedad de la AOS.

Para evaluar la gravedad de la AOS, el elemento para tener en cuenta es el IAH. En base a esto la gravedad de la AOS (42) se estratifica según como aparece en la siguiente tabla (tabla 4).

LEVE	IAH ≥ 5 y < 15
MODERADO	IAH ≥ 15 y < 30
GRAVE	IAH ≥ 30

Tabla 4: Clasificación de la gravedad del AOS.

Es de suma importancia además tener en cuenta los siguientes aspectos (43), sobre todo en relación con la gravedad desde un punto de vista terapéutico:

- IAH por posición: si el IAH supino es superior al 50% del IAH total.
- alteración de la saturación de oxígeno (SaO₂) durante el sueño.
- presencia de somnolencia diurna que aumenta el riesgo de sufrir accidentes de tráfico o laborales.
- presencia de comorbilidades significativas neurológicas, cardiológicas o ventilatorias.

Es por ello por lo que la valoración de la gravedad de la AOS según lo recomendado por el Documento Internacional de Consenso (26) debería hacerse teniendo en consideración esos aspectos además del IAH, tal y como queda reflejado en la figura 5.

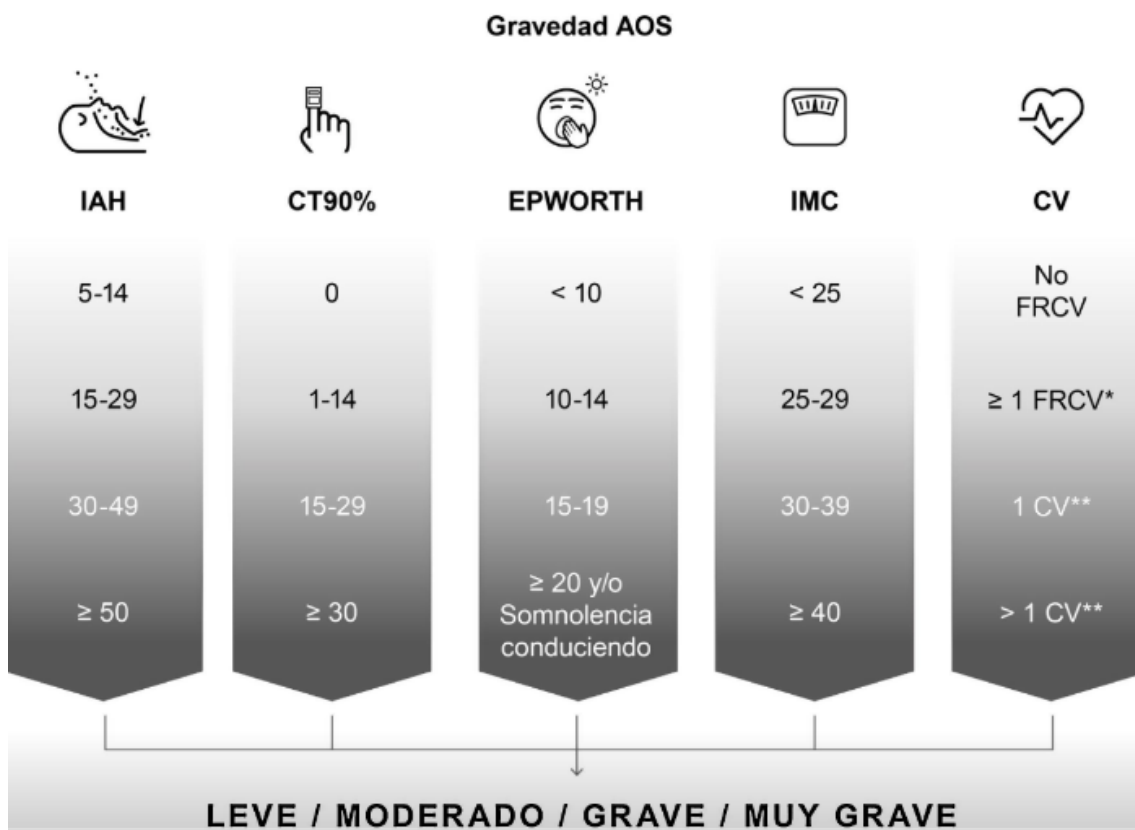


Tabla 5: Valoración de gravedad de la AOS según Documento Internacional de Consenso.

2.2.5. Tratamiento de la AOS.

A la hora de tomar la decisión de cuál es la mejor opción terapéutica se debe tener en cuenta la gravedad de la situación que depende tanto del grado de somnolencia diurna como de los datos polisomnográficos. Como ya se mencionó con anterioridad, la somnolencia puede considerarse grave cuando la puntuación es superior a 14 usando la Escala Epworth (37).

Respecto a la PSG, se examina el parámetro IAH correspondiendo los valores por encima de 30 con las formas graves del síndrome.

Fleetham y cols. considera que debería tenerse en cuenta también la alteración de la oxigenación nocturna mediante la cuantificación de los valores de SaO₂ (SaO₂ media, SaO₂ mínima, el tiempo de sueño pasado con SaO₂ inferior al 90%) (44).

También es fundamental considerar la posible posición, en la que el trastorno respiratorio se produce exclusiva o principalmente en posición supina (45).

Dentro de las opciones terapéuticas consideradas se encuentra la pérdida de peso, terapia postural mediante sistemas que mantengan al paciente en posición de costado durante el sueño cuando hay un componente posicional, suprimir el consumo de alcohol y fármacos que depriman los centros respiratorios como las benzodiazepinas.

Como tratamientos específicos nombraremos la presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) que es el tratamiento que ha dado los mejores resultados, los dispositivos orales de avance mandibular (DAM) que se recomiendan, independientemente de la gravedad, en pacientes que no toleran el CPAP o en pacientes en los que no está indicado el tratamiento con CPAP. El tratamiento quirúrgico comprende el de los tejidos blandos por parte del otorrinolaringólogo y el óseo por el maxilofacial, así como la cirugía bariátrica en caso de obesidad mórbida (46).

2.3. Relación entre la AOS y la periodontitis.

La relación entre la periodontitis y la AOS fue descrita por primera vez en 2009 (47) estableciendo como punto de unión entre ambas la inflamación sistémica y morbilidad cardiovascular. Hay que recordar que la periodontitis es una enfermedad inflamatoria infecciosa cuya patogénesis puede verse afectada por factores ambientales y trastornos sistémicos como la diabetes, el tabaquismo y la obesidad que también son factores de riesgo o asociados a la AOS.

Según el estudio de Sanders y cols. (48) y el estudio de Kim y cols. (49) la relación entre la AOS y la periodontitis se debería a tres factores:

- la respiración oral, que conlleva a la sequedad bucal y reduce el aclaramiento bacteriano de los tejidos orales.
- el estrés oxidativo, que podría acelerar la pérdida de inserción clínica en los pacientes al margen del que la periodontitis induce por sí misma (50).
- la inflamación sistémica.

Existen estudios que demuestran que en los pacientes con AOS se encuentran elevados los marcadores de inflamación sistémica, en particular las citoquinas inflamatorias (6,51,52) así como la activación de neutrófilos circulantes (53), lo que podría potenciar la enfermedad periodontal en los pacientes que ya tienen una patología inflamatoria o desencadenarla en personas con predisposición genética o ambiental.

Se ha reportado que los casos más severos de enfermedad periodontal se dan en los casos más graves de AOS y que la mayor gravedad y prevalencia de la periodontitis en estos pacientes se encuentra influenciada por el IMC (54). Por tanto, parece razonable suponer que la inflamación sistémica, consecuencia de la obesidad, puede constituir el punto de unión entre ambas patologías.

Aunque el mecanismo exacto del impacto inducido por la AOS en los niveles de leptina no está claro, se sugiere que la resistencia a la leptina impide que esta realice su función fisiológica normal, la distribución de la grasa está desequilibrada depositándose preferentemente en las vías respiratorias altas y las vísceras, lo que contribuye al colapso de las vías respiratorias durante el sueño y a la aparición de la AOS (55).

A medida que aumenta el IAH se produce hipoxemia. La hipoxemia intermitente puede aumentar la actividad simpática, lo que a su vez conduce a cambios hemodinámicos agudos tales como disfunción endotelial, trastornos metabólicos y estrés oxidativo.

El estrés oxidativo activaría la respuesta inflamatoria sistémica, aumentando las citoquinas proinflamatorias. Recordemos que la periodontitis induce por sí misma un estrés oxidativo (50).

En los pacientes apneicos, al igual que en los periodontales, encontramos concentraciones significativamente más elevadas de $\text{TNF}\alpha$ y de IL-6. (Recordemos que la leptina pertenece a la superfamilia de la IL-6).

El principal factor que influye en el incremento de $\text{TNF-}\alpha$ es el grado de alteración del sueño nocturno, mientras que el principal determinante de los niveles de IL-6 parece ser el IMC (53).

Como respuesta al aumento de la IL-6, el hígado aumenta la síntesis de fibrinógeno, por lo que se encuentra aumentado en las infecciones crónicas. El aumento en su concentración va a estar relacionado con el desarrollo de enfermedades coronarias produciendo cambios en el mecanismo de agregación plaquetaria.

Desde hace dos décadas la enfermedad periodontal es considerada un factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular y la presencia del fibrinógeno aumentado en la enfermedad periodontal (9) podría tener un papel en dicha correlación.

Además, la hipoxemia, los niveles aumentados de fibrinógeno y una fibrinólisis disminuida propias de la hiperactividad plaquetaria del paciente con AOS, junto con el aumento de presión intratorácica negativa y el incremento de la presión arterial, es lo que puede facilitar los problemas de isquemia del miocardio en estos pacientes (56).

2.4. ¿Qué es un biomarcador?

Los marcadores biológicos resultan muy útiles como método no invasivo para el diagnóstico de las enfermedades, para el seguimiento de éstas, incluso para establecer protocolos de tratamiento personalizados.

El Instituto Nacional de Salud define biomarcador como “una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” (7).

Características de un marcador ideal

En relación con su medición

1. Mínimamente invasiva
2. Fácilmente medible
3. Reproducible

En relación con su aplicación clínica (todas las características no se requieren en todos los biomarcadores)

4. Indica un proceso clave fisiopatológico en relación con la enfermedad, ya sea como un mediador patógeno o como un epifenómeno.
5. Puede ser utilizado para confirmar un diagnóstico o identificar un fenotipo clínico específico.
6. Puede ser usado para predecir futuros resultados o efectos adversos.
7. Puede ser utilizado para identificar un fenotipo de respuesta al tratamiento.
8. Puede demostrar una relación dosis-respuesta y por tanto ser empleado como guía de tratamiento.
9. Ser sensible a cambios en la actividad de la enfermedad mediada por una intervención en el tratamiento.
10. Ser sensible en un plazo de tiempo que precede a cambios en el estado clínico y permite una intervención preventiva.
11. Ser sensible a cambios en la actividad de la enfermedad.

Una vez detalladas las características que debe cumplir nuestro posible biomarcador debemos definir qué efectos produce la IGL, representada en nuestro caso por la

enfermedad periodontal, a nivel sistémico para poder centrar nuestra búsqueda. Empezaremos en primer lugar por definir qué entendemos exactamente por IGL.

2.5. ¿Qué es la inflamación de bajo grado (IGL)?

La inflamación de bajo grado (IGL) es un estado sistémico de producción subclínica de factores inflamatorios de forma crónica. Esta condición representa un factor de riesgo para muchas enfermedades como son la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades cerebrovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (8).

El análisis de IGL se lleva a cabo mediante la evaluación de biomarcadores circulantes como el fibrinógeno, la PCR ultrasensible o biomarcadores celulares como el recuento de los leucocitos y las plaquetas (57,58).

La inflamación actúa como un arma de doble filo. Por un lado, la respuesta inflamatoria defiende nuestro cuerpo de la invasión de bacterias, en el caso concreto de la periodontitis, una invasión de los tejidos más profundos (como el hueso) y, por otro lado, se crea una situación de inflamofilia persistente y mal regulada, provocando una destrucción irreversible del periodonto (2).

Durante la periodontitis, los mediadores proinflamatorios producidos localmente, IL-1, IL-6, TNF- α y la prostaglandina E2 (PGE2), pueden pasar al torrente circulatorio y ejercer efectos sobre órganos distantes y aumentando y/o perpetuando un estado inflamatorio (59).

En base a la situación anteriormente expuesta en una situación de disbiosis, los neutrófilos que se encuentran en el surco gingival no logran hacerse con el control de la flora disbiótica y estas pueden invadir el tejido conectivo junto con otras células inmunes como los macrófagos, células dendríticas y linfocitos.

Estas células producen citocinas de reabsorción ósea, TNF- α , IL-1 β e IL-17 y regulan el desarrollo de las células Th, sobre todo, Th17 que no son tan efectivas como la Th1.

Se ha comprobado que las células del periodonto producen adipocinas y son reguladas por señales microbianas inflamatorias (60).

La IGL y la bacteriemia que se producen contribuyen a la activación plaquetaria y al posterior estado procoagulante.

Una de las características de la inflamación sistémica es el aumento del número de plaquetas. La activación de las plaquetas provocaría la liberación de mediadores proinflamatorios lo que se traduciría en la unión de las plaquetas a los leucocitos y células endoteliales.

Hay estudios que consideran a los neutrófilos como células protectoras clave en la respuesta del huésped a la enfermedad periodontal. Una función deficiente de los neutrófilos se asocia a una mayor susceptibilidad a enfermedad periodontal.

Una característica importante de la inflamación es la infiltración de los tejidos por células de la inmunidad natural como son los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos tal y como refleja la figura 3 que aparece a continuación.

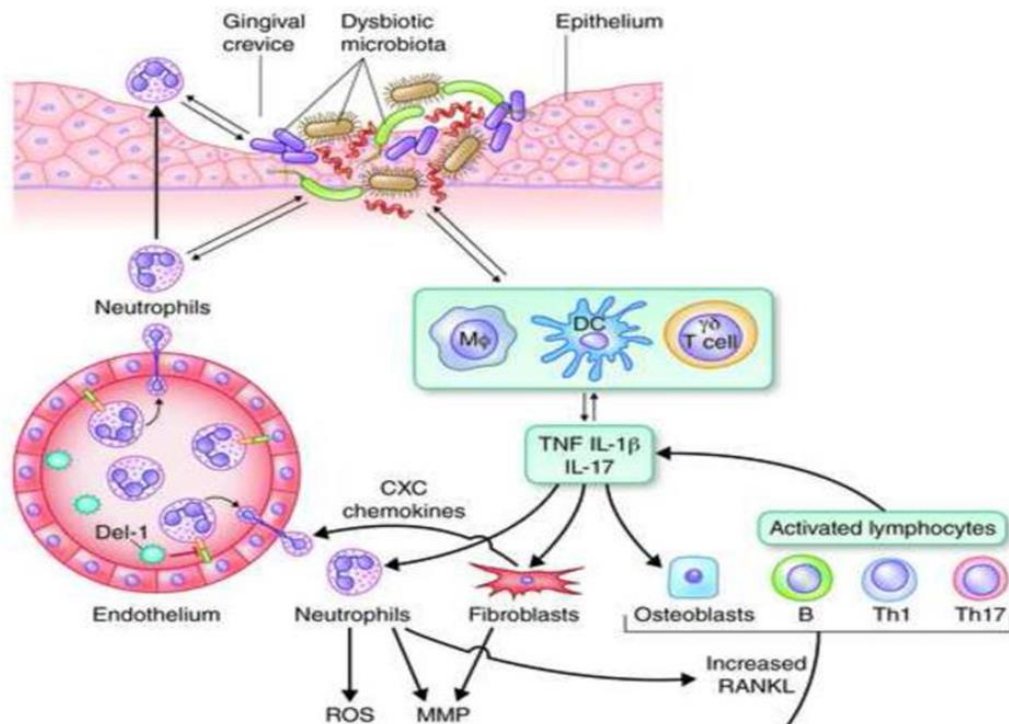


Figura 3: Mecanismo inflamatorio del proceso de la pérdida de hueso en la enfermedad periodontal. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol. 2014 Jan;35(1):3-11.

El aumento en el recuento de glóbulos blancos en sangre periférica se ha usado tradicionalmente para el diagnóstico de una infección o enfermedad inflamatoria. Kweider y cols. informaron por primera vez un mayor número de leucocitos periféricos en pacientes con periodontitis en comparación con controles sanos en 1993 (61).

Dada la repercusión que la periodontitis tiene sobre la inflamación sistémica, siendo una respuesta a la infección bacteriana, sería interesante considerar el recuento de las células sanguíneas como posibles biomarcadores inflamatorios.

La proporción de neutrófilos/linfocitos (NLR), de linfocitos/monocitos (LMR) y de plaquetas/leucocitos (PLR) (62), biomarcadores de inflamación sistémica que han despertado gran interés en el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares (63) y tumores malignos (64) y por extensión como objeto de nuestro estudio.

2.6. ¿Por qué los marcadores hematológicos pueden ser considerados como biomarcadores?

Se conoce el papel de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria innata y de los linfocitos en la inmunidad adaptativa. Se entiende, por tanto, que los neutrófilos y los linfocitos son piezas clave en la inflamación y las respuestas inmunitarias (65). Las plaquetas, al margen de su papel en la coagulación, tienen una función importante en la inflamación, dada su participación en la formación de agregados de plaquetas y leucocitos mediante la expresión de PLT P-selectina, mediando la respuesta de las células T y sincronizando la inmunidad innata y adaptativa.

La relación neutrófilo-linfocitos (NLR) y la relación plaqueta-linfocitos (PLR) se utilizan para predecir el pronóstico en diversas enfermedades. En particular, PLR se asocia con tumores malignos, enfermedades cardiovasculares e insuficiencia cardíaca, probablemente porque los procesos inflamatorios y la actividad excesiva del trombo influyen en la patogénesis en estas enfermedades. La NLR alta se asocia con la mayoría de las complicaciones de la enfermedad cardiovascular, incluido el síndrome coronario agudo, el accidente cerebrovascular y los eventos cardiovasculares compuestos (66).

El último índice utilizado es la ratio monocito/linfocito (LMR), cuya mayor utilidad se ha observado en enfermedades inflamatorias, como predictor de episodio agudo de artrosis, en las que el aumento del índice se asocia a exacerbaciones articulares (67).

Los monocitos y los macrófagos son componentes celulares de la inmunidad innata con una función importante en la homeostasis de los tejidos.

Los macrófagos se encargan de la defensa contra los microbios y poseen la capacidad de migrar en breve espacio de tiempo al lugar de la lesión. Por su parte, los monocitos se subdividen en monocitos clásicos (con capacidad para convertirse en macrófagos en el lugar de la lesión), no clásicos (principales responsables de la vigilancia a nivel vascular) y los monocitos intermedios o también conocidos como hiperinflamatorios (con un papel importante durante la cascada inflamatoria) (68,69,70,71).

Los monocitos no clásicos se acumulan en sitios de infección bacteriana crónica y producen niveles bajos de citoquinas proinflamatorias, pero altos niveles de antiinflamatorias (72).

Una disminución en el número de monocitos en la circulación se asoció con la disminución en el número de macrófagos inmaduros en la mucosa inflamada del colon. Dentro del intestino de ratones con colitis, se observó un marcado aumento en la acumulación de macrófagos inmaduros en relación con un fenotipo inflamatorio (71,73).

La proporción NLR viene a reflejar por tanto ese equilibrio entre los mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos. Las citoquinas proinflamatorias pueden aumentar si el NLR está aumentado (74).

Por tanto, en base a el planteamiento de que las variaciones de NLR y PLR y MLR (75) puede tener un impacto negativo en la evolución de la enfermedad periodontal y el AOS podría ser considerado como un posible biomarcador obtenido en una analítica básica de sangre.

Nos resta explicar cuál sería la conexión entre la grasa y el hueso que venga a explicar por qué van a ser considerados en nuestro estudio los valores de HDL como posible marcador biológico.

2.7. Conexión grasa-hueso.

La relación entre el tejido óseo y el tejido adiposo ha sido una cuestión ampliamente debatida. Aunque históricamente se le atribuye a la grasa un efecto protector frente a la pérdida de masa ósea, en la última década hay estudios que evidencian una relación inversa, donde niveles altos de lipoproteína de alta densidad (HDL) reducen el número y la función de los osteoblastos (10).

A nivel endocrino el adipocito actúa a través de dos vías distintas, directamente secretando adipoquinas como la leptina, e indirectamente actuando a nivel pancreático en la producción de amilina e insulina y la formación de estrógenos, actuando a través de estas moléculas de forma positiva, en la formación de hueso (76).

En los últimos años han surgido varios estudios que evidencian que la obesidad central se asociaría con una menor calidad ósea. Una mayor cantidad de grasa plasmática daría lugar a mayor acúmulo de lípidos en la pared de los vasos sanguíneos donde sufrirían un proceso de oxidación. Mientras que en los vasos sanguíneos actuarían como inductores de los osteoblastos hacia la calcificación, a nivel óseo fomentarían la disminución de la mineralización ósea (10).

Hay estudios que han demostrado que los niveles elevados de HDL reduce la densidad de la masa ósea (DMO) al estimular mecanismos moleculares que reducen el número de los osteoblastos (77). Barzilay y cols. encontraron en su estudio una asociación positiva entre los niveles altos de HDL y un mayor riesgo de fractura osteoporótica (78).

Así pues, en la enfermedad periodontal, la reabsorción ósea se produce cuando la acción de los osteoclastos supera la función de formación ósea de los osteoblastos cuya función se ve afectada por las citoquinas inflamatorias que, junto con los factores patógenos de las bacterias periodontales, dan como resultado la diferenciación y activación de los osteoclastos (79).

Es por ello por lo que nos planteamos como hipótesis, dada la influencia de los lípidos en el metabolismo ósea, la posible relación entre los niveles de HDL y la progresión de la enfermedad periodontal, según la clasificación actual, categorizada en sus distintos grados.

3. Las ventajas de la biología molecular. La saliva.

La experiencia vivida con la pandemia nos enseñó el papel fundamental de la saliva en la transmisión del COVID-19. Estudios actuales han demostrado que la saliva podría ser una alternativa válida y no invasiva para el diagnóstico y monitorización de carga viral (80) y para el diagnóstico de patologías como el cáncer (81), por lo que sería fundamental que pudieran considerarse las ventajas que puede aportar el análisis de este fluido.

Gracias a la pandemia por SARS-CoV-2, se ha dado a conocer el trabajo de muchos laboratorios y las técnicas de biología molecular como la PCR y sus variantes.

Los métodos moleculares no se basan en medir la cantidad de proteínas en sí, si no se centra en la expresión de los genes que codificarán una determinada proteína.

El dogma de la biología molecular establece que el ADN posee las instrucciones para la producción de una proteína. Estas son copiadas a un ARNm en un proceso que se conoce como transcripción. Esa información, en el proceso de traducción, será utilizada posteriormente por el ARN para producir la proteína. El ARNm es transportado desde el núcleo al citoplasma de la célula para poder realizarse el proceso de la traducción. Antes de dicho transporte, el ARNm sufre un proceso de maduración en el que se retiran las regiones no codificantes o intrones y solo queden presentes las regiones codificantes o exones que serán traducidas a proteína.

A este proceso de maduración se le conoce como *splicing* (82). Esta información es de especial interés ya que para el procedimiento de qPCR es importante conocer la secuencia nucleótida completa del gen o una información mínima sobre la localización aproximada de los intrones y los exones.

Actualmente se sabe que la exposición bacteriana es imprescindible para que se inicie la enfermedad periodontal, pero el fenotipo de la enfermedad viene determinado por la respuesta del huésped.

Las variaciones epigenéticas y los polimorfismos pueden alterar las respuestas tanto innatas como adaptativas, lo que lleva a variaciones en la respuesta de cada individuo, en la expresión clínica de la inflamación, así como la respuesta al tratamiento (20).

En la literatura existen varios estudios que han evaluado los niveles de leptina en suero (83,84,85,86,87), en saliva y suero (88) y suero y fluido crevicular (GCF) (89), mostrando niveles más bajos de leptina en saliva y GCF en los grupos de pacientes periodontales frente al grupo de pacientes control, mientras que, en suero encontraban un aumento de leptina en los pacientes periodontales.

Con respecto a CCL2, se trata de una quimioquina de 70 aminoácidos y se ha demostrado un aumento de secreción en problemas dentales como la periodontitis. Principalmente sus elevados niveles son consecuencia de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias del género *Fusobacterium*, las cuales también se han relacionado con cáncer oral (7). Los niveles de CCL2 están aumentados en biopsia de tejido gingival y en el suero de los pacientes con problemas periodontales, siendo los fibroblastos, los monocitos, los macrófagos y las células endoteliales los principales productores de CCL2 en el periodonto (18).

La creciente cantidad de bases de datos cuantitativos de alta calidad disponibles tanto para ARNm como para proteínas deberían permitir el análisis preciso de fenómenos fisiológicos que no han sido accesibles experimentalmente hasta ahora. Los estudios publicados sobre la correlación de ARNm y los niveles de proteína en muestras biológicas orales no son muy abundantes. El estudio de Isler y cols. (15) reveló que los niveles de ARNm de leptina, en los tejidos conectivos inflamados de los pacientes periodontales eran más altos que los de los tejidos sanos del grupo control no periodontal. Un estudio anterior, el de Becker y cols. (16) informó de la implicación de ARNm de leptina en los mecanismos fisiopatológicos de la periodontitis demostrando que la regulación de los transcriptores relacionados con la respuesta a molécula de origen bacteriano se expresa con fuerza en la periodontitis. Los estudios de Shen y cols. (17) y de Cortez y cols. (18) informan de la mejora en la evolución de la enfermedad periodontal al inhibir la CCL2 en un estudio en ratones y del papel protagonista de la CCL2 en la hipertensión y riesgo cardiovascular, comorbilidad asociada tanto a la AOS como a la enfermedad periodontal.

Es por ello por lo que centraremos nuestro estudio en la expresión de ARNm de estas proteínas en las muestras de saliva.

El principal factor que influye en la correlación ARNm y proteínas es la vida media individual de ellas (90).

La vida de una proteína depende de varios factores: estabilidad intrínseca de la proteína, el primer aminoácido amino-terminal (regla N-end), el procesamiento post-traducciona l y la localización de la proteína respectiva. La vida media de la leptina es similar en individuos obesos y no obesos y es, de 25 minutos y similar para la CCL2 (91).

La qPCR es una variante de la PCR convencional donde monitorizamos la cantidad de copias de nuestra muestra a amplificar que se van generando en cada uno de los ciclos pudiendo ver los datos en tiempo real mientras la PCR está en marcha.

Hace uso de un termociclador que posee una óptica especial que le permite trabajar con fluorescencia. El sistema permite captar el nivel de fluorescencia en cada uno de los ciclos. Dependiendo de la química se pueden emplear sondas Taqman, cuyo objetivo es cuantificar y amplificar fragmentos de ADN mediante Taq ADN polimerasa (enzima de microorganismo que es tolerante a altas temperaturas, *Thermus aquaticus*). Puesto que la PCR produce una amplificación, para detectar el ARNm celular bastaría con someterlo a este proceso y podría visualizarse con un método de tinción adecuado. Sin embargo, la Taq polimerasa solo es capaz de sintetizar ADN a partir de un molde de ADN por lo que resulta necesario generar un molde de ADN complementario a partir del ARNm mediante un ADN polimerasa dependiente de ARN, enzima conocida como transcriptasa inversa.

También se pueden emplear primers y el SYBR Green. El SYBR Green es una molécula orgánica que al asociarse con el ADN en su hendidura menor incrementa la tasa de emisión de fluorescencia. El SYBR Green emite fluorescencia en el momento en que la molécula de ADN está en estructura de doble cadena por lo que en los diferentes pasos de la qPCR solo podrá ser detectada en el paso de extensión y es ahí donde al aplicar un protocolo de programación se pueden obtener los datos.

Al margen de ser una tecnología sofisticada es una técnica limpia, precisa y técnicamente más fácil de cuantificar.

Tal y como comentamos con anterioridad, durante años se asumió que la información biológica se transfería del ADN al ARN mensajero y las proteínas de forma lineal y secuencial.

Hoy en día se sabe que existen numerosos procesos implicados en la regulación postranscripcional (20) atribuyéndose en este contexto un papel importante a los eventos epigenéticos.

En la enfermedad periodontal se ha observado que las alteraciones epigenéticas fomentan un microambiente favorable para las agresiones microbianas favoreciendo que los patógenos orales infieran de forma duradera en el genoma del huésped promoviendo la enfermedad (92). En la periodontitis, en concreto, se ha observado que las alteraciones epigenéticas promueven un microambiente más favorable a las agresiones bacterianas lo que lleva a que el efecto de los patógenos orales interfiera de forma duradera en el genoma del huésped promoviendo la enfermedad. El perfil de expresión génica, es decir, la catalogación sistemática de secuencias de ARNm en una población celular, órgano o muestra de tejido, es una herramienta genómica que puede contribuir al arsenal de enfoques para estudiar la patobiología de la periodontitis (93).

La recolección de muestras de saliva para la investigación genómica o proteómica está cobrando especial relevancia, debido a su conveniencia, seguridad y nula invasividad. Mediadores de respuesta tisular como citoquinas, anticuerpos, hormonas y enzimas son liberados al fluido oral pudiendo usarse como biomarcador de dicha afectación (94). Li y cols. (95), informaron que miles de ARNm humanos están presentes en la saliva, pudiendo ser aislados y amplificados. Varios estudios recientes (94,95,96,97,98), también encontraron que ARNm específicos en la saliva pueden servir como biomarcadores para detectar el síndrome de Sjögren, cáncer oral y otras afectaciones sistémicas como la diabetes, por lo que el muestreo de ARNm podría ser considerada para monitorizar los estados inflamatorios propios de la enfermedad periodontal y de la AOS.

Resulta importante por tanto definir qué es la leptina junto con su receptor y la CCL2 y centrar cuál es su implicación en el objeto de nuestro estudio.

4. La Leptina y el receptor de la Leptina: definición y funciones.

La leptina es una hormona peptídica formada por 146 aminoácidos. Se trata de una citocina, tanto por su estructura como la de su receptor, siendo similares a las citocinas I helicoidales de cadena larga como la interleuquina 11 (IL-11), interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12) y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (99,100).

El gen OB de los humanos se localiza en el cromosoma 7q31-3. Tiene más de 15.000 pares de bases. Posee dos exones separados por dos intrones. En los exones 2 y 3 es donde se codifica la síntesis de la leptina. En ratones se vió que una mutación en este gen produce ausencia del ARNm o la producción de una proteína más corta no funcional lo que se traduciría en una disminución de la temperatura e hiperfagia (101).

Es sintetizada por los adipocitos y presenta un papel regulador en el metabolismo energético que, a su vez, presenta relación con el sistema inmunológico. También hay tejidos como el músculo esquelético, la mucosa gástrica, los osteoblastos, y las glándulas salivales que la producen.

Los niveles circulantes de leptina (rango normal 1-15 ng / ml) reflejan directamente la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo y son proporcionales a la masa adiposa en humanos.

El receptor de la leptina se expresa en el sistema inmunológico y los efectos reguladores de la misma incluyen tanto a las células del sistema innato como adaptativo.

La naturaleza pleiotrópica de la leptina está respaldada por la distribución universal del receptor de leptina (LEPR), que puede tener varias isoformas, que difieren en la longitud de sus regiones citoplasmáticas (12).

El receptor de la leptina pertenece a la familia de receptores de citoquinas tipo I presentando un dominio extracelular, uno transmembrana y otro intracitoplasmático. Este último puede ser de cadena corta o larga.

Dicho aspecto, resulta de gran importancia ya que las formas cortas se expresan en tejido no inmune y están implicadas en el transporte y degradación de la leptina.

Las formas largas, se asocian a unas proteínas-quinasas de la familia Janus (JAK), encargadas de la transducción de señales en las células (102). Las formas largas

predominan en el hipotálamo y sus funciones consisten en mediar las acciones de la leptina a nivel del sistema Nervioso Central (figura 4) (101).

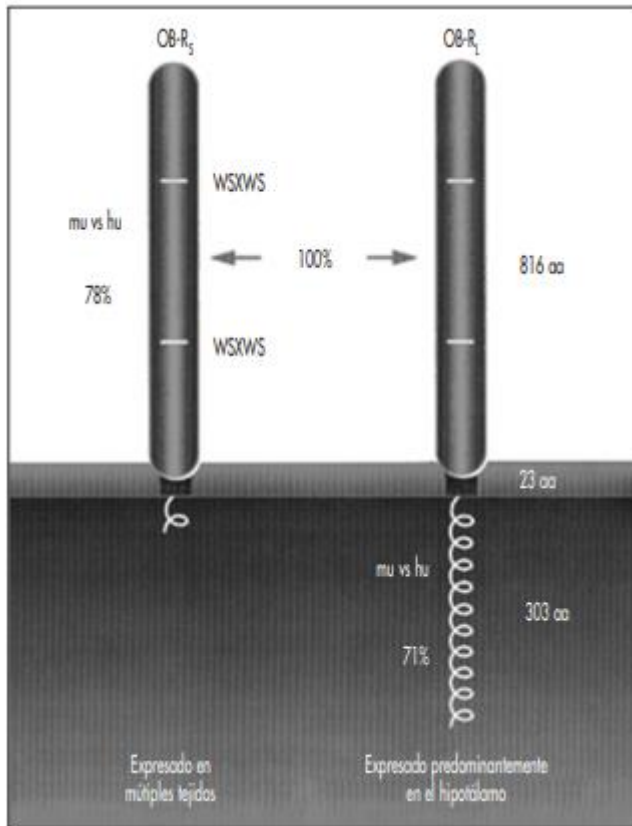


Figura 4: Esquema de las formas corta y larga del receptor de la leptina.

Al unirse la leptina al dominio extracelular se produce la activación de las JAK, que están débilmente unidas al dominio intracelular, mediante un proceso de autofosforilación. Las JAK fosforilan a su vez a proteínas de la familia SAT (proteínas transductores de señal y activadoras de la transcripción) que están unidas a la cola del receptor. Al quedar fosforiladas, las SAT pierden su afinidad por la cola del receptor y emigran al núcleo de la célula activando la transcripción de ciertos genes.

Estos dominios intracitoplasmáticos de cola larga también se expresan en los macrófagos y en los linfocitos (T y B) tanto en reposo como activados.

Su activación está en función del porcentaje de células que expresan el receptor y de la densidad del receptor en la superficie de la célula, siendo proporcionalmente mayor en los macrófagos que en los linfocitos (103).

Los linfocitos, al entrar en contacto con el antígeno, aumentan la expresión del receptor (11).

En la inmunidad innata, la leptina modula la actividad y función de los mastocitos mejorando la capacidad migratoria y su tasa de supervivencia.

La leptina también modula la actividad y función de los neutrófilos, al aumentar la quimiotaxis y la secreción de radicales de oxígeno. En los monocitos regula al alza su capacidad fagocítica mediante la activación de la fosfolipasa, así como la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citoquinas proinflamatorias (104,105).

La leptina podría actuar como un quimioatrayente de monocitos / macrófagos, mediando el infiltrado inflamatorio e induciendo la expresión del factor tisular en células mononucleares de sangre periférica humana.

La leptina humana no solo modula la activación y proliferación de los linfocitos T humanos, sino que también mejora la producción de citoquinas. De hecho, la reducción de la cantidad de adipocitos y, en consecuencia, de los niveles de leptina circulante determina la liberación de una señal negativa que perjudica el cebado de las células T y la producción de mediadores proinflamatorios necesarios para la inducción de una respuesta Th1(106,107,108).

Estos datos sobre la modulación de la leptina en la producción de citocinas de tipo Th1 están en línea con los efectos observados de la leptina estimulando la producción de TNF- α e IL-6 por los monocitos (109). La figura 5 que aparece a continuación es un resumen gráfico del efecto de la leptina en las células del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo.

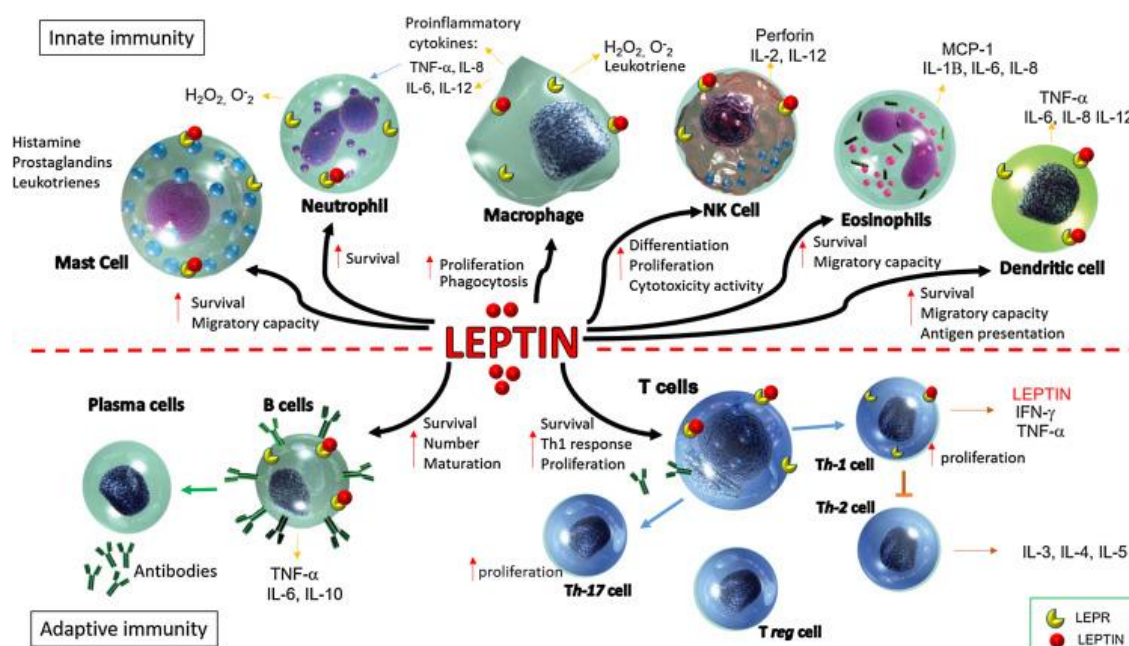


Figura 5. Efectos de la leptina sobre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.

Se ha informado de la presencia de leptina y del receptor de la leptina en tejido gingival, tanto en tejido sano como tejido inflamado, en el líquido crevicular gingival, en las lesiones periapicales crónicas y en la saliva (110,111).

Dado el papel importante que juega la leptina en el desarrollo de la respuesta inmunológica, se ha evaluado el papel de este péptido sobre los efectos causados por la *Prevotella intermedia*, encontrándose que la leptina es capaz de causar un ligero incremento en la producción de TNF- α por los monocitos, el cual se hace importante en presencia del LPS de esta bacteria, alcanzando hasta 25 veces la concentración inicial de TNF- α e incrementándose la expresión de ARNm de esta proteína (112).

La leptina disminuye a su vez el poder patogénico de la *P. Gingivalis*, inhibiendo los efectos causados por un lipopolisacárido que impide la síntesis de mucina.

Si se integran todos sus efectos sobre las bacterias, respuesta inmunológica, osteogénesis resulta evidente que el incremento de su concentración resulta beneficioso para el desarrollo del periodonto sano (113).

Existen estudios que han informado que la concentración de leptina se encuentra significativamente elevada en pacientes con periodontitis crónica (PC) en comparación con sujetos periodontales sanos (114), estableciéndose una correlación positiva entre los parámetros periodontales, incluida la profundidad de sondaje y la pérdida de inserción clínica.

Teniendo en cuenta que la leptina se asocia con un aumento de la expresión de CCL2 (111), se ha sugerido que la leptina podría regular la producción de señales quimiotácticas y la circulación de linfocitos durante la inflamación.

5.CCL2: definición y funciones.

La proteína quimioatrayente de monocitos o ligando 2 de quimiocina (CCL2) es un miembro de la familia de quimiocinas C-C y un potente factor quimiotáctico para los monocitos (115).

Pertenece a la familia de las quimiocinas CC. Tiene un peso molecular pequeño, de 8 a 14 KiloDalton (kDA), y es secretada por las células del sistema inmune.

La ubicación del gen se encuentra en el cromosoma 17q11.2-q21.1 con tres exones y dos intrones, jugando un papel fundamental en el proceso de inflamación. Es producida por células endoteliales, epiteliales, monocíticas, fibroblastos y astrocitos.

Favorece el avance de muchos trastornos por este mecanismo de migración e infiltración de células inflamatorias como monocitos/macrófagos y otras citoquinas en el sitio de la inflamación.

La CCL2 es considerada también protagonista en la patogenia de numerosas enfermedades, ya sea directa o indirectamente, como el nuevo coronavirus, cánceres, enfermedades neuroinflamatorias, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares (116).

Una vez inducidas las quimiocinas se unen a los receptores de las células inmunitarias ejerciendo sus funciones homeostáticas, inmunitarias o ambas.

La CCL2 es la principal quimiocina implicada en el proceso endotelial inflamatorio, principal comorbilidad de la AOS, atrayendo monocitos y macrófagos a la placa de ateroma (17).

Los niveles de CCL2 también se encuentran elevados en biopsias gingivales y en el suero de pacientes con periodontitis (18), siendo los fibroblastos, los monocitos, los macrófagos y las células endoteliales los principales productores de CCL2 en el periodonto.

En general, después de recibir el estímulo de las citoquinas inflamatorias, sirva la Leptina como ejemplo, las quimiocinas como la CCL2 se secretan para reclutar macrófagos, linfocitos y neutrófilos.

En la AOS, las apneas recurrentes generan una gran cantidad de radicales libres de oxígeno (RLO) dando lugar a un estrés oxidativo jugando un papel crítico en la disfunción endotelial. La CCL2 es la principal quimiocina implicada en el proceso endotelial inflamatorio (17).

Este estrés oxidativo puede causar daño en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, células endoteliales (116). De este modo enzimas, proteínas estructurales, membranas, moléculas de ADN y ARN son susceptibles de sufrir daño, por lo que cabría esperar alteraciones en el ARNm de la CCL2 y en el ARNm de la leptina y el ARNm del receptor de la leptina.

6. Justificación e hipótesis.

Las enfermedades periodontales constituyen un grupo de patologías de carácter inflamatorio e infeccioso que afecta a los tejidos de soporte, tanto del diente como de los implantes. Dada su elevada prevalencia y relación, cada vez más estudiada en los últimos años, con enfermedades sistémicas de gran impacto sobre el sistema sanitario, como es el caso de la AOS, resultaría de gran utilidad el uso de biomarcadores que proporcionaran información diagnóstica y pronóstica, pudiendo ser cada vez más precoces en nuestras actuaciones.

La evidencia de que los mediadores inflamatorios juegan un importante papel en la patogénesis de la AOS y de la periodontitis, así como que ambos comparten factores de riesgo comunes podría sugerir una asociación entre ellas (10), así como con el sistema inmune innato y adaptativo, y el efecto que la inflamación ejerce en la coagulación. Las medidas clínicas y radiográficas son la base para el diagnóstico de la periodontitis, pero ofrecen poca información sobre la patogenia de la enfermedad.

Si los estadios de la clasificación periodontal nos hablan de la gravedad actual del proceso, el recuento de células sanguíneas nos hablan de la inflamación local, los grados de la enfermedad nos hablan de la dificultad de manejo y progresión, los marcadores inflamatorios hematológicos nos hablan de la inflamación sistémica, y los niveles de lípidos se relacionan con el metabolismo óseo **¿podemos establecer una relación entre las concentraciones de estos marcadores biológicos obtenidos de una analítica básica de sangre y los estadios y grados de la enfermedad periodontal y el efecto de la periodontitis en el paciente AOS?**

La proporción de leucocitos en sangre se han propuesto como biomarcadores simples, rápidos, económicos y de fácil acceso para estudiar la inflamación sistémica.

No obstante, poco se ha estudiado sobre la relación de la proporción neutrófilo-linfocitos (NLR), la proporción plaquetas-linfocitos (PLR) y la proporción linfocitos-monocitos (LMR) con la periodontitis, por lo que podrían servir como biomarcadores potenciales de inflamación sistémica y servir también de ayudan en el diagnóstico y estudio de la progresión de la periodontitis.

Estudios recientes muestran una asociación entre los niveles altos de HDL y una disminución de la DMO.

La leptina, junto con su receptor, es una citoquina cuyo aumento de nivel puede suponer un mecanismo de defensa del huésped durante un proceso infeccioso liberándose en respuesta al estrés, actuando como un reactante de fase aguda (12). Es decir, se comporta como una proteína cuya concentración aumenta o disminuye durante estados inflamatorios o infecciosos, por lo que nos sirve como elemento diagnóstico, al poder definir la presencia y el grado del proceso.

La fisiopatología de la apnea también contribuye a cambios inflamatorios, con aumento de citoquinas plasmáticas (TNF- α , IL-6) y los niveles de leptina.

A su vez, la saturación mínima de oxígeno (SaO₂) y el volumen de grasa visceral se relaciona con unos niveles altos de IL-6 y de la PCR ultrasensible, siendo la gravedad de la AOS, predictora de los niveles de IL-6 y PCR ultrasensible.

Teniendo en cuenta que en la literatura hay estudios que revelaron niveles de ARNm de leptina más altos en los tejidos conectivos inflamados de los pacientes periodontales que en los tejidos sanos del grupo control no periodontal (15), la implicación de ARNm de leptina en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad periodontal, que el patrón de expresión de ARN de la saliva permitía discriminar entre periodontitis y pacientes sin periodontitis (16) y que los niveles de la proteína quimioatrayente de monocitos (CCL2) también se encuentran elevados en biopsias gingivales y en suero en los pacientes periodontales (17) y siendo la CCL2 la principal quimiocina implicada en la inflamación endotelial (18) que como se sabe, supone una de las complicaciones más importantes en la AOS, en base a esta información y continuando con la premisa de cumplir la característica básica de un biomarcador.

¿Por qué no plantearnos el análisis de la expresión del ARNm de la leptina, del ARNm del receptor de la leptina y el ARNm de CCL2 en la saliva como método sencillo y no invasivo en lugar de una biopsia de tejido?

7. Objetivos.

El objetivo principal del presente estudio es:

- estudiar el efecto que la inflamación de bajo grado, asociada a la enfermedad periodontal, produce a nivel sistémico en un grupo de pacientes diagnosticados de periodontitis, AOS con periodontitis y AOS sin periodontitis.
- valorar si las concentraciones de NLR, MLR, PLR, HDL, IL-6 y fibrinógeno, obtenidos en una analítica de sangre, presentan variaciones entre los distintos grupos de estudio y podrían ser utilizados como posibles biomarcadores.
- determinar si los niveles de expresión de ARNm de la leptina, ARNm del receptor de la leptina y ARNm de la CCL2 obtenidos en la muestra de saliva se comportarían como biomarcadores cuyas concentraciones aumentarían o disminuirían según los estadios y grados de la enfermedad periodontal y la gravedad del AOS.

8. Material y método.

8.1. Diseño y ámbito del estudio.

Estudio observacional de cohorte prospectivo donde las variables principales del estudio, la enfermedad periodontal y la AOS, nos definen los siguientes grupos: Casos (pacientes periodontales + AOS, pacientes periodontales no AOS) y controles (pacientes no periodontales + AOS), emparejados por edad y sexo.

El tamaño muestral se calculó aceptando un riesgo α de 0,05 y un riesgo β de 0,2 en un contraste bilateral en un análisis de proporciones independientes habiendo analizado un total de 52 pacientes periodontales, 30 pacientes AOS periodontales y 31 pacientes AOS no periodontales. El total de los pacientes incluidos en el estudio fue de $n=113$.

El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki para la investigación médica en humanos y recibió la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia (Anexos).

El lugar donde se realizó el estudio fue el servicio de Estomatología situado en la sexta planta del edificio de consultas externas del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia (figura 6).



Figura 6: Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Para las muestras de saliva, se realizó un primer estudio piloto en el Laboratorio Progenie Molecular SLU. (figura 7) situado en la calle Vall de la Ballestera,56, 46015.Valencia.



Figura 7: Laboratorio Progenie Molecular.

Tras confirmar que la detección del ARNm de la leptina era posible, el resto de las muestras de salivas fueron procesadas para la determinación de la expresión de ARNm de la leptina, ARNm del receptor de la leptina y el ARNm de la CCL2 contando con la colaboración del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia situado en la calle Eduardo Primo Yúfera 3 (figura 8).



Figura 8: Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

8.2. Selección y muestreo de pacientes.

Se incluyeron pacientes de edades comprendidas entre los 16 y 65 años que no presentaban antecedentes médicos de interés y que aceptaron participar voluntariamente mediante la firma del consentimiento informado después de una explicación completa de los objetivos y procedimientos del estudio.

El tamaño de la muestra $n=113$, queda repartido en los siguientes grupos:

-grupo casos ($n=30$ pacientes periodontales + AOS, $n= 52$ pacientes periodontales no AOS) y controles ($n=31$ pacientes no periodontales + AOS), emparejados por edad y sexo.

8.2.1. Criterios de inclusión de los pacientes.

Los participantes del estudio debían tener edades comprendidas entre 16 y 65 años y haber sido diagnosticados previamente de AOS mediante poligrafía respiratoria. Haberles realizado un estudio periodontal para la determinación de su salud gingival o diagnóstico de la periodontitis por estadio y grado. Aceptar voluntariamente su colaboración en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

8.2.2. Criterios de exclusión de los pacientes.

Menores de 16 años y mayores de 65 años; menos de 15 dientes (excluidos los terceros molares); pacientes que hubieran recibido tratamiento periodontal en los últimos 12 meses; antibióticos sistémicos, corticosteroides, terapia inmunosupresora u otros fármacos que influyeran sobre el sistema inmune dentro de los 3 meses previos a la evaluación periodontal; enfermedades infecciosas; afecciones inflamatorias crónicas; enfermedades sistémicas graves; embarazo o lactancia; sujetos que rechazaran la participación en el estudio.

8.3. Control de sesgos.

Una de las principales características de los pacientes con AOS es la presencia de bruxismo, siendo la prevalencia de la AOS en este grupo tres veces mayor que en la población general. Existe una correlación estadísticamente significativa entre la gravedad del AOS y la gravedad del desgaste dental (117).

Para tratar de controlar posibles sesgos, se le pasó la escala de somnolencia de Epworth (36,118) y el test Stop-Bang a aquellos pacientes con importantes desgastes dentales en el momento de inclusión.

Ante la sospecha de que pudiera tratarse de un posible caso de AOS no diagnosticado por la puntuación obtenida, el paciente fue derivado al servicio de otorrinolaringología para la confirmación del diagnóstico. Ambas pruebas figuran en el apartado Anexo.

Todos los parámetros clínicos se evaluaron tras de la recolección de la muestra de saliva y la analítica de sangre, para evitar la contaminación de las muestras.

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de cada paciente que acudió al hospital en ayunas, mediante punción venosa obteniéndose dos tubos. Uno de los tubos contenía EDTA y fue utilizado para el análisis de células sanguíneas mediante analizadores de hematología, el otro no contenía EDTA y se usó para el análisis de proteínas séricas mediante analizador bioquímico.

Laboratorio:

Se recogió una muestra de saliva en reposo, ya que la concentración de proteínas es mayor en la saliva en reposo que en la saliva estimulada.

Los exosomas salivales parecen ser responsables de la presencia de diferentes tipos de ARN en la saliva libre de células, incluido el ARNm y varios tipos de ARN no codificante, incluido el microARN, el ARN que interactúa con piwi y el ARN circular, y existen similitudes en los perfiles de estas moléculas en saliva, líquido cefalorraquídeo y suero.

Como se ha comentado, las señales de estas moléculas son más altas en la saliva no estimulada que en la saliva estimulada y pueden mejorar aún más mediante el enriquecimiento de exosomas/micropartículas de la saliva (119).

Las muestras de saliva se recogieron entre las 9 y 10 horas de la mañana de acuerdo con los protocolos previos publicados (120,121). Se pidió a los pacientes no comer, beber, fumar, masticar goma de mascar o limpiarse los dientes al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra (recomendable 2 horas).

El paciente permaneció en reposo durante unos minutos previo a la toma de la muestra, se enjuagó previamente con un poco de agua, tal como marca el protocolo del kit y se le pidió que durante dos minutos acumulara en la boca la saliva que iba produciendo para posteriormente depositarla en un bote estéril, concretamente tubos tipo Falcon de 50 ml DNasa-RNasa free.

Mediante micropipeta desechable con filtro (PIPETMAN^R) (figura 9) se transfirió parte de la muestra de saliva a unos tubos de muestra, siempre con guantes para evitar cualquier contaminación que es crucial en los procesos de extracción de ARN.

Los tubos fueron identificados con un código compuesto por la inicial del nombre y primer apellido del paciente en mayúscula y los dos últimos dígitos del SIP, cumpliendo así con el criterio de pseudoanonimación de las muestras.

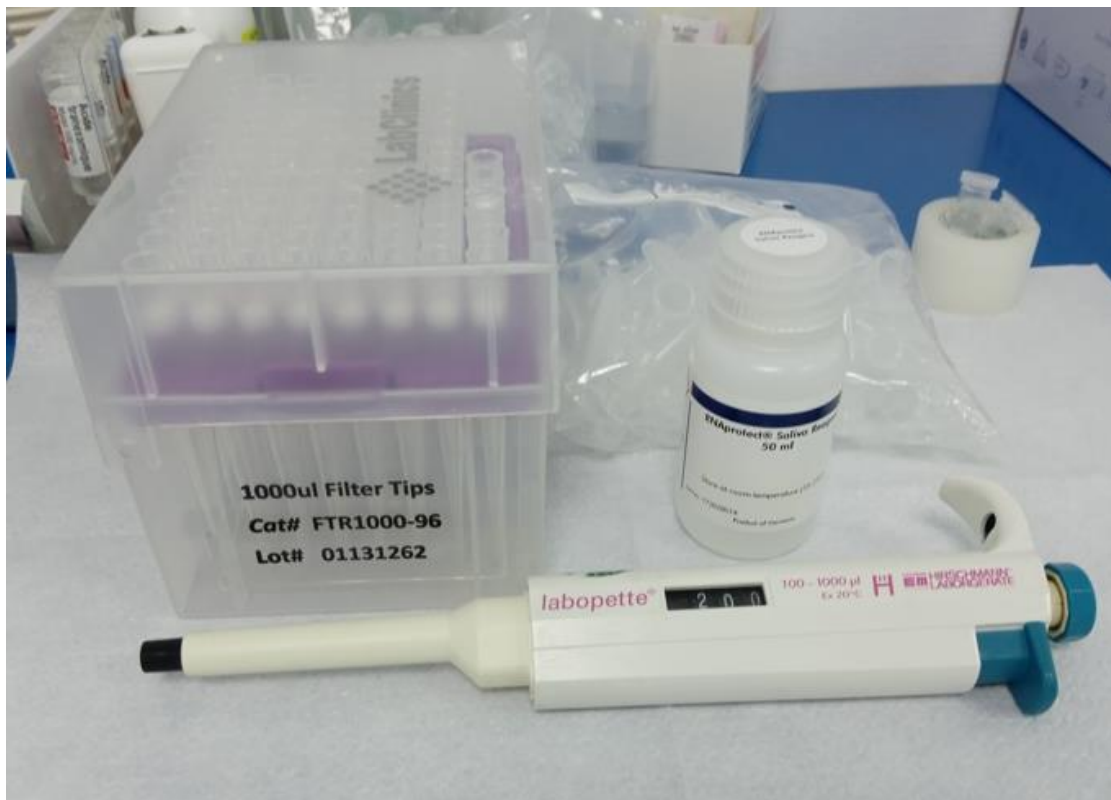


Figura 9: RNAprotect^R Saliva Reagent.



Figura 10: Gabinete de trabajo del Hospital universitario Doctor Peset.

Aunque ya éramos conocedores de la presencia de ADN de la leptina en la saliva (90), se realizó una prueba previa de confirmación (figura 11) donde, mediante la técnica de PCR, se confirmó la presencia del ADN de la leptina en una muestra de saliva.

Mediante electroforesis en gel, los fragmentos de ADN migraron al aplicar una carga eléctrica. Donde se encontraba el ADN se aplicó una carga negativa y en el opuesto una carga positiva, al aplicar la carga el ADN empezó a migrar.

Lo que determina cuanto migra un fragmento en un determinado tiempo depende de lo pequeño que sea el fragmento.

El gel que se emplea es un polisacárido que actuaría como una malla y es por eso por lo que las partículas de menor tamaño pasarán más fácilmente a través de él.

Esto nos ayuda a saber la longitud relativa de estos fragmentos. Para poder medirlas entrarían en juego los marcadores de ADN. Según esos marcadores podemos saber el número de pares de bases de las muestras. Al añadir un pigmento fluorescente, concretamente bromuro de etilo, con luz fluorescente lo podemos visualizar (122).

Lo importante en esta imagen, son las bandas de los carriles primero, tercero, cuarto y sexto. El carril segundo y quinto son marcadores de peso molecular que habíamos mencionado, usados como controles, confirmando así la presencia de ADN de la leptina.

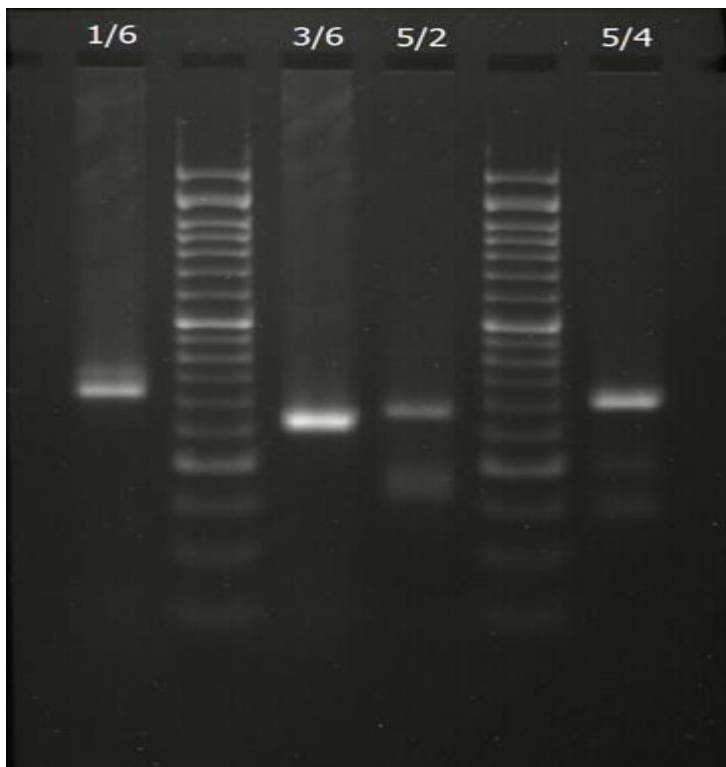


Figura 11: PCR de ADN de la leptina.

Las muestras de saliva fueron tratadas siguiendo el protocolo de estabilización de ARN en saliva usando RNAsprotect Saliva Reagent^R (QIAGEN).

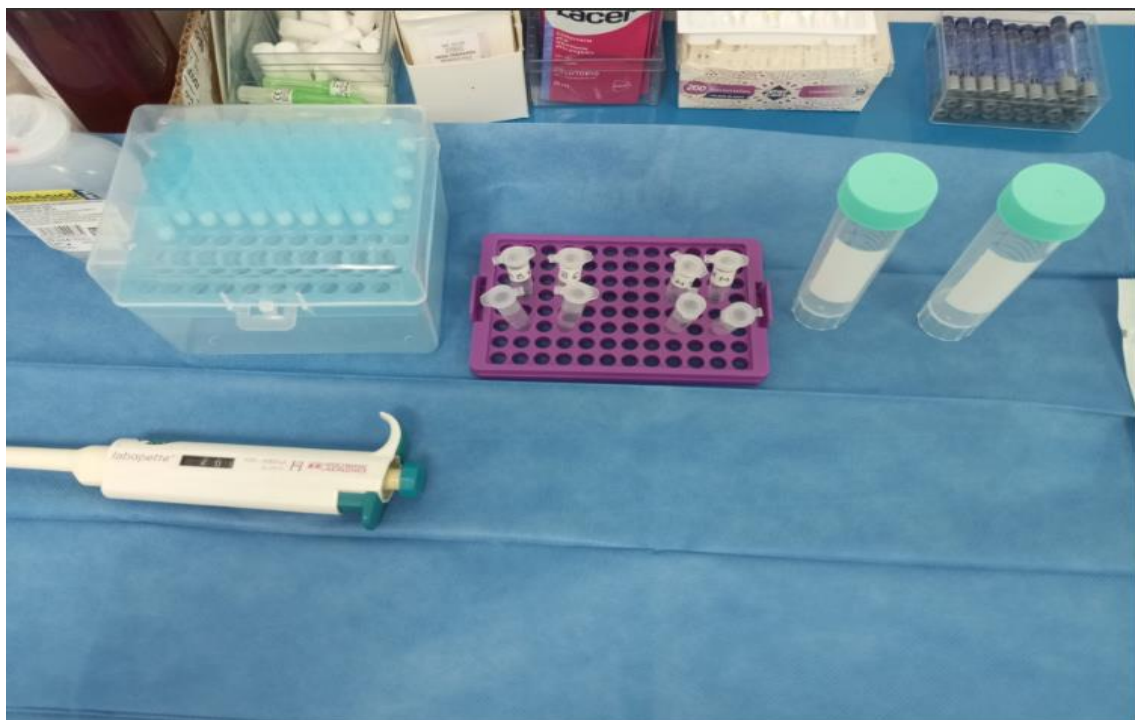


Figura 12: Preparación toma muestra de saliva.

A diferencia del ADN, el ARN es muy inestable una vez obtenido, por la presencia de las RNAsas celulares (123), por ello es crucial su rápida homogenización en la solución desnaturalizante y su congelación. Una fuente potencial de contaminación con RNAsas son las procedentes de las células epidérmicas de las manos del investigador. Es obligado por tanto el uso de guantes tanto al realizar la extracción como al preparar las soluciones. Se añadió, 200µl de la muestra de saliva recolectada, a 1ml de RNAprotect Saliva Reagent^R mezclándolo bien.

Para minimizar los cambios de temperatura el tubo de muestra de recolección de saliva se mantuvo fresco en hielo seco y las muestras de saliva ya estabilizadas fueron transportadas también cubiertas por hielo seco hasta el congelador de farmacocinética del hospital donde posteriormente fueron almacenadas a -23°C en un tiempo inferior a 7 minutos. Mientras, al paciente se le realizaba la extracción de sangre.

Se realizó un primer estudio con las primeras doce muestras recolectadas. Muestras que correspondían a pacientes periodontales, AOS periodontales, AOS no periodontales y una muestra control de la investigadora principal.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio para ser procesadas sin romper la cadena del frío mediante un congelador y acumuladores de frío.

Antes de usar el RNeasy Micro Kit hubo que preparar etanol al 80% y al 70%:

- EtOH 80%: 24 ml de EtOH absoluto + 6 ml DNase-RNase-free water.

-EtOH 70%: 21 ml de EtOH absoluto + 9 ml DNase-RNase-free water.

Procedimiento de laboratorio:

1. Hubo que centrifugar la mezcla de saliva y RNA protect durante 10 min a 10.000 x g en una microcentrifugadora. Al estar las muestras congeladas, permanecieron previamente en una habitación a temperatura ambiente antes de la centrifugación.
2. Hubo que eliminar el sobrenadante completamente pipeteando.
3. Se añadió 350µl de Buffer RLT mezclando completamente.
4. A continuación la muestra fue incubada a 37° C en un Thermomixer hasta su completa descongelación y disolución de las sales.
5. Añadimos un volumen de 350µl de etanol al 70 % mezclando, pero no centrifugando.
6. Se transfirió la muestra a una columna RNeasy de la centrifugadora en un tubo de muestra de 2ml y se centrifugó durante 15 s a más de 8000 rpm.
7. Se eliminó el filtrado y se añadió 350µl de Buffer RW1 a la columna RNeasy MinElute y se volvió a centrifugar a más de 8000rpm durante 15 s.

8. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 10µl de la solución DNase I a 70µl de Buffer RDD y se mezcló invirtiendo el tubo. Esta preparación fue añadida a la columna RNeasy e incubada entre 20-30° C durante 15 minutos. Después hubo que añadir 350µl de Buffer RW1 y centrifugar nuevamente 15s a más de 8000rpm.

9. Añadimos 500µl de etanol al 80% y volvimos a centrifugar 2 minutos a 8000rpm.

10. Finalmente se añadió 14 µl de RNeasy libre de agua, así conseguimos una elución que es el proceso de extraer un material de otro lavando con un solvente y obtenemos la concentración total de ARN.

A la hora de ejecutar la PCR, QIAGEN recomendaba el uso de QIAGEN One Step Ahead RT-PCR Kit^R.

Tras realizar la estabilización de todas las muestras según el protocolo anteriormente, se procedió a su tratamiento para el análisis.

En algunas muestras, previo a la extracción del ARNm, se formaron precipitados que eran paciente-dependientes y que dificultaron en gran medida el proceso. Dichos precipitados saturaban las columnas reduciendo significativamente el rendimiento de la prueba (figura 13).



Figura 13: Precipitado.

Para poder realizar la qPCR, como en nuestro caso la muestra era un ARNm, previamente hubo que hacer una retrotranscripción (RT) para poder obtener una cadena de ADN complementario (cDNA) de nuestro ARNm. Para dicha reacción se usó una enzima llamada retrotranscriptasa y que se obtiene a partir de ciertos retrovirus como el VIH. Para hacer la RT: PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time). Takara. Ref: RR036A.

Seguidamente se tomó una solución de alícuota y se sometió a una reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores o también llamados primers que tienen que ser específicos para nuestro ARNm y cuya función es limitar la región a amplificar (tabla 6).

PRIMERS	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLICÓN
hGAPDH F	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	256
Hgapdh R	CACCACCCTGTTGCTGTAGC	
LEP-F1	TGACACCAAAACCCTCATCA	95
LEP-R1	CCAAACCGGTGACTTTCTGT	
LEPR-F1	CCACCATTTGGTACCATTTCC	139
LEPR-R1	CCTCATACGAAGACCCAGGA	
PPIA-F1	CCTAAAGCATACGGGTCCTG	133
PPIA-R1	TTTCACTTTGCCAAACACCA	
RPL19-F	CGAATGCCAGAGAAGGTCAC	157
RPL19-R	CCATGAGAATCCGCTTGTTT	

Tabla 6: Primers utilizados.

La química que utilizamos fue el SYBR. Se trata de una molécula orgánica muy usada en biología molecular. El SYBR emite fluorescencia en el momento en el que el ADN está en estructura de doble cadena. Dentro de los diferentes pasos de la qPCR solo puede ser detectada en el paso de extensión y es ahí donde al programar el protocolo podemos obtener los datos. Para hacer las qPCR: SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus). Takara. Ref: RR420A).

El equipo de q-PCR que se usó fue el LC480 II de Roche Diagnostics y las placas fueron las PCR-384-LC480-WF de Axygen.

La qPCR es una variante de la PCR a punto final donde se monitoriza la cantidad de copias de nuestra muestra a amplificar (amplicón), que se van generando en cada uno de

los ciclos. En la qPCR los datos los vamos obteniendo mientras la PCR está en marcha pudiendo ver los ciclos de amplificación en tiempo real. Los datos vienen dados por la Ct o Cp (ciclo umbral) que representa el ciclo en el cual nuestro amplicón ha empezado a amplificar (figura 14 y 15).

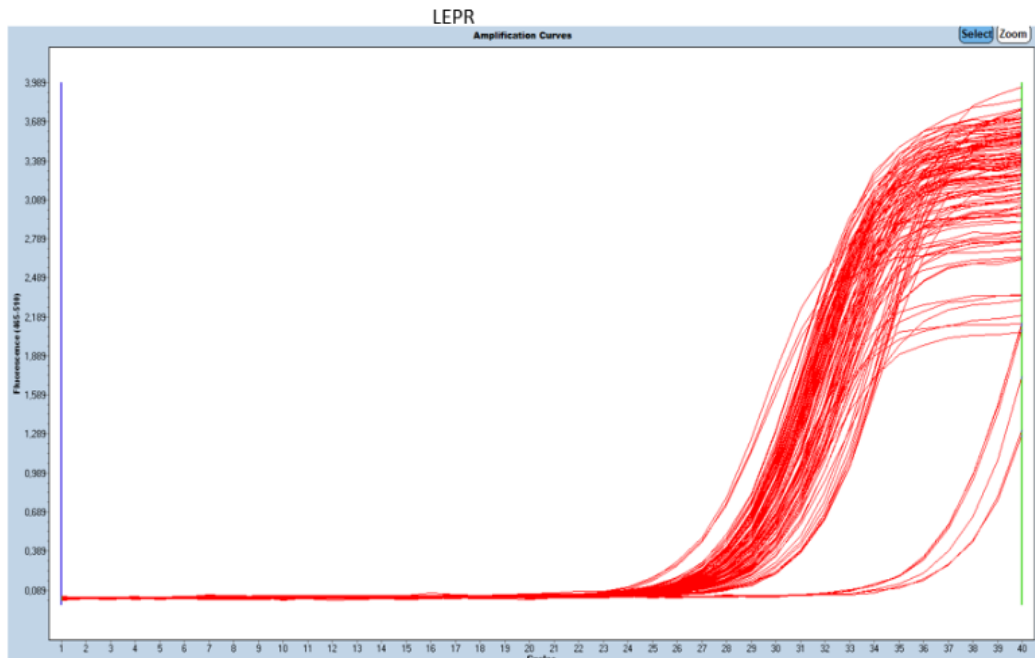


Figura 14: Curva de amplificación qPCR de LEPR.

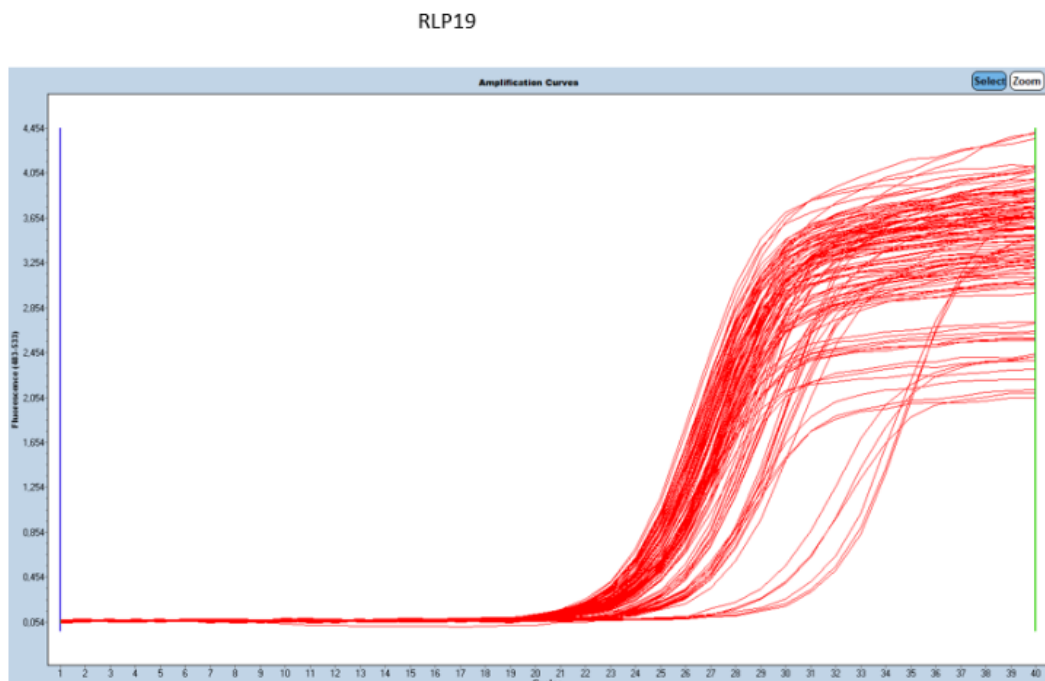


Figura 15: Curva de amplificación de RLP19 (housekeeping).

Poder cuantificar el número de copias de ARNm que existe en una célula o el porcentaje que representa respecto al resto de mensajeros es muy importante para comprender su importancia en la vida de la célula. En nuestro caso, al ser un estudio donde la cuantificación fue relativa y se trataba de un experimento de expresión génica, necesitamos referenciar nuestros datos a un housekeeping, también llamado gen constitutivo. Son genes que están implicados en funciones básicas de supervivencia celular por lo que se estima que su nivel de expresión es siempre constante. Se utilizan como un control interno. Es importante saber si la concentración obtenida es debida a una mayor expresión de ARNm o porque se introdujo un mayor número de células en la muestra.

En nuestro caso, se utilizaron 6 genes housekeeping, aunque los que mejor funcionaron fueron GAPDH, PPIA, RPL19.

Para el análisis estadístico de datos, el ciclo umbral es el primer ciclo en el que se observa un aumento detectable de la fluorescencia debido a la formación de productos en la qPCR.

El umbral debe marcarse en un gráfico de amplificación logarítmico generándose unas curvas de calibración para la cuantificación tanto absoluta como relativa.

Las técnicas de cuantificación relativa determinan el cociente entre la cantidad de ADN diana y un amplicón de referencia, con una expresión constitutiva no variable.

Dado que este método mide la cantidad diana respecto a un control a priori invariable, este método ofrece la ventaja de reducir las posibles variaciones que se puedan producir tanto en la preparación como en la manipulación de la muestra.

El resultado final de este método se presenta como el cambio en la expresión del gen objetivo en una muestra objetivo en relación con una muestra de referencia, normalizada con respecto a un gen de referencia, en otras palabras, expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control. La expresión relativa de los niveles de ARNm de la leptina, receptor de la leptina y CCL2 fue calculada usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que es el método recomendado para este tipo de estudios (123, 124).

Para realizar el cálculo en primer lugar se sacó el promedio de los 3 housekeeping.

A continuación, se obtuvo el promedio deltaCT (DCt) de cada una de las muestras para cada gen de estudio (promedio de los valores de Ct de cada una de las muestras).

El siguiente paso consiste en restarle al promedio DCt de cada muestra, su promedio de los 3 housekeeping.

Si hacemos el sumatorio de todos los deltas Ct de las muestras para cada gen de estudio y sacamos su promedio, tendremos el average delta Ct.

Para calcular el 2 delta-delta Ct (2DDCt), solo tenemos que restarle al delta Ct de cada muestra el average delta Ct que obtuvimos en el paso anterior, finalizando con el cálculo logarítmico del 2^{-2DDCt} .

-Anamnesis y exploración clínica:

Paralelamente se fueron obteniendo los datos de la exploración clínica.

Mediante un cuestionario estructurado se obtuvo información sobre edad, sexo, historia médica general (enfermedades actuales, antecedentes médicos de interés, alergias/Reacciones adversas a medicamento, medicación actual (dosis) y hábitos tóxicos (tabaco/alcohol).

Se incluyeron los siguientes parámetros:

Parámetros antropométricos:

- peso (kg) mediante báscula electrónica (con estimación de 0.1Kg) con ropa ligera y sin zapatos.

- talla (cm) con estadiómetro (con estimación de 0.5cm) con cabeza erguida y alineada siguiendo la línea trago-comisural y sin zapatos.

Parámetros bioquímicos de analítica básica detallada (glucosa, urea, creatinina, filtrado glomerular estimado, ácido úrico, colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicéridos.

Proteínas específicas (PCR ultrasensible), marcadores tumorales (IL-6), coagulación (fibrinógeno), hemograma (hematíes, hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM, CHCM, ADE, leucocitos, neutrófilos absolutos, linfocitos absolutos, monocitos absolutos, eosinófilos absolutos, basófilos absolutos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas VPM).

Se calculó el NLR, LMR y PLR y se obtuvo el valor del HDL, fibrinógeno, IL-6 y PCR ultrasensible.

Historia del sueño:

- índice apnea hipoapnea por hora de sueño (IAH) que se mide en la poligrafía cardiorrespiratoria y que se emplea para el diagnóstico de la AOS.
- saturación de oxígeno.
- Índice de desaturación de oxígeno (ODI).

Determinación de ARNm de leptina, **ARNm** del receptor de la leptina y **ARNm** de CCL2 en muestra de saliva.

Parámetros periodontales:

- profundidad de sondaje (PS), seis puntos por cada diente.
- recesión gingival.
- pérdida de inserción clínica (PIC).
- índice de sangrado en cuatro puntos del diente.
- porcentaje pérdida ósea.
- ratio pérdida ósea/edad.
- estadio/grado de la enfermedad periodontal.

A continuación, se hizo exploración oral general y periodontal, registrando los datos en el correspondiente periodontograma.

Para poder medir la pérdida ósea necesaria para el cálculo del porcentaje de pérdida ósea y la ratio de pérdida ósea por edad de la forma más precisa posible, se usó el programa DSD Template^R que nos permitió medir todas las radiografías del mismo modo. Para calibrar la posible magnificación de la ortopantomografía se midió en boca el diámetro mesiodistal del 11, y en la radiografía para hacer la corrección pertinente de escala diente.

El tratamiento periodontal no quirúrgico incluyó tanto la administración de instrucciones de higiene bucal como el procedimiento de raspado y alisado radicular, que fue realizado con la ayuda de raspadores ultrasónicos y curetas de mano (raspadores y curetas Hu-Friedy, Chicago, IL, EE. UU.) por la investigadora principal a todos los pacientes que pertenecían al grupo caso.

Para la toma de decisiones en el diagnóstico de la periodontitis y su posterior clasificación por estadio y grado, se tuvo en cuenta el árbol clínico de toma de decisiones traducido por la Sociedad española de periodoncia (SEPA) de la Federación Europea de Periodoncia (125), (figura 16 y 17).

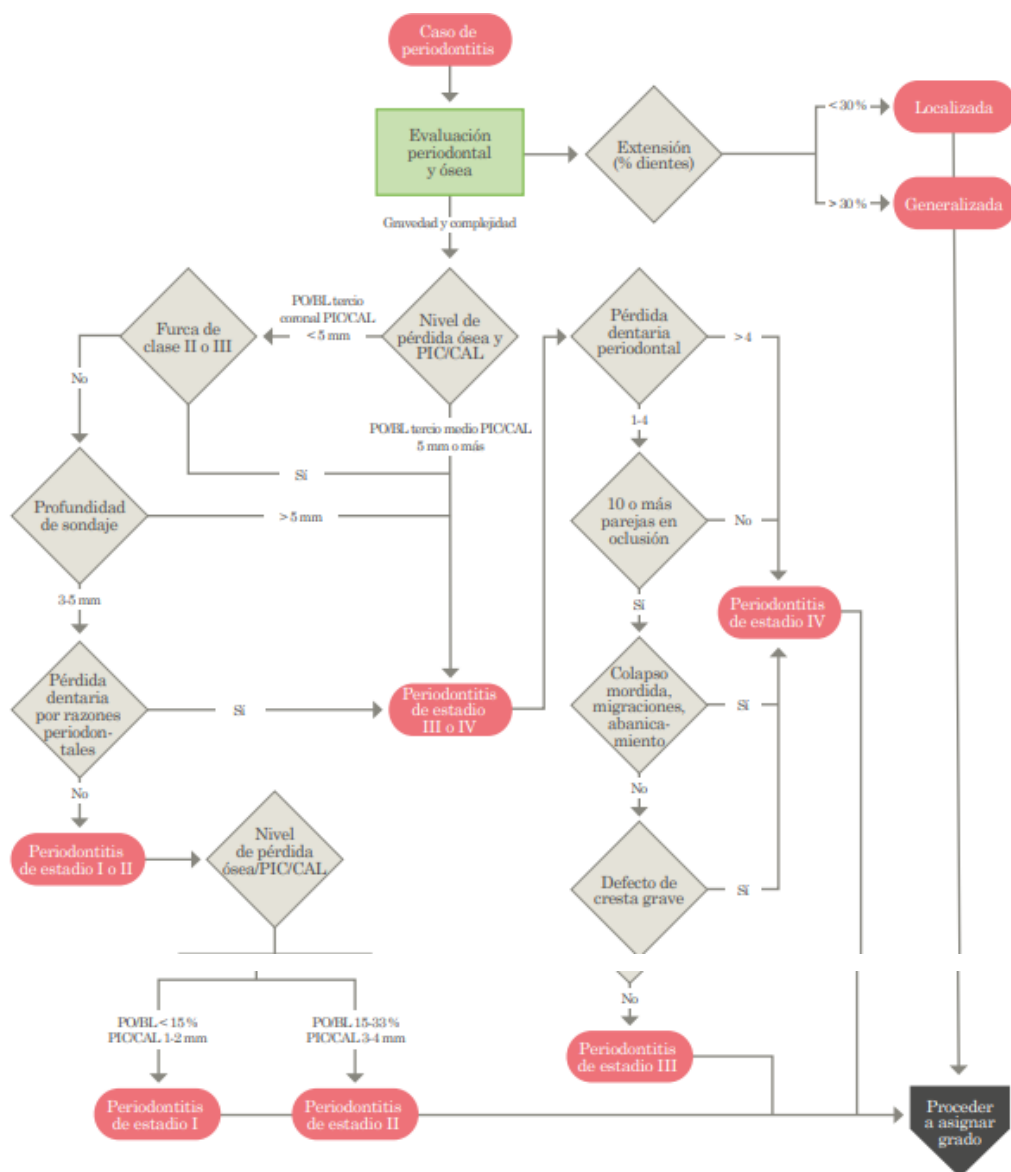


Figura 16: Árbol clínico para la clasificación por estadio.

Tonetti, MS y Sanz M. Implementation of the New Classification of Periodontal Diseases: Decision-making Algorithms for Clinical Practice and Education. Journal of Clinical Periodontology, 2019.

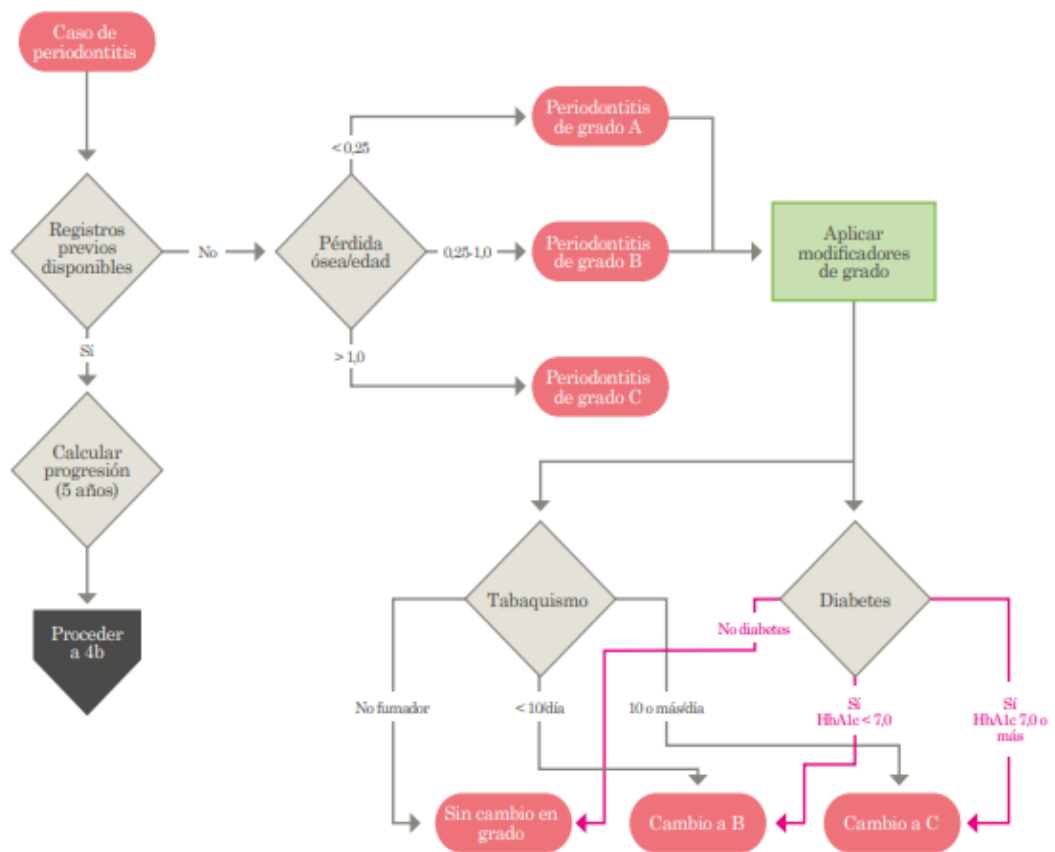


Figura 17: Árbol clínico para el diagnóstico por grado. Tonetti, MS y Sanz M.

Implementation of the New Classification of Periodontal Diseases: Decision-making Algorithms for Clinical Practice and Education. Journal of Clinical Periodontology, 2019

8.4. Análisis estadístico.

El análisis descriptivo nos proporcionó los estadísticos más relevantes para todas las variables recogidas en la investigación: media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana (para parámetros continuos) y frecuencias absolutas y relativas (para categóricos).

Se aplicó el test de Shapiro-Wilk para contrastar el ajuste a normalidad de los diferentes parámetros en los grupos, obteniéndose un resultado que indicaba falta de normalidad en la mayoría ($p < 0,05$). Por tanto, el enfoque de análisis utilizado fue de tipo no paramétrico.

El análisis inferencial consistió en:

- Prueba de Mann-Whitney: esta prueba se utiliza para comparar las distribuciones de dos grupos independientes cuando los datos no cumplen con los supuestos de normalidad o la homogeneidad de varianzas. Se utilizó la corrección de Bonferroni cuando se estudiaron comparaciones múltiples.
- Prueba de Kruskal-Wallis: se emplea para comparar las medianas de tres o más grupos independientes, siendo una alternativa no paramétrica a la ANOVA. Este método es adecuado cuando los datos no cumplen con los supuestos de normalidad o la homogeneidad de varianzas. El procedimiento se basa en los rangos de las observaciones, permitiendo identificar si existen diferencias significativas entre los grupos sin asumir una distribución específica de los datos.
- Correlación de Spearman: su finalidad es evaluar la relación monotónica entre dos variables, prescindiendo de la necesidad de que la relación sea lineal o que los datos sigan una distribución normal. El procedimiento implica el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman, basado en los rangos de las observaciones, lo que la convierte en una elección robusta para capturar relaciones no lineales y trabajar con variables ordinales.

Un test F del modelo ANOVA alcanza una potencia del 81,1% para detectar diferencias en las medias de un biomarcador en los 3 grupos compatibles con un tamaño de efecto medio ($f=0,3$), asumiendo un nivel de confianza del 95%.

9. Resultados.

La muestra para la investigación estuvo constituida por $n= 113$ pacientes divididos en tres grupos:

- Grupo noAOS+EP: 52 pacientes (46,0% del total)
- Grupo AOS+no EP: 31 pacientes (27,4% del total)
- Grupo AOS+EP: 30 pacientes (26,5% del total)

En total había 66 varones (58,4%) y 47 mujeres (41,6%) con una edad media global de $48,2 \pm 11,0$ años en un rango de 16 a 65. A nivel de grupo presentaban la siguiente distribución:

- Grupo noAOS+EP: 22 varones (42,3%) y 30 mujeres (57,7%) con una edad media de $45,5 \pm 10,9$ años.
- Grupo AOS+noEP: 24 varones (77,4%) y 7 mujeres (22,6%) con una edad media de $49,0 \pm 12,2$ años.
- Grupo AOS+EP: 20 varones (66,7%) y 10 mujeres (33,3%) con una edad media de $52,1 \pm 8,6$ años.

9.1. Marcadores inflamatorios según grupo.

A continuación, se muestra un resumen del resultado de las pruebas estadísticas que comparan medias para cada parámetro de estudio. La finalidad es evaluar las diferencias entre grupos de forma global y a nivel individual mediante todos los contrastes posibles dos a dos.

NLR

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido a la ratio neutrófilos-linfocitos. A continuación, se muestra de forma gráfica la distribución de sus valores para cada grupo (gráfico 1).

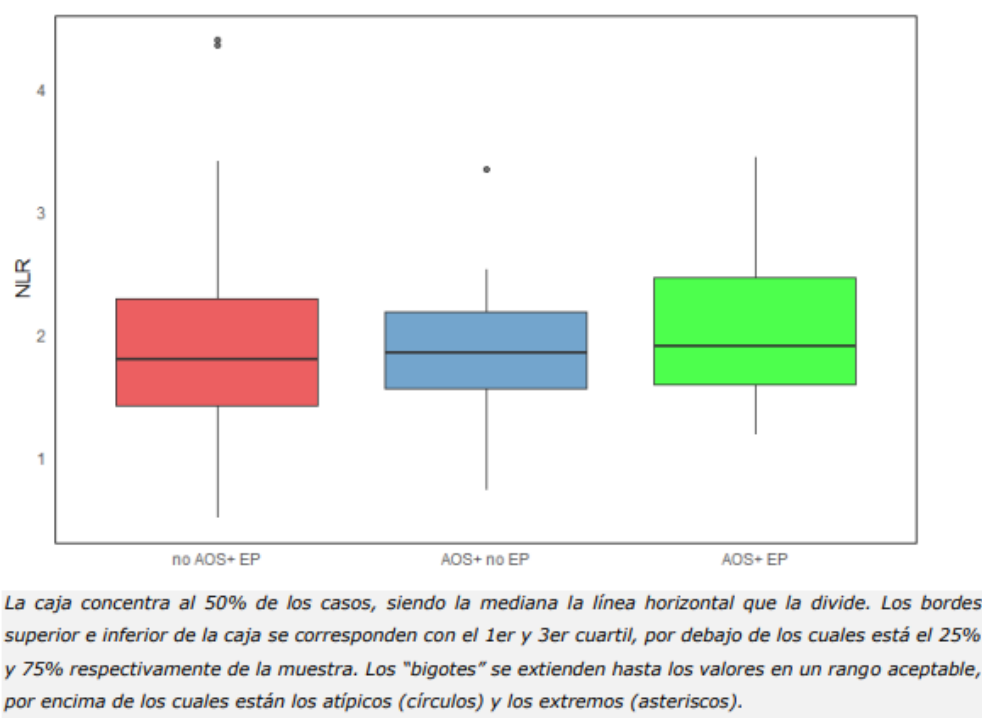


Gráfico 1: Distribución de la ratio NLR.

En el gráfico se pueden observar características muy similares entre los grupos.

No se encontraron diferencias globales entre los tres grupos analizados ($p=0.304$).

Observamos valores medios bastante homogéneos: 1.90 para el grupo noAOS+EP, 1.85 para el grupo AOS+noEP y 2.11 para el grupo AOS+EP y, de igual modo, para las medianas de distribución.

Ninguna de las combinaciones fue significativa, confirmándose que la homogeneidad global observada con anterioridad se mantiene a nivel individual.

LMR

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido a la ratio linfocitos-monocitos. A continuación, se muestra de forma gráfica la distribución de sus valores para cada grupo (gráfico 2).

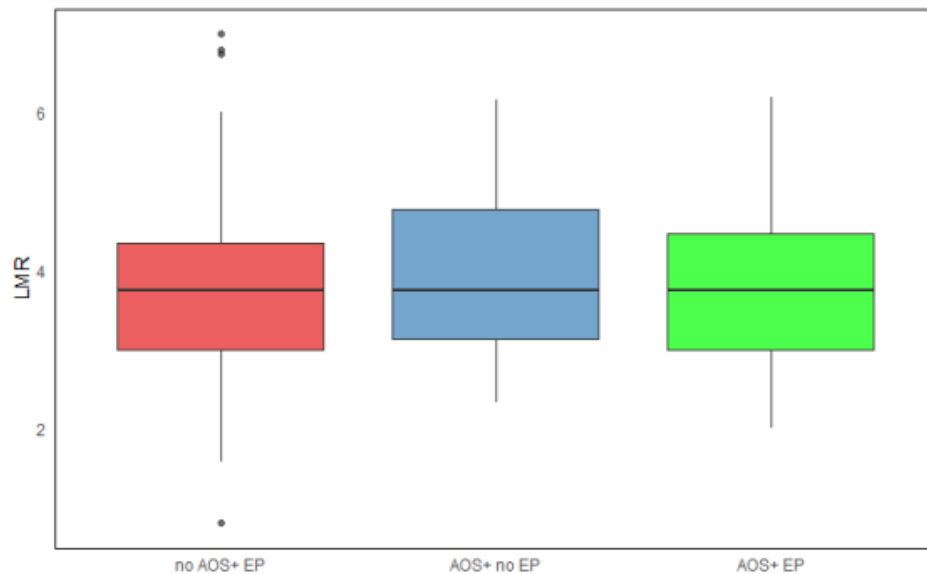


Gráfico 2: Distribución de la ratio LMR.

En el gráfico se observan características muy similares entre grupos.

No existían diferencias globales entre los tres grupos analizados ($p=0,744$). Se pueden observar valores medios bastante homogéneos: 3,79 en el grupo no AOS+EP, 4,02 en el grupo AOS+noEP y 3,80 en el grupo AOS+EP.

Ninguna de las combinaciones fue significativa. Esto indica que la homogeneidad global observada con anterioridad se mantiene a nivel individual.

PLR

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido a la ratio plaquetas-leucocitos. Se muestra de forma gráfica la distribución de sus valores para cada grupo.

En el gráfico se observan características muy similares entre grupos (gráfico 3).

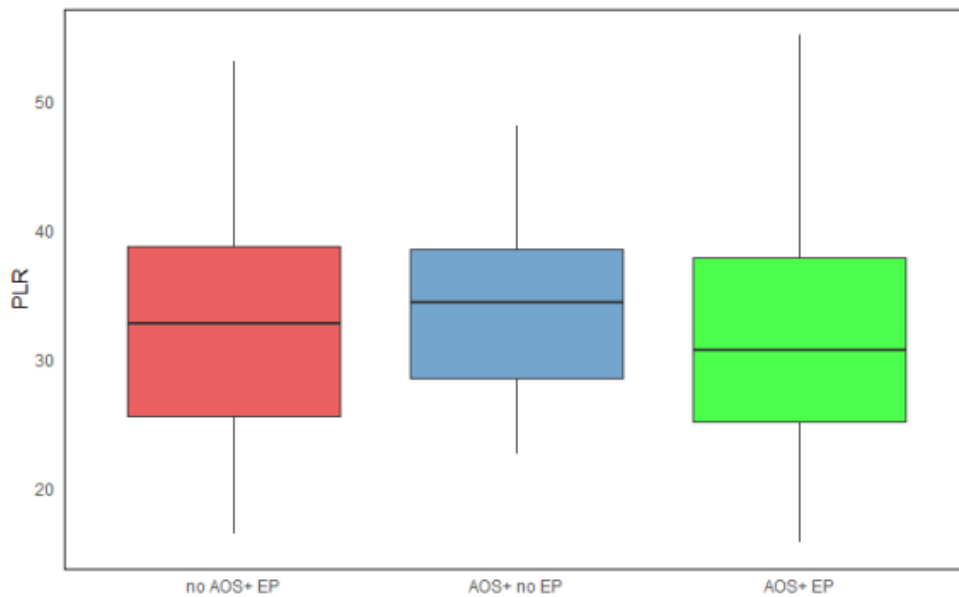


Gráfico 3: Distribución de la ratio PLR.

No existen diferencias globales entre los tres grupos analizados ($p=0,482$). En la tabla 10 se pueden observar valores medios razonablemente homogéneos: 32,28 en el grupo noAOS+EP, 34,05 en el grupo AOS+noEP y 32,04 en el grupo AOS+EP.

Ninguna de las combinaciones resultó significativa. Esto indica que la homogeneidad global observada con anterioridad se mantiene a nivel individual.

PCR

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido a la proteína C reactiva (gráfico 4).

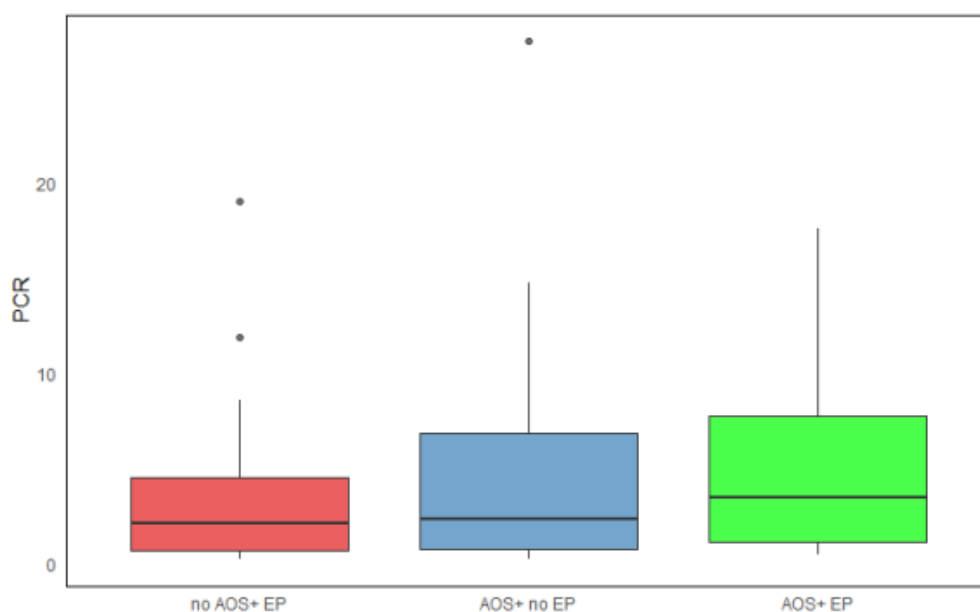


Gráfico 4: Distribución de la PCR.

En el gráfico no se observan diferencias notables, aunque el grupo AOS+EP parece tener una PCR ligeramente más elevada que la del grupo no AOS+EP. No existían diferencias globales entre los tres grupos analizados ($p=0,142$). En la tabla 12 se pueden observar los siguientes valores medios: 3,26 en el grupo noAOS+EP, 4,76 en el grupo AOS+no EP y 5,45 en el grupo AOS+EP.

Ninguna de las combinaciones fue significativa. Esto indica que la homogeneidad global observada con anterioridad se mantiene a nivel individual.

IL-6

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido a la interleucina 6. Se muestra de forma gráfica la distribución de sus valores para cada grupo. Se observaron notables diferencias entre grupos a nivel descriptivo. El grupo AOS+EP tiene el máximo valor para IL-6, seguido por el grupo AOS+no EP. El grupo noAOS+EP

tiene el valor más bajo (gráfico 5).

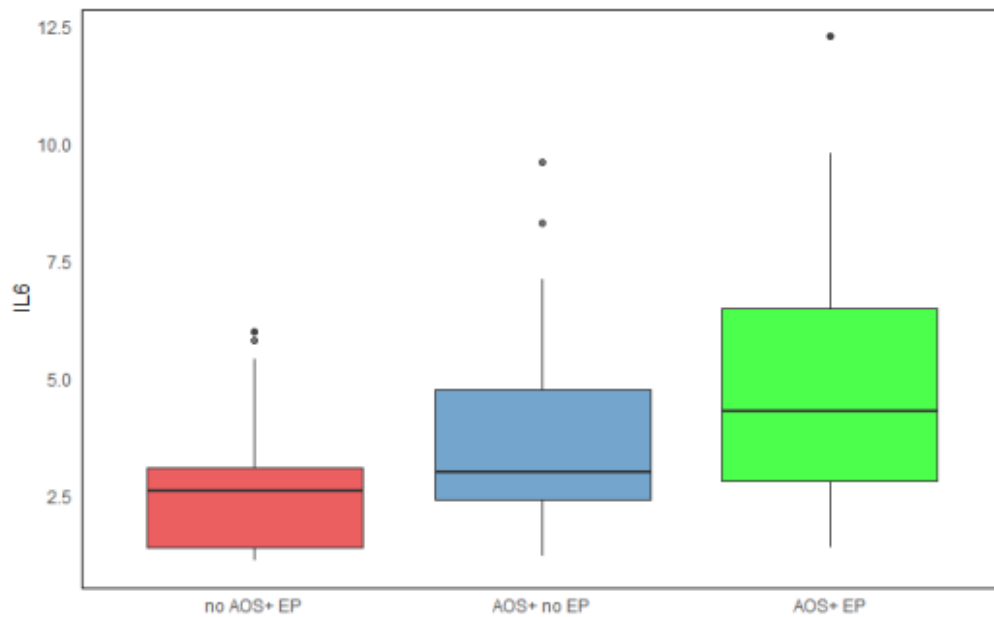


Gráfico 5: Distribución de la IL-6.

Las diferencias observadas en la descriptiva son significativas ($p < 0,001$). Encontramos los siguientes valores medios: 2,61 en el grupo noAOS+EP, 3,71 en el grupo AOS+no EP y 4,98 en el grupo AOS+EP.

A nivel individual encontramos diferencias significativas entre el grupo noAOS+EP (valor medio de 2,61) y el grupo AOS+no EP (valor medio de 3,71) y entre el grupo noAOS+EP y el grupo AOS+EP (valor medio de 4,98).

No así entre el grupo AOS+no EP y el AOS+EP.

HDL

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido al colesterol HDL. Se muestra de forma gráfica la distribución de sus valores para cada grupo.

A nivel descriptivo se observan notables diferencias entre el grupo noAOS+EP y los otros dos, los cuales parecen similares entre sí (gráfico 6).

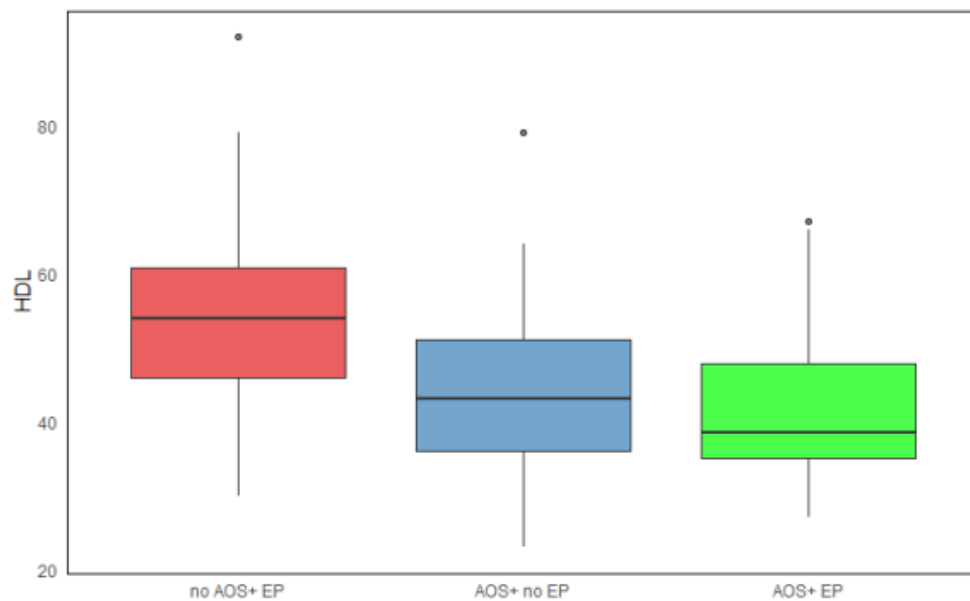


Gráfico 6: Distribución de HDL.

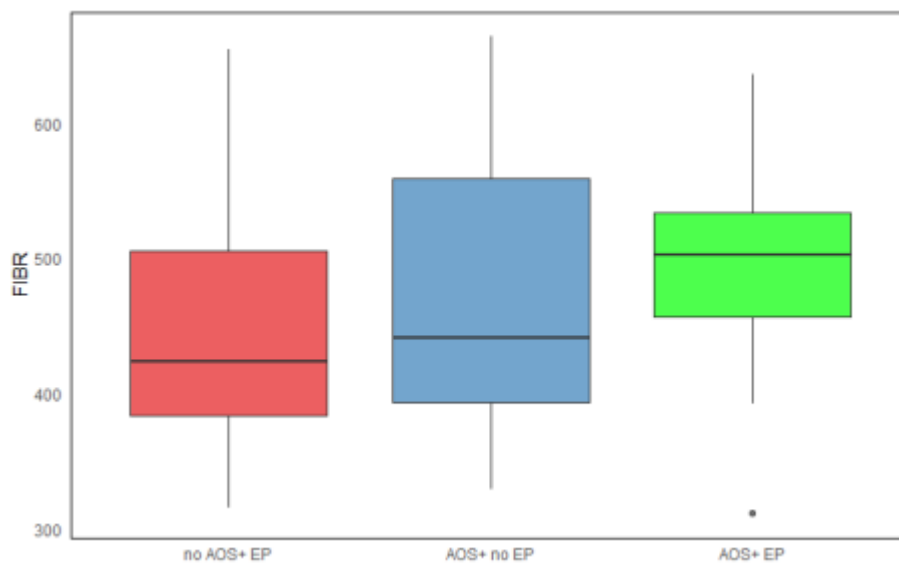
Las diferencias observadas previamente en la descriptiva son significativas ($p < 0,001$). Se pueden observar los siguientes valores medios: 54,6 en el grupo noAOS+EP, 44,9 en el grupo AOS+no EP y 41,3 en el grupo AOS+EP.

A nivel individual encontramos diferencias significativas entre el grupo noAOS+EP (valor medio de 54,6) y el grupo AOS+no EP (valor medio de 44,9) y entre el grupo noAOS+EP y el grupo AOS+EP (valor medio de 41,3).

No así entre el grupo AOS+no EP y el AOS+EP. Esto es coherente con lo observado con anterioridad en el análisis descriptivo.

FIBRINÓGENO

Se estudió si existían diferencias globales e individuales entre grupos en lo referido al fibrinógeno. Se muestra de forma gráfica la distribución de sus valores para cada grupo (gráfica 7).



Gráfica 7: Distribución del Fibrinógeno.

A nivel descriptivo se observaron notables diferencias entre el grupo AOS+EP y los otros dos, los cuales parecen similares entre sí.

Las diferencias observadas previamente en la descriptiva son significativas ($p=0,033$). En la tabla 18 se pueden observar los siguientes valores medios: 444,8 en el grupo no AOS+EP, 472,0 en el grupo AOS+no EP y 490,3 en el grupo AOS+EP.

A nivel individual encontramos diferencias significativas entre el grupo noAOS+EP (valor medio de 444,8) y el grupo “AOS+EP” (valor medio de 490,3). No así entre el grupo noAOS+EP y AOS+no EP ni entre el AOS+no EP y el AOS +EP.

9.2. Marcadores inflamatorios según variables periodontales.

En este apartado se estudió la relación entre los marcadores inflamatorios y las variables periodontales en los grupos noAOS+EP y AOS+EP. Se muestra a continuación, para cada combinación de variables en cada grupo, su coeficiente de correlación R y su significación:

Existía correlación positiva con efecto relevante (o marginalmente significativo) entre el fibrinógeno y la ratio PO/E ($p=0,074$; $r=0,255$) y entre el fibrinógeno y la pérdida ósea ($p=0,070$; $r=0,258$). Esto indica que una ratio PO/E elevado y una elevada pérdida ósea se asocian a valores altos de fibrinógeno, y viceversa. La magnitud de las correlaciones es, en cualquier caso, débil ($r<0,3$).

Se muestran gráficamente las correlaciones estadísticamente relevantes encontradas para el grupo noAOS+EP (gráfico 8).

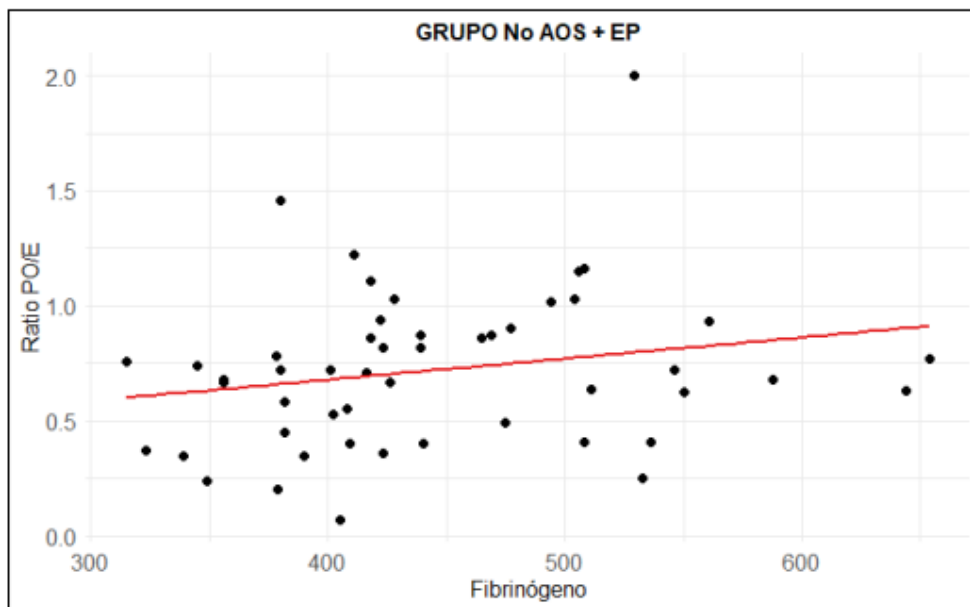


Gráfico 8: Dispersión entre el Ratio PO/E y Fibrinógeno en grupo noAOS+EP.

Cada punto representa una observación en el conjunto de datos, mostrando la relación entre dos variables. La posición de cada punto en el eje x e y indica los valores de las dos variables para esa observación. La dispersión de los puntos revela la variabilidad y patrones en la relación entre las variables. La línea de tendencia proporciona una representación visual de la dirección y la fuerza de la relación entre las variables.

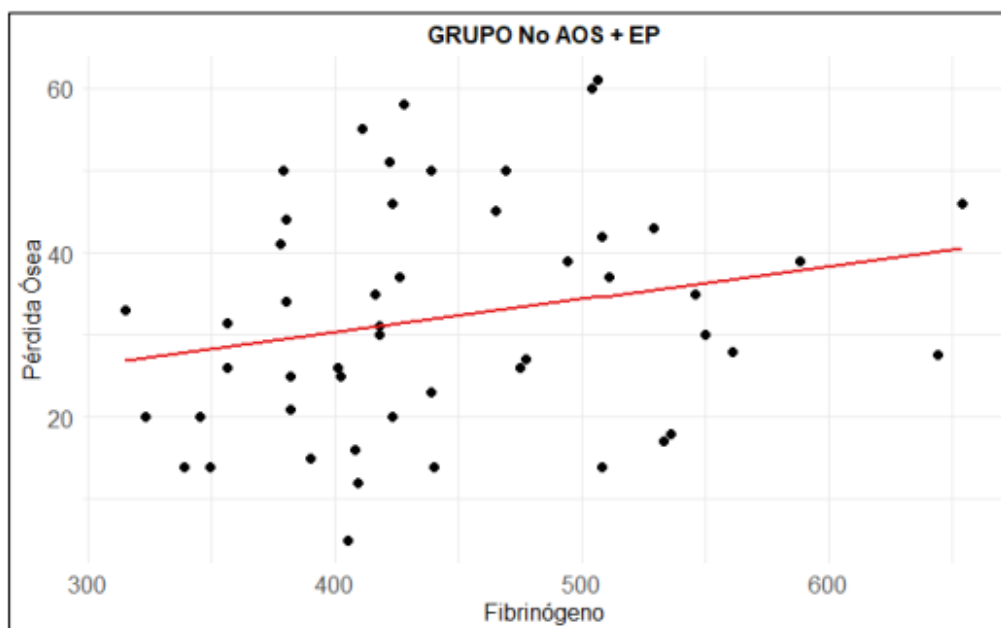


Gráfico 9: Correlación entre Pérdida Ósea y Fibrinógeno en grupo noAOS+EP.

Se llevó a cabo el mismo proceso para el grupo AOS+EP:

Existieron correlación negativa con efecto significativo entre el LMR y el grado ($p=0,033$; $r=-0,396$) y entre el PLR y el grado ($p<0,001$; $r=-0,683$). Esto indica que un LMR y PLR mayor se asocia a un menor grado, y viceversa. Existió una correlación positiva con efecto relevante entre el NRL y el grado ($p=0,066$; $R=0,346$). Un mayor NRL se asocia a un mayor grado, y viceversa. Por último, se observa correlación negativa con efecto relevante entre el PCR y la ratio PO/E ($p=0,071$; $R=-0,347$) y entre el PCR y la pérdida ósea ($p=0,052$; $R=-0,371$).

Se muestran gráficamente las correlaciones significativas y las estadísticamente relevantes (gráfico 10, 11 y 12).

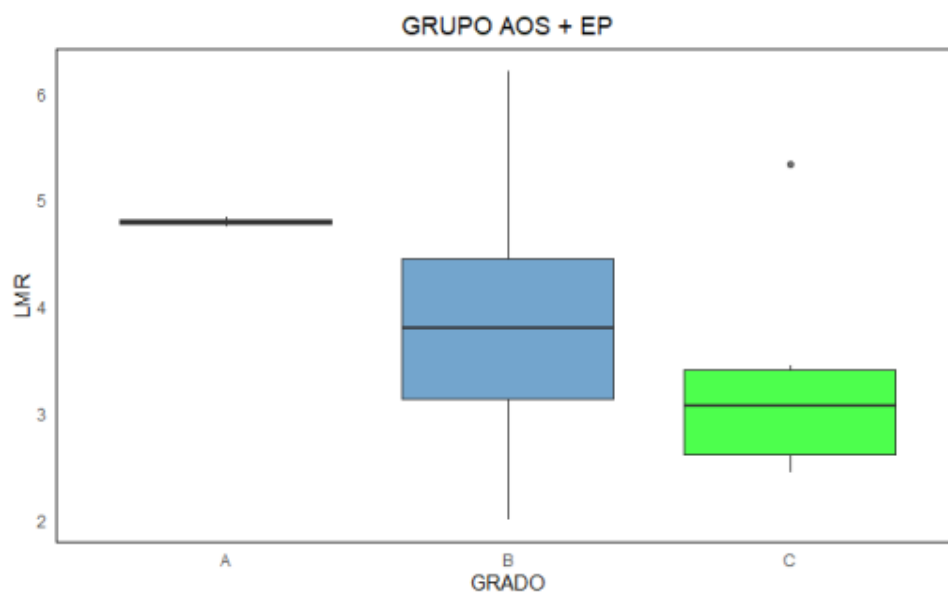


Gráfico 10: Correlación entre la ratio LMR y el Grado de la enfermedad periodontal en AOS+EP.

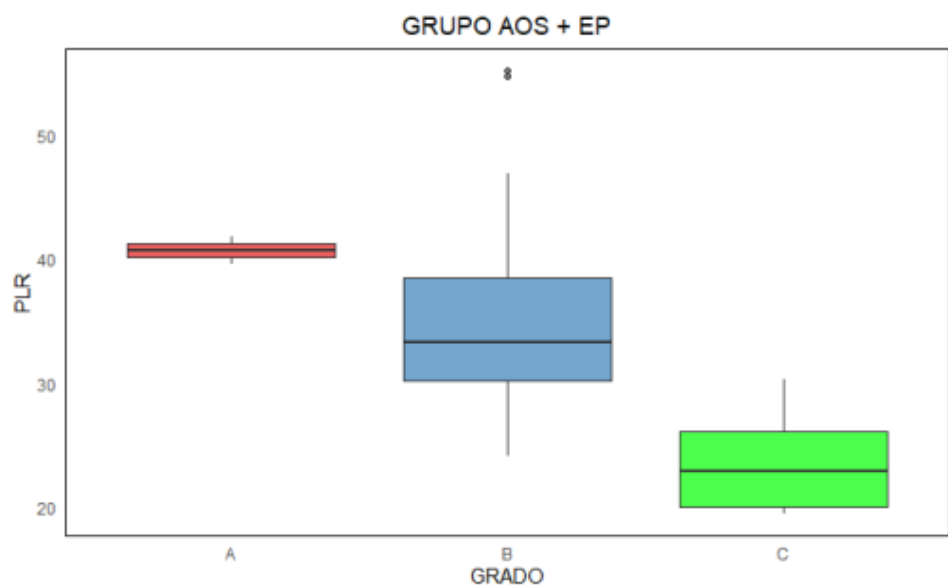


Gráfico 11: Correlación entre la ratio PLR y el Grado de la enfermedad periodontal en AOS+EP.

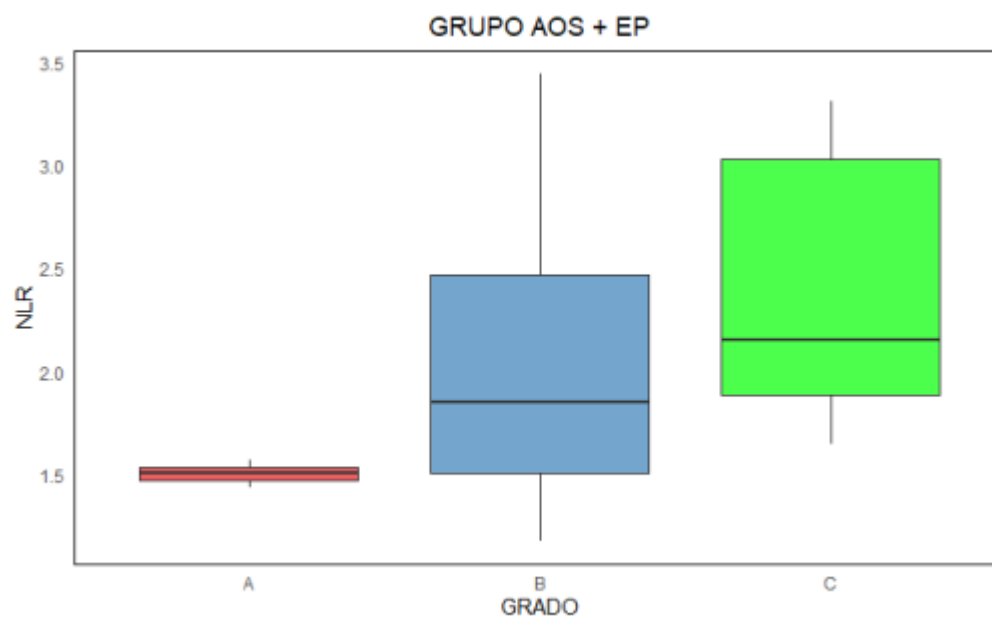


Gráfico 12: Correlación entre la ratio NLR y el Grado de la enfermedad periodontal en AOS+EP.

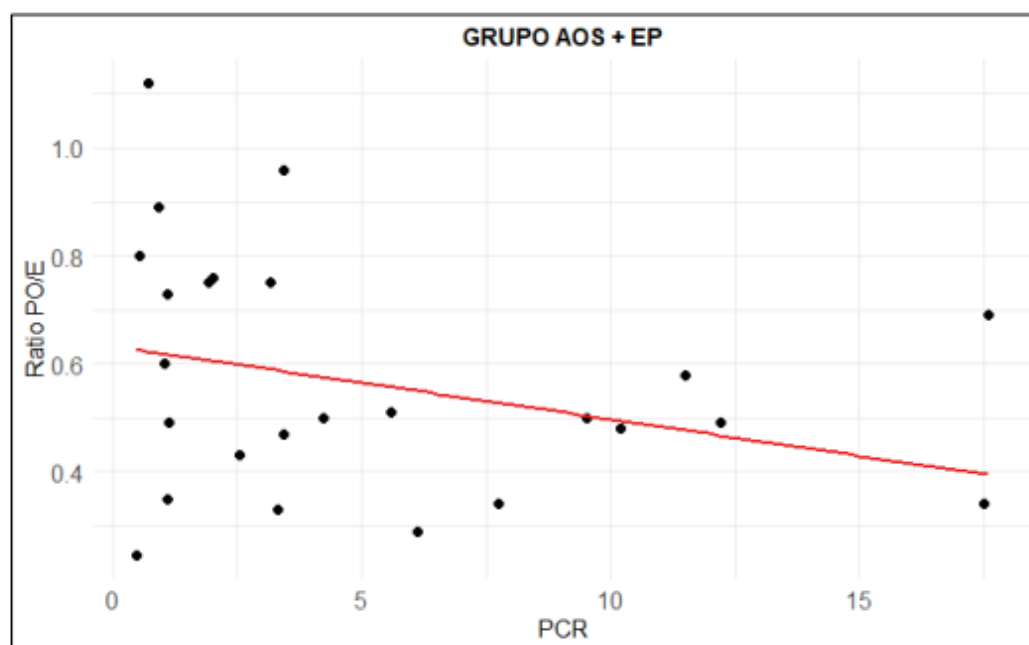


Gráfico 13: Correlación entre la ratio PO/E y la PCR en AOS+EP.

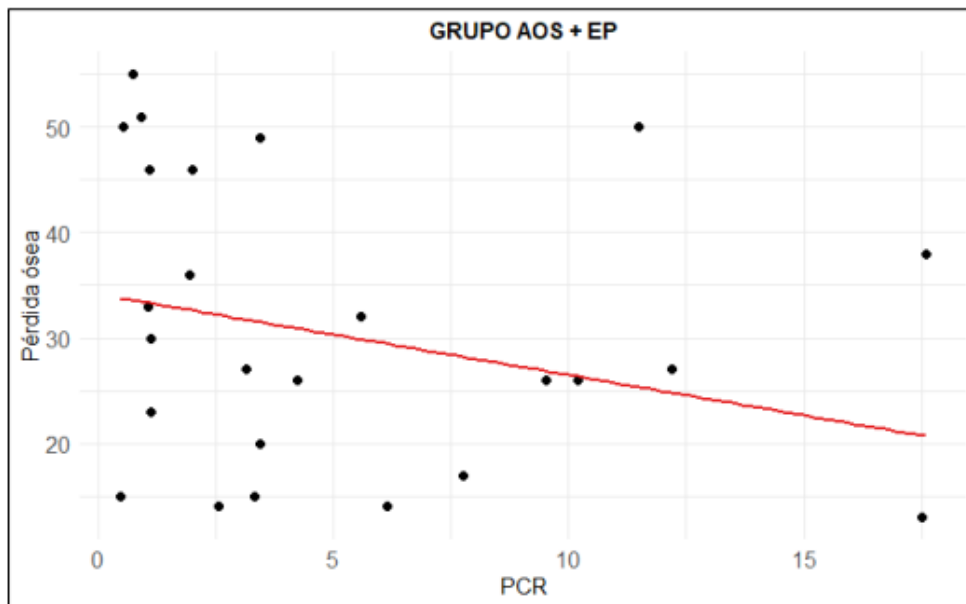


Gráfico 14: Correlación entre Pérdida Ósea y PCR en AOS+EP.

El comportamiento gráfico coincide con las correlaciones estudiadas con anterioridad. Correlaciones positivas se asocian a una tendencia creciente (pendiente positiva), mientras que correlaciones negativas son asociables a tendencias decrecientes (pendiente negativa).

9.3. Comparativa entre estadio/grado entre grupos noAOS+EP y AOS+EP.

Se llevó a cabo una comparación entre los grupos noAOS+EP y AOS+EP en búsqueda de diferencias a nivel de estadio y grado. Se muestra de forma gráfica la distribución de ambos según grupo.

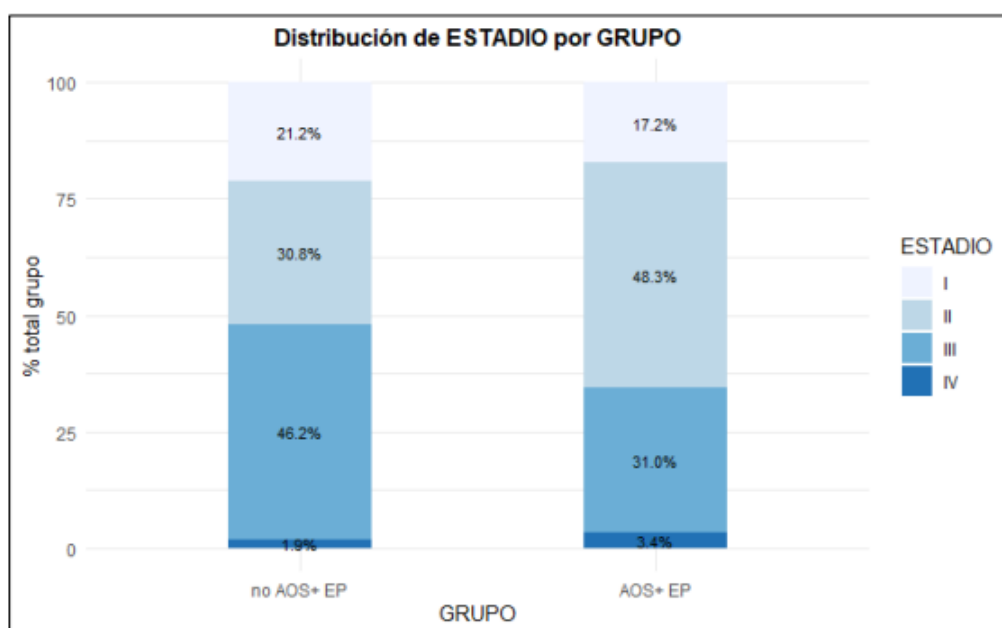


Gráfico 15: Distribución de Estadio periodontal en AOS+EP y noAOS+EP.

Se observaron leves diferencias en los estadios II y III de ambos grupos. Parece que en noAOS+EP existe una leve tendencia al estadio III, mientras en AOS+EP dicha tendencia es al estadio II. En general los comportamientos son razonablemente homogéneos.

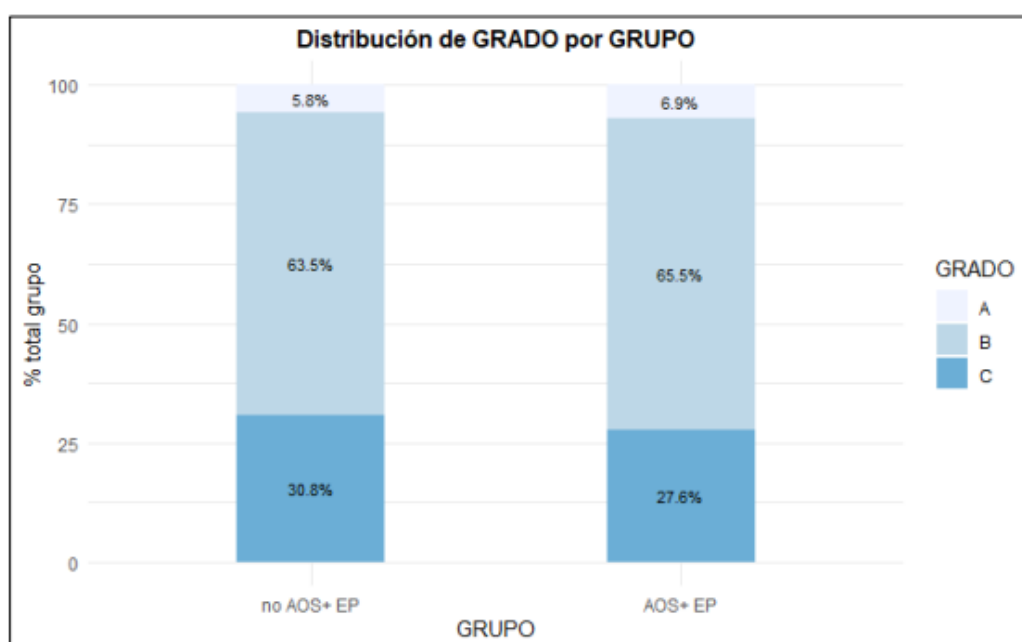


Gráfico 16: Distribución del Grado periodontal en AOS+EP y no AOS+EP.

En este caso las distribuciones parecen completamente homogéneas y no se observaron diferencias notables en ningún nivel.

No se observaron diferencias significativas entre grupos para estadio o grado. Esto es acorde con lo observado en la descriptiva.

9.4. Relación entre estadio/grado con nivel de ODI en AOS+EP.

Se estudió la correlación del índice de desaturación de oxígeno con el estadio y el grado en el grupo AOS+EP.

Tabla 7: Relación ODI con Estadio y Grado en AOS+EP.

Relación del ODI con estadio y grado para grupo "AOS+ EP": resultados del test correlación de

	r	p-valor
ODI vs ESTADIO	0,109	0,575
ODI vs GRADO	0,035	0,855

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observaron correlaciones significativas, por lo que se puede concluir que no parece existir relación entre estas variables.

9.5. Relación entre marcadores inflamatorios con nivel de ODI en AOS+no EP y AOS+EP.

Se estudió la correlación del índice de desaturación de oxígeno con los marcadores inflamatorios en los grupos AOS+no EP y AOS+EP.

Tabla 8: Relación entre marcadores inflamatorios y ODI en AOS+noEP.

	r	p-valor
ODI vs NLR	-0,010	0,959
ODI vs LMR	0,161	0,387
ODI vs PLR	-0,220	0,234
ODI vs PCR	-0,097	0,603
ODI vs IL6	0,168	0,366
ODI vs HDL	-0,271	0,140
ODI vs FIBR	0,007	0,970

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observaron correlaciones significativas entre el ODI y los marcadores inflamatorios para el grupo AOS+noEP.

Tabla 9: Relación entre marcadores inflamatorios y ODI en AOS+EP.

	r	p-valor
ODI vs NLR	-0,106	0,576
ODI vs LMR	0,187	0,323
ODI vs PLR	-0,031	0,870
ODI vs PCR	0,131	0,490
ODI vs IL6	0,195	0,310
ODI vs HDL	0,003	0,986
ODI vs FIBR	-0,011	0,955

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se encontraron correlaciones significativas entre el ODI y los marcadores inflamatorios para el grupo AOS+EP.

9.6. Relación del IMC con estadio y grado en noAOS+EP y AOS+EP

Se estudió la correlación del índice de masa corporal con el estadio y el grado de la enfermedad periodontal en los grupos noAOS+EP y AOS+EP.

Tabla 10: Relación entre IMC y Estadio y Grado en no AOS+EP.

	r	p-valor
IMC vs ESTADIO	0,156	0,269
IMC vs GRADO	-0,126	0,375

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observó una correlación significativa entre el IMC y ninguna de las dos variables estudiadas en el grupo noAOS+EP.

Tabla 11: Relación entre IMC y Estadio y Grado en AOS+EP.

	r	p-valor
IMC vs ESTADIO	-0,185	0,337
IMC vs GRADO	0,295	0,121

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observó una correlación significativa entre el IMC y ninguna de las dos variables estudiadas en el grupo AOS+EP.

9.7. Correlación entre ARNm de CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR intra y entre Grupos.

Se muestra gráficamente el comportamiento de los valores que toma cada ARNm dentro de cada grupo (gráfico 17).

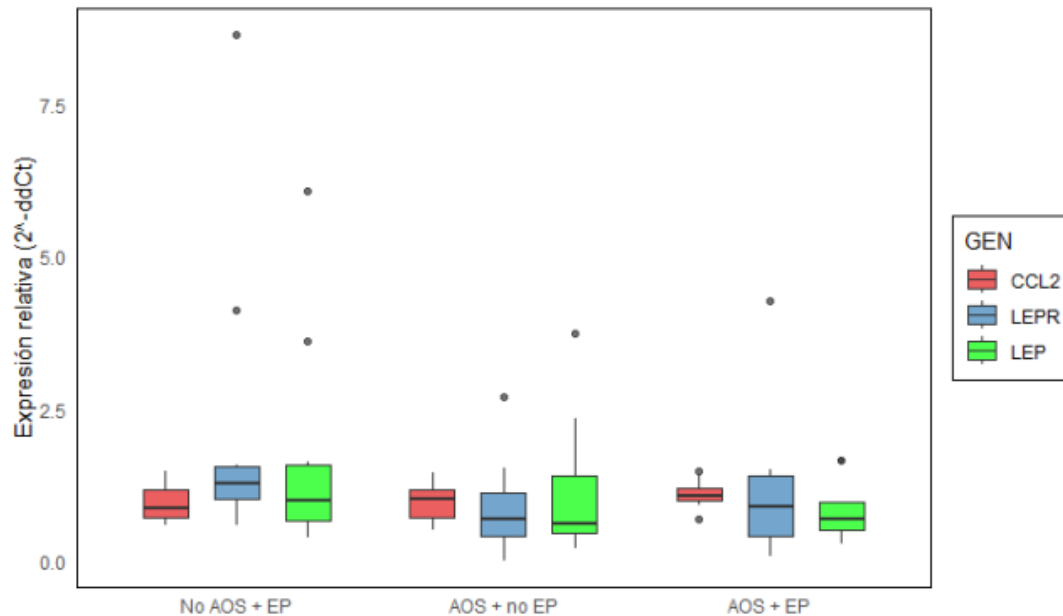


Gráfico 17: Expresión relativa del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR en cada Grupo.

La expresión parece similar para el ARNm CCL2 y ARNm LEP en los tres grupos. En el caso del ARNm LEPR, su expresión parece mayor en noAOS+EP que, en los otros dos grupos, los cuales son similares.

Dentro de cada grupo, estudiaremos la correlación entre los tres ARNm analizados:

En el grupo noAOS+EP no se observa ninguna correlación significativa entre ARNm. Existe una correlación moderada entre ARNm LEPR y ARNm LEP ($r=0,519$) estadísticamente no significativa debido al reducido tamaño muestral.

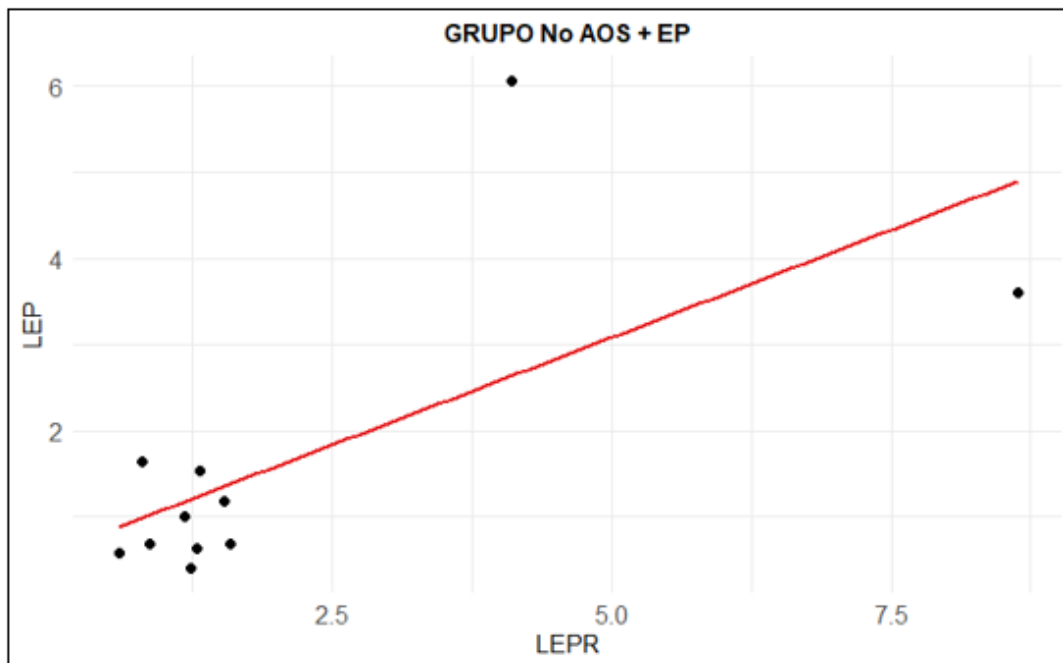


Gráfico 18: Correlación entre ARNm LEP y ARNm LEPR en noAOS+EP.

En el grupo AOS+noEP se observa una correlación negativa significativa y moderadamente fuerte entre el ARNm LEPR y ARNm LEP ($r=-0,623$; $p=0,023$). Una mayor expresión de uno de ellos se asocia a una menor expresión del otro, y viceversa.

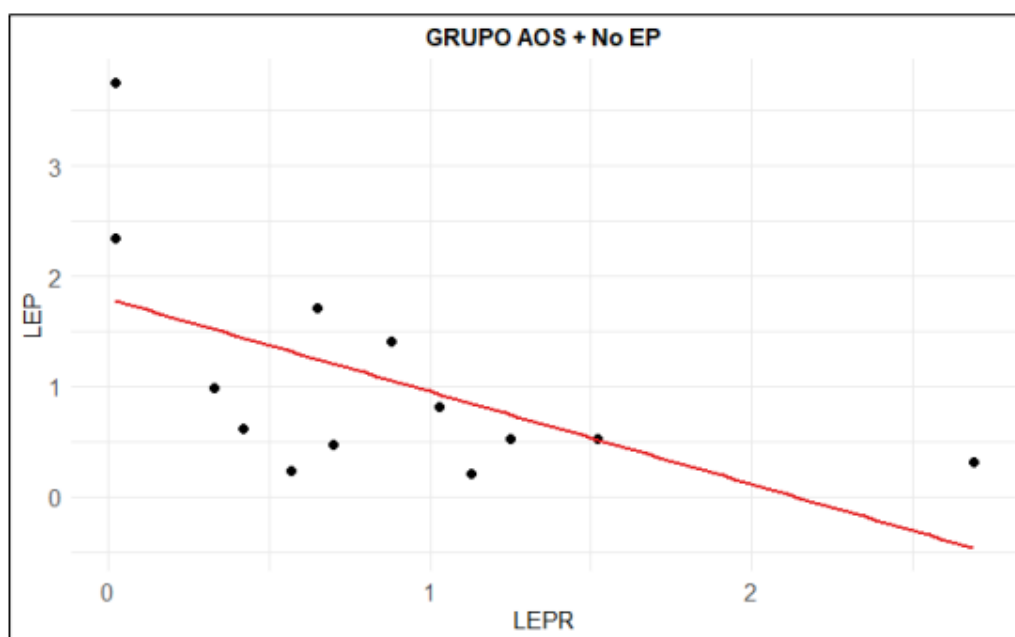


Gráfico 19: Correlación entre ARNm LEP y ARNm LEPR en AOS+noEP.

En el grupo AOS+EP se observa una correlación positiva significativa y moderadamente fuerte entre el ARNm LEPR y ARNm LEP ($r=0,587$; $p=0,045$). Una mayor expresión de uno de ellos se asocia a una mayor expresión del otro.

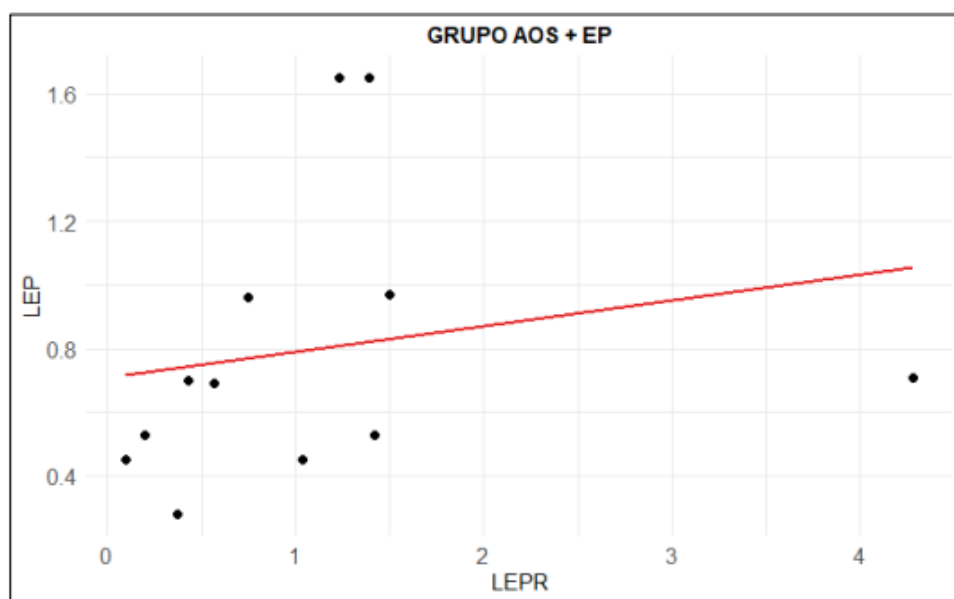


Gráfico 20: Correlación entre ARNm LEP y ARNm LEPR en AOS+EP.

Estudiamos las diferencias de expresión de los ARNm entre los diferentes grupos.

Existen diferencias globales relevantes en grupos para la expresión relativa del ARNm LEPR ($p=0,063$). Se estudian a continuación las comparaciones individuales entre grupos para cada ARNm, a fin de profundizar en posibles diferencias observables.

En la tabla 32 se pueden observar valores medios de expresión relativa de 0,97 en noAOS+EP, 0,99 en AOS+noEP y 1,12 en AOS+EP.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en cuanto a la expresión relativa del ARNm CCL2.

La diferencia global entre grupos observada con anterioridad para el ARNm LEPR proviene de la diferencia relevante entre los grupos noAOS+EP y AOS+noEP ($p=0,066$). Se pueden observar valores medios de expresión relativa de 2,11 en noAOS + EP frente a

0,86 en AOS+ noEP. Observamos valores medios de expresión relativa de 1,64 en noAOS+EP, 1,07 en AOS +noEP y 0,80 en AOS+EP.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en cuanto a la expresión relativa del ARNm LEP

9.8. Relación de la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con parámetros de interés en el grupo noAOS+EP.

En este apartado se estudia la correlación que existe entre la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio en el grupo noAOS+EP. A continuación, se muestra la significatividad de la correlación frente a los parámetros de cada uno de los ARNm:

Tabla 12.- Relación entre ARNm CL2 y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio para grupo noAOS+EP.

	r	p-valor
IMC	0,382	0,248
NLR	0,273	0,416
LMR	-0,392	0,233
PLR	-0,018	0,968
PCR	0,127	0,714
IL-6	-0,503	0,114
HDL	0,018	0,968
Fibrinógeno	0,045	0,903
Ratio PO/E	0,236	0,485
Estadio	0,169	0,620

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observaron correlaciones significativas entre la expresión del ARNm CCL2 y ninguno de los parámetros de estudio.

Tabla 13. Relación entre ARNm LEP y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio para grupo noAOS+EP.

	r	p-valor
IMC	-0,292	0,384
NLR	0,315	0,345
LMR	0,331	0,320
PLR	-0,064	0,852
PCR	-0,205	0,545
IL-6	-0,140	0,682
HDL	-0,005	0,989
Fibrinógeno	-0,396	0,228
Ratio PO/E	-0,182	0,592
Estadio	0,084	0,805

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observaron correlaciones significativas entre la expresión del ARNm LEP y ninguno de los parámetros de estudio.

Tabla 14. Relación entre ARNm LEPR y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E y el estadio para grupo noAOS+EP.

	r	p-valor
IMC	-0,645	0,037*
NLR	0,547	0,082
LMR	-0,173	0,611
PLR	-0,118	0,734
PCR	-0,418	0,203
IL-6	-0,215	0,525
HDL	0,073	0,839
Fibrinógeno	-0,191	0,576
Ratio PO/E	0,082	0,818
Estadio	-0,067	0,844

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

La expresión del ARNm LEPR tiene una correlación negativa significativa ($r=-0,645$; $p=0,037$) con el IMC. Mayor IMC se asocia a una reducción de la expresión de este ARNm. Por otro lado, existe una tendencia positiva entre la expresión de LEPR y NLR ($r=0,547$; $p=0,082$). Mayor NLR se asocia a mayor expresión del ARNm de LEPR.

Se muestra esta tendencia en el gráfico de dispersión entre cada par de variables:

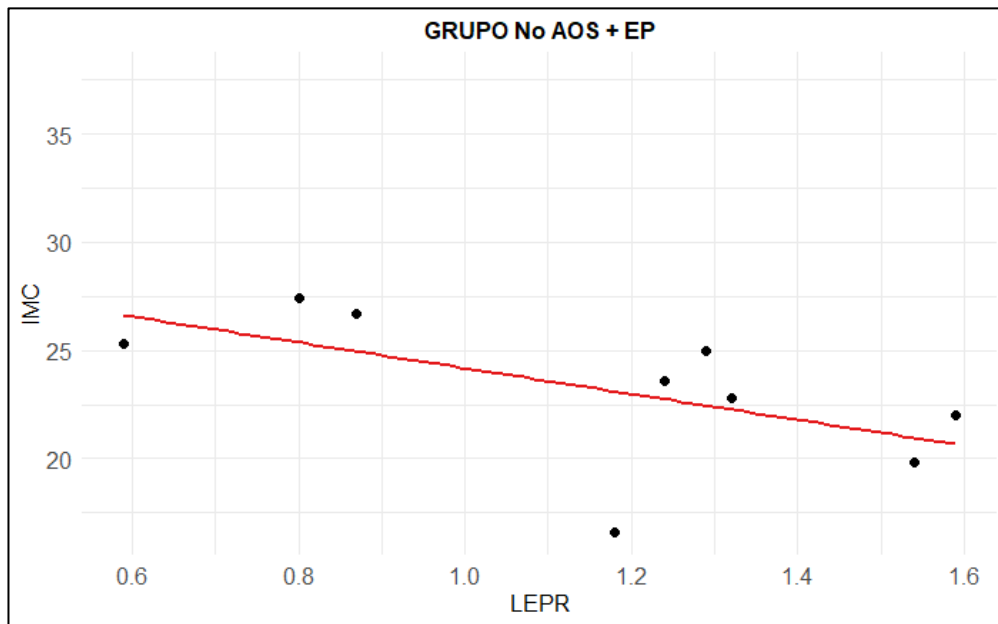


Gráfico 21: Correlación entre ARNm LEPR y el IMC en no AOS+EP.

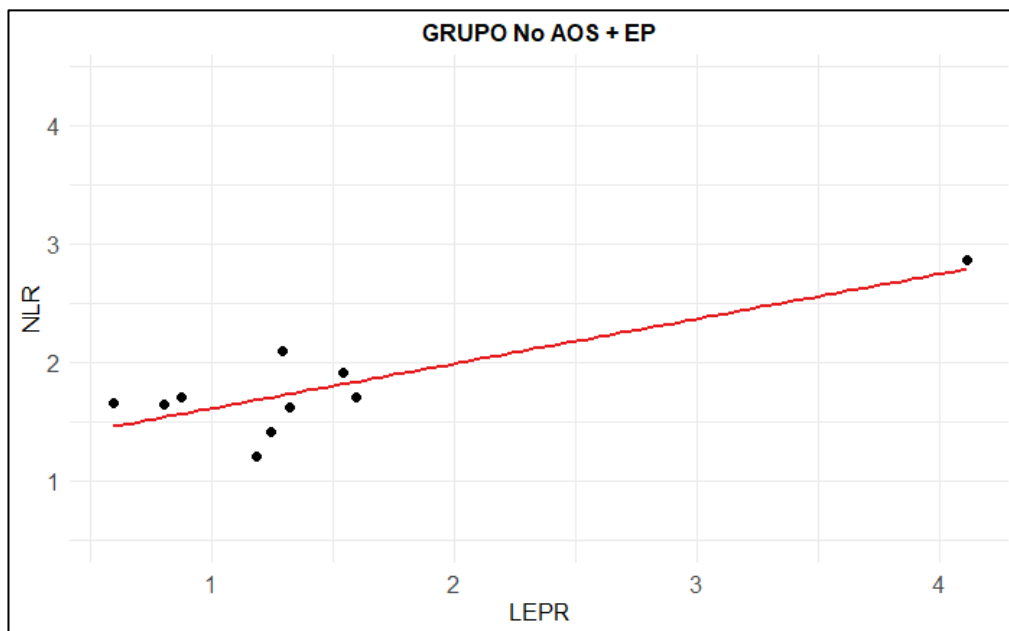


Gráfico 22: Correlación entre ARNm LEPR y la ratio NLR en no AOS+EP.

9.9. Relación de la expresión de los ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con parámetros de interés en el grupo AOS+EP.

En este apartado se estudia la correlación que existe entre la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E, el estadio, IAH y ODI en el grupo AOS+EP. A continuación, se muestra la significatividad de la correlación frente a los parámetros de cada uno de los ARNm:

Tabla 15. Relación entre ARNm CCL2 y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E, el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+EP.

	r	p-valor
IMC	-0,281	0,352
NLR	0,353	0,237
LMR	-0,232	0,446
PLR	0,388	0,190
PCR	-0,220	0,470
IL-6	-0,201	0,511
HDL	0,490	0,089
Fibrinógeno	-0,030	0,922
Ratio PO/E	0,284	0,371
Estadio	0,185	0,564
IAH	-0,473	0,102
ODI	-0,129	0,674

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Existe una tendencia positiva entre la expresión del ARNm CCL2 y el colesterol HDL (r=0,490; p=0,089). Esta tendencia se muestra en el siguiente gráfico de dispersión:

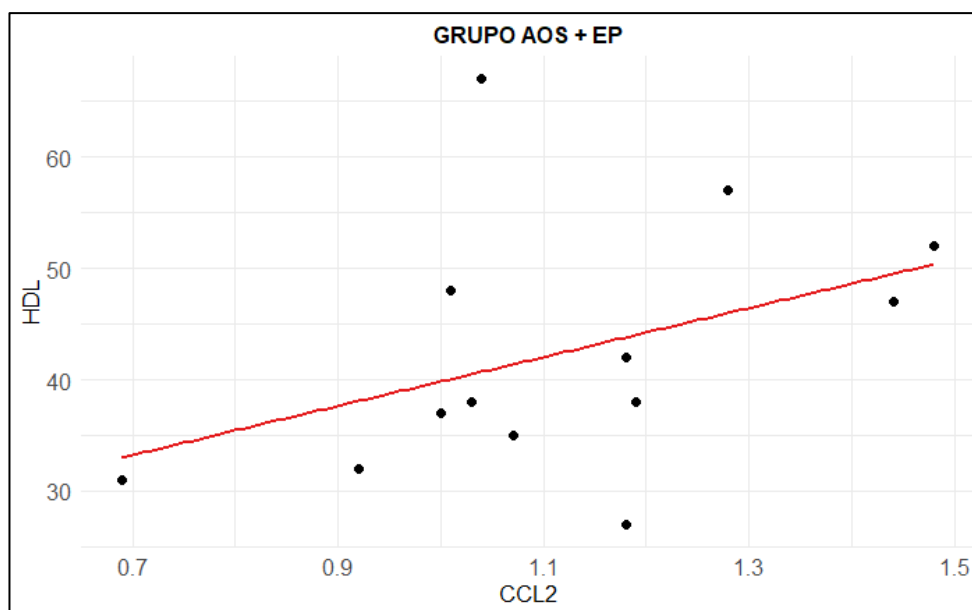


Gráfico23: Correlación entre ARNm CCL2 Y HDL en AOS+EP.

Tabla 16. Relación entre ARNm LEP y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E, el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+EP.

	r	p-valor
IMC	-0,298	0,348
NLR	0,764	0,004**
LMR	-0,295	0,353
PLR	0,348	0,268
PCR	-0,186	0,562
IL-6	-0,467	0,125
HDL	0,250	0,433
Fibrinógeno	0,218	0,495
Ratio PO/E	0,371	0,262
Estadio	0,222	0,512
IAH	0,021	0,948
ODI	0,190	0,555

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

La expresión del ARNm LEP tiene una alta correlación positiva significativa ($r=0,764$; $p=0,004$) con el NLR. Mayor NLR se asocia a un aumento de la expresión de este ARNm.

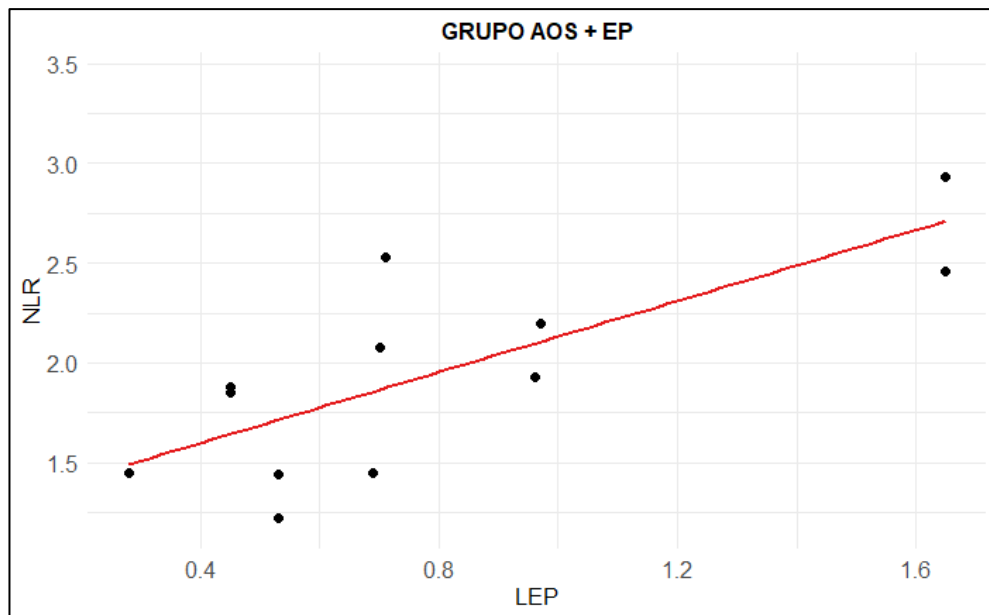


Gráfico 24: Correlación entre ARNm LEP Y la ratio NLR en AOS+EP.

Tabla 17. Relación entre ARNm LEPR y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, ratio PO/E, el estadio, IAH y ODI para grupo AOS+ EP.

	r	p-valor
IMC	-0,263	0,409
NLR	0,525	0,079
LMR	0,172	0,593
PLR	0,315	0,319
PCR	-0,154	0,635
IL-6	-0,441	0,154
HDL	-0,172	0,594
Fibrinógeno	0,291	0,359
Ratio PO/E	0,123	0,719
Estadio	0,118	0,730
IAH	0,007	0,991
ODI	0,147	0,651

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Hay una tendencia positiva entre la expresión del ARNm LEPR y NLR ($r=0,525$; $p=0,079$). Un incremento en NLR se asocia a un aumento en la expresión de dicho ARNm.

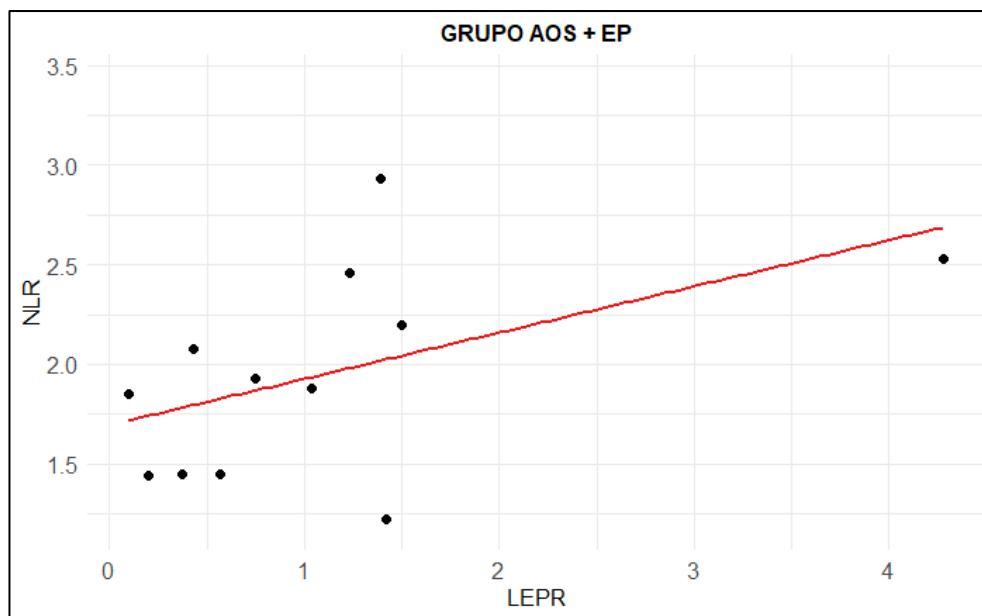


Gráfico 25: Correlación entre la expresión de ARNm LEPR y la ratio NLR en AOS+EP.

9.10. Relación de la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con parámetros de interés en el grupo AOS+noEP.

En este apartado se estudia la correlación que existe entre la expresión del ARNm CCL2, ARNm LEP y ARNm LEPR con los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, IAH y ODI en el grupo AOS+noEP. A continuación, se muestra la significatividad de la correlación frente a los parámetros de cada uno de los ARNm:

Tabla 18. Relación entre ARNm CCL2 y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, IAH y ODI para grupo AOS+no EP.

	r	p-valor
IMC	0,205	0,483
NLR	0,220	0,450
LMR	-0,174	0,552
PLR	0,235	0,418
PCR	0,153	0,601
IL-6	0,344	0,229
HDL	-0,340	0,234
Fibrinógeno	-0,115	0,697
IAH	0,367	0,196
ODI	0,268	0,353

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No se observaron correlaciones significativas entre la expresión del ARNm CCL2 y ninguno de los parámetros de estudio.

Tabla 19. Relación entre ARNm LEP y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, IAH y ODI para grupo AOS+no EP.

	r	p-valor
IMC	-0,302	0,316
NLR	-0,506	0,078
LMR	0,291	0,335
PLR	-0,113	0,714
PCR	0,129	0,673
IL-6	0,073	0,813
HDL	-0,119	0,699
Fibrinógeno	0,018	0,954
IAH	-0,338	0,258
ODI	-0,627	0,044

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Existe una tendencia negativa entre la expresión del ARNm LEP y NLR ($r=-0,506$; $p=0,078$). Mayor NLR se asocia a menor expresión génica. Esta tendencia se aprecia a continuación:

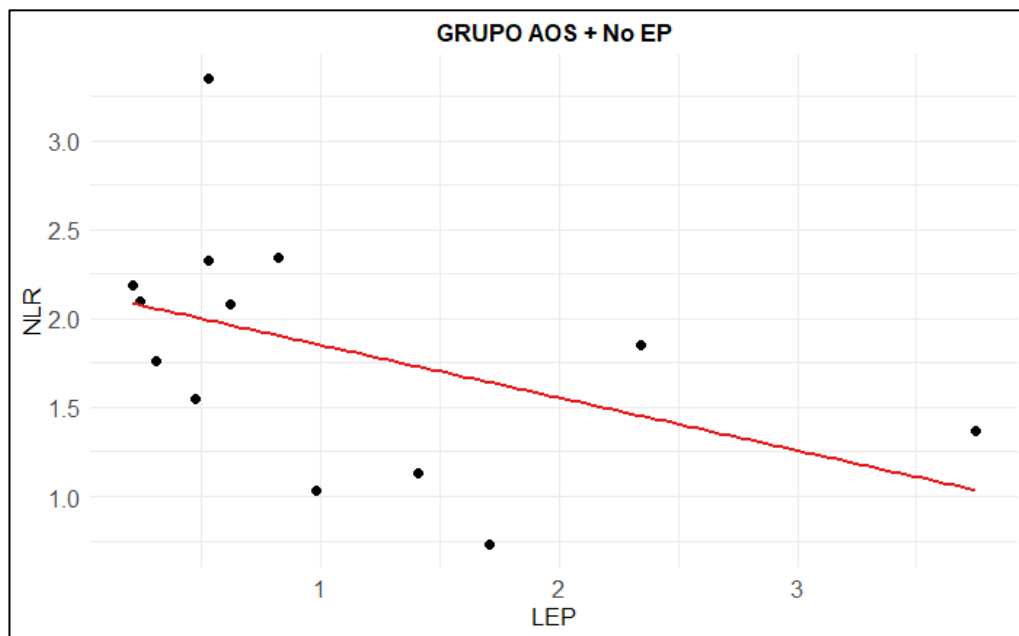


Gráfico 26: Correlación entre expresión de ARNm LEP y la ratio NLR en AOS+noEP.

Existe una correlación significativa y negativa entre la expresión del gen LEP y ODI ($r=-0,627$; $p=0,044$). Mayor ODI se asocia a menor expresión génica. Esta tendencia se aprecia a continuación:

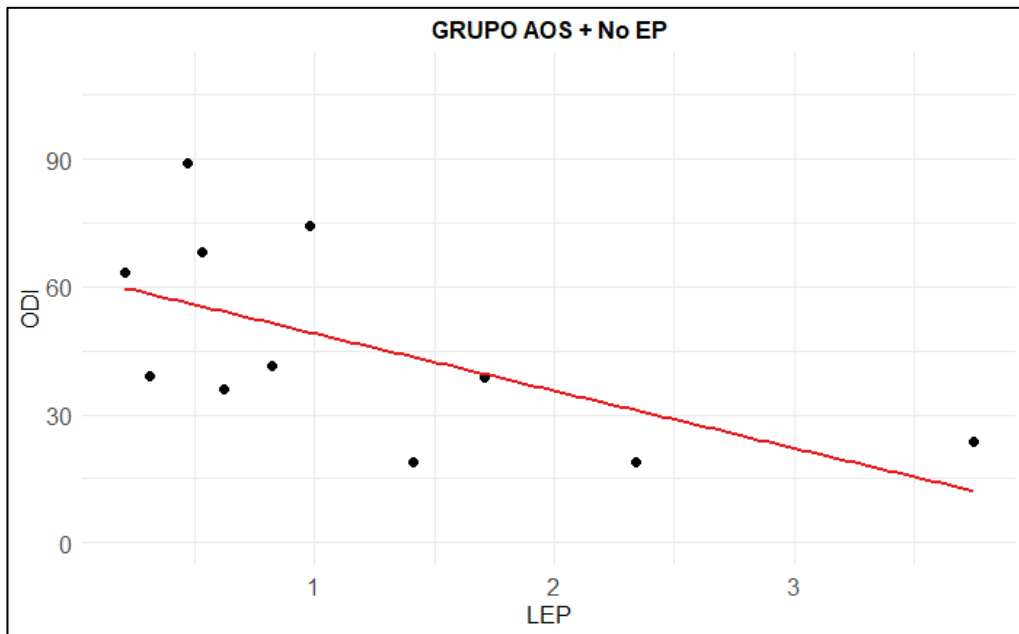


Gráfico 27: Correlación entre el ARNm Lep y ODI en AOS+no EP.

Tabla 20. Relación entre ARNm LEPR y los parámetros IMC, NLR, LMR, PLR, PCR, IL-6, HDL, fibrinógeno, IAH y ODI para grupo AOS+noEP.

	r	p-valor
IMC	0,587	0,035*
NLR	0,498	0,083
LMR	-0,358	0,230
PLR	-0,220	0,470
PCR	-0,110	0,720
IL-6	0,000	1,000
HDL	-0,062	0,840
Fibrinógeno	0,028	0,929
IAH	0,074	0,809
ODI	0,421	0,152

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Hay una correlación positiva significativa entre la expresión de LEPR e IMC ($r=0,587$; $p=0,035$). Por otro lado, existe una tendencia también positiva entre la expresión del ARNm y NLR ($r=0,498$; $p=0,083$). En ambos casos, un aumento del parámetro se asocia a un incremento en la expresión génica.

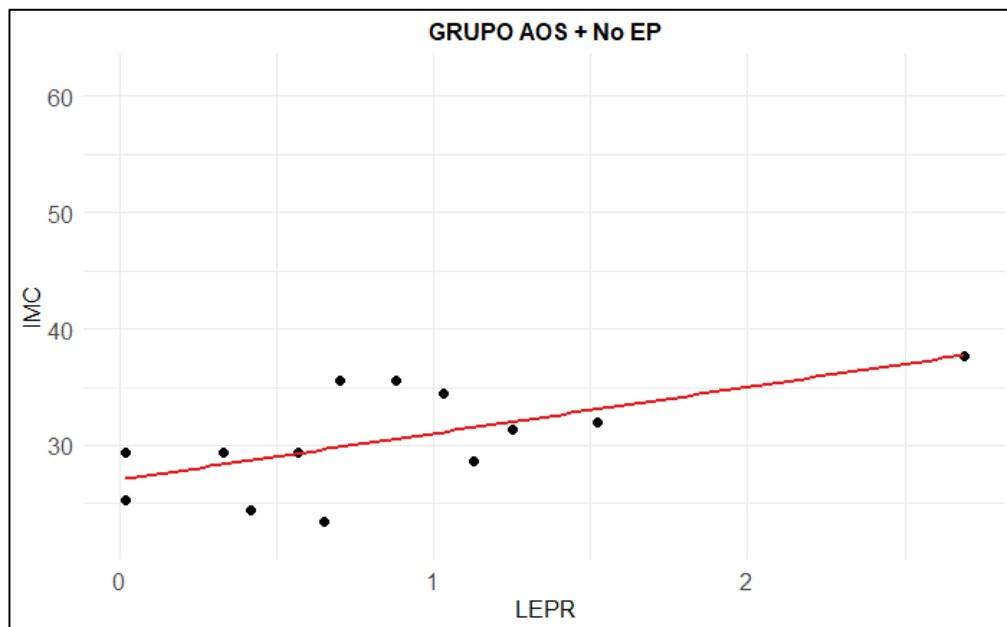


Gráfico 28: Correlación entre ARNm LEPR y el IMC en AOS+noEP.

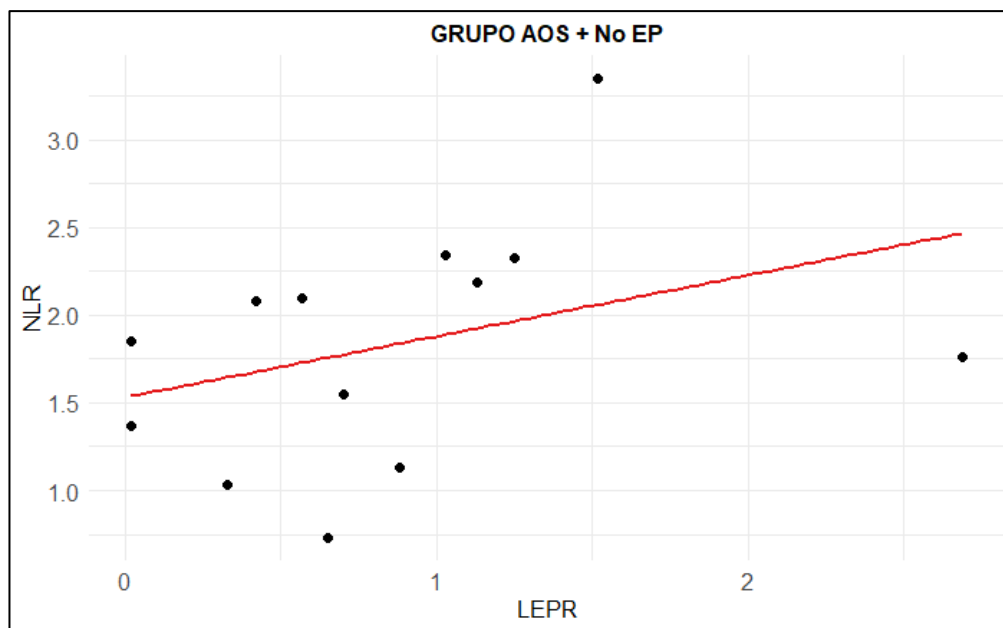


Gráfico 29: Correlación entre ARNm LEPR y la ratio NLR en AOS+noEP.

10. Discusión.

La enfermedad periodontal y la AOS son enfermedades crónicas, muy prevalentes y con importantes consecuencias en la salud pública.

La integración en nuestra práctica clínica de biomarcadores puede resultar muy útil tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para el seguimiento de éstas o incluso crear protocolos de tratamiento.

En el caso de la enfermedad periodontal, hasta la fecha, el diagnóstico se ha basado en la medición de los parámetros periodontales y de los niveles óseos radiográficos. Estos parámetros sólo revelan información de una degradación periodontal pasada y no de la actividad actual ni de su posible evolución.

En la sección IV de la clasificación de 1999, existe un apartado donde se reconoce que el desarrollo y evolución de la periodontitis podía depender de distintos desórdenes sistémicos, independientemente de la inflamación inducida por el propio biofilm (126).

Por otro lado, la evidencia científica ha puesto de manifiesto la importante relación entre la periodontitis y un mayor riesgo de patología cardíaca, teniendo a la inflamación sistémica como vehículo etiopatogénico principal (127).

Dentro de los aspectos biológicos de la AOS la activación de vías fisiopatológicas tales como la hiperactividad del sistema simpático, las vías inflamatorias sistémicas, el estrés oxidativo, las alteraciones de diferentes hormonas reguladoras del hambre y de los ejes hipotálamo-hipofisarios como la leptina, favorecerían la evolución de eventos adversos a largo plazo, relacionados fundamentalmente con enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (26).

En los últimos años se ha intentado la búsqueda, para ambas patologías, de biomarcadores que pudieran utilizarse tanto como elemento de despistaje de la enfermedad como marcadores de riesgo en la progresión de la patología sin grandes éxitos hasta el momento (128).

PCR ultrasensible.

De entre los diferentes marcadores, la proteína C reactiva ultrasensible ha destacado como posible indicador de riesgo cardiovascular, aunque sin suficiente evidencia como para recomendarlo de forma sistemática.

A la hora de interpretar los resultados siempre hay que tener en cuenta el posible efecto que juega la presencia de comorbilidades o de la obesidad, en los niveles aumentados de la PCR ultrasensible de estos pacientes en los que el índice de masa corporal (IMC) suelen ser elevados ya que la obesidad se considera un importante factor de riesgo (129). En los estudios publicados al respecto, existe una alta heterogeneidad en los resultados, ya que no se suele hacer una completa protección contra todos los factores de confusión conocidos para la PCR ultrasensible como son comorbilidades, tabaquismo, IMC, edad y sexo.

Estudios como el de Lie y cols. (130) no mostraban correlaciones significativas entre los niveles de PCR ultrasensible, la edad y el IMC. Por el contrario, el análisis de metarregresión de Nadeem y cols. (131) mostró los efectos significativos que la edad y el IMC producían en los niveles circulantes de PCR ultrasensible.

En el estudio de Van der Touw y cols. (132) donde sí se hizo un esfuerzo por excluir todos los posibles efectos adversos (IMC, edad, sexo), encontraron que la PCR ultrasensible estaba significativamente elevada en los participantes con AOS en relación con los controles emparejados por IMC, edad y sexo.

En nuestro estudio, sin embargo, no se encontraron diferencias notables en los niveles de PCR ultrasensible entre los tres grupos de estudio, aunque el grupo de pacientes con AOS y periodontitis parecía tener una tendencia de la PCR ultrasensible ligeramente más elevados que la del grupo de pacientes solo con enfermedad periodontal.

En nuestra investigación no tratamos de excluir ninguno de los factores de riesgo asociados con la AOS, intentando conseguir grupos homogéneos en cuanto a la gravedad. Respecto a la enfermedad periodontal, que se asocia con IMC aumentados (54) en nuestro trabajo esta relación no se daba porque al basarnos en la clasificación actual, no nos centramos solo en pacientes de mayor edad y mayor IMC que venían a corresponder con el criterio de periodontitis crónica del adulto tradicional.

En la mayoría de los estudios se ha considerado solamente a la periodontitis crónica sin tener en cuenta la clasificación actual de la enfermedad periodontal, sin hacer un gran

esfuerzo en que los casos en los que la destrucción ósea supera las expectativas en base a los depósitos de biofilm, tuvieran una representación. Suelen corresponder a un perfil de pacientes con buena higiene oral y gran pérdida ósea y en el que pesa más el componente hereditario. En nuestra investigación, este grupo viene a estar representado por pacientes de menor edad y con menor IMC.

Al buscar en nuestras tablas de análisis las variables antropométricas observamos que los valores medios del IMC del grupo de pacientes AOS+EP fue mayor que en los pacientes no AOS+EP.

La media de edad en nuestro grupo AOS+EP fue de 52.1 años y en nuestro grupo de pacientes solo periodontal, no AOS+EP, de 45.5 años. Pequeñas diferencias entre las medias de IMC y las medias de edad entre los grupos AOS+EP y no AOS+EP que, junto con la diferencia de tamaño muestral de nuestra investigación en comparación con los estudios mencionados, justificarían que entre nuestros resultados no se encontraron grandes diferencias en los niveles de PCR ultrasensible entre los tres grupos y que el grupo de pacientes con AOS y periodontitis tuviera unos valores medios de la PCR ultrasensible ligeramente más elevados que la del grupo de pacientes solo con enfermedad periodontal.

Resultados similares a los obtenidos por Martínez-Aguilar y cols. donde los niveles más elevados de PCR ultrasensible se asociaban con niveles elevados de IMC (130).

IL-6

Se ha argumentado que la hipoxemia intermitente y la fragmentación del sueño en la AOS pueden provocar un aumento de los niveles circulantes de marcadores inflamatorios como la PCR ultrasensible y la interleucina-6 (IL-6) (14).

En nuestra investigación observamos notables diferencias en los niveles de IL-6 en los tres grupos obteniendo los valores más altos el grupo AOS+EP seguido del grupo AOS+NO EP y el grupo no AOS+EP.

Las diferencias entre los grupos AOS+EP y AOS+NO EP no fueron significativas, lo cual estaría justificado porque no hubo diferencias relevantes en cuanto a la gravedad de la AOS en ambos grupos tomando como referencia los valores de IAH, SO₂ y ODI.

Estos datos sugieren que los niveles más elevados de la IL-6 vendrían a depender más de la AOS que de la presencia de enfermedad periodontal.

HDL

La relación entre el tejido óseo y el tejido adiposo ha sido una cuestión ampliamente debatida. Históricamente se le atribuía a la grasa un efecto protector frente a la pérdida de masa esquelética.

Estudios recientes manejan la hipótesis (basada en estudios preclínicos) de que el HDL reduce la DMO al reducir el número y la función de los osteoblastos (10,133).

La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria causada por bacterias periodontales, que eventualmente conduce a la destrucción del hueso alveolar, siendo los osteoclastos esenciales para la destrucción ósea. Pero, por otra parte, la pérdida ósea se produce cuando la resorción ósea por parte de los osteoclastos excede la formación de hueso por parte de los osteoblastos (134). En nuestro estudio valoramos cómo podrían influir los niveles de HDL en los niveles de pérdida ósea.

Aunque el objetivo de los resultados de los estudios referenciados (10,133,134) estaba más relacionado con el posible riesgo de fractura, partiendo del mismo principio, para nuestro estudio hipotetizamos qué posible efecto podría tener los niveles de HDL en los niveles de pérdida ósea de la enfermedad periodontal. A nivel descriptivo obtuvimos notables diferencias en los valores de HDL entre el grupo no AOS+EP y los otros dos grupos, AOS+ EP y AOS+ no EP que obtuvieron unos resultados de HDL bastante similares entre sí.

También encontramos diferencias significativas en los niveles de HDL entre el grupo no AOS+ EP y el grupo AOS+ no EP y se encontró una mayor correlación entre los niveles de HDL y los marcadores periodontales Ratio PO/E y pérdida en el grupo no AOS+ EP.

Es por ello por lo que como los niveles más elevados de HDL los encontramos en los grupos de pacientes en los que estaba presente la enfermedad periodontal y además se pudo observar una importante correlación entre los niveles de HDL y la pérdida ósea, por lo que podría plantearse la posibilidad de que pueda ser considerado como, biomarcador de la enfermedad periodontal.

FIBRINÓGENO

Con respecto al fibrinógeno a nivel descriptivo obtuvimos notables diferencias entre el grupo AOS+EP y los otros dos grupos de estudio que presentaban un comportamiento similar entre sí.

A nivel individual los valores más significativos los obtuvimos en el grupo no AOS+EP y el grupo AOS+EP.

Niveles elevados de la IL-6 hacen que el hígado aumente la síntesis de fibrinógeno encontrándose incrementado en infecciones crónicas como es el caso de la enfermedad periodontal (9).

Estos resultados reforzarían la hipótesis de que la enfermedad periodontal produce una elevación de los niveles de fibrinógeno plasmático, aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con periodontitis y pacientes AOS (9,55).

Hipótesis doblemente reforzada por el hecho de que obtuvimos una correlación positiva relevante entre el fibrinógeno y la ratio PO/E y entre el fibrinógeno y la pérdida ósea indicando que una ratio elevado PO/E y una elevada pérdida ósea se asociarían con valores altos de fibrinógeno y viceversa.

NLR, LMR Y PLR

La proporción de neutrófilos/linfocitos (NLR), de linfocitos /monocitos (LMR) y de plaquetas/leucocitos (PLR), biomarcadores de inflamación sistémica, han despertado gran interés en el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares y tumores malignos (62,63,64) y por ese motivo lo incluimos en el objeto de nuestro estudio.

Obtuvimos características muy similares entre los tres grupos, obteniendo resultados razonablemente homogéneos para los tres biomarcadores; NLR, LMR y PLR.

Al estudiar una posible relación entre estos biomarcadores e indicadores de gravedad de la AOS como el ODI no encontramos correlaciones significativas, por lo que en principio no parecen unos buenos biomarcadores para nuestra investigación tal y como habíamos hipotetizado.

Estudiamos la posible relación de dichos biomarcadores con las variables periodontales en los grupos no AOS+EP y AOS+EP.

En el grupo AOS+EP encontramos las concentraciones mayores de los valores de LMR en los pacientes que presentaban un diagnóstico de enfermedad periodontal grado A, seguido del grado B y menor concentración en los que presentaron un diagnóstico de periodontitis grado C.

El grado de la enfermedad periodontal describe la velocidad y riesgo de progresión correspondiendo el grado A un riesgo bajo, un paciente con mucho factor causal. El grado B riesgo moderado con factores causales y pérdida moderada y el grado C un riesgo alto, supone el perfil más difícil de tratar, poco agente causal y gran destrucción (1).

La utilidad de la ratio LMR como índice se ha observado en enfermedades inflamatorias en relación con episodios agudos (67) por lo que en nuestro estudio los niveles elevados de LMR se relacionaría con una actividad inflamatoria aguda, tal y como hemos mencionado anteriormente, un paciente con mucho factor causal.

Encontramos también una correlación positiva entre el NLR y los grados de mayor riesgo de progresión de la enfermedad periodontal.

Teniendo en cuenta que el grado de la enfermedad periodontal describe la velocidad y riesgo de progresión y que hay estudios que consideran a los neutrófilos como células protectoras del huésped a la enfermedad periodontal (2) y que la ratio NLR se utiliza para predecir el pronóstico de diversas enfermedades (68,69), nuestros resultados estarían dentro de lo esperado pudiendo considerar los niveles de NLR como un posible biomarcador con valor pronóstico de la enfermedad periodontal. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Almășan y cols. (62), que encontraron una relación entre la periodontitis y los valores de NLR Y LMR otorgándoles también un posible papel pronóstico.

Nuestro estudio tiene la peculiaridad de haber utilizado la clasificación de la enfermedad periodontal actual en estadios y grados y no como periodontitis crónica, lo que le otorga mayor relevancia clínica.

Aunque hay estudios que reportan que los pacientes con AOS de mayor gravedad presentarían los casos más severos de enfermedad periodontal influenciado por el IMC (54), en base a los resultados presentados, no es de extrañar que encontremos estadios y grados de la enfermedad periodontal razonablemente similares en los grupos no AOS+EP y AOS+EP.

A medida que avanzábamos el estudio tomamos consciencia de un aspecto que iba a influir inevitablemente en nuestros resultados como la llegada del SARS-CoV-2 a nuestras vidas. Si bien la mayoría de las personas se recuperan completamente de la COVID-19, el 45% de los supervivientes de la COVID podrían sufrir una variedad de síntomas no resueltos, que pueden persistir durante casi 4 meses después de la infección por SARS-CoV-2 (135).

La inflamación sistémica grave y el daño tisular en la COVID aguda son acelerados por citoquinas inflamatorias cuyos valores aumentados se asocian con la gravedad de la enfermedad y también están implicados en las secuelas prolongadas del COVID (aumento de IL-6, TNF- α , PCR, tráfico de leucocitos) (135).

En nuestro estudio, encontramos una serie de pacientes con marcadores inflamatorios algo elevados para su edad y comorbilidades, que nos hicieron sospechar que podrían tener secuelas, obviamente todos se habían contagiado de COVID. Estos pacientes fueron informados y se les hizo seguimiento. Éramos conscientes de que estos pacientes no debían ser considerados en nuestro trabajo o condicionarían los resultados por eso el valor de “n” está muy ajustado en alguno de los grupos de estudio, pero siempre cumpliendo el teorema central del límite.

Desde la llegada del SARS-CoV-2 a nuestras vidas, cualquier estudio sobre marcadores inflamatorios va a presentar un factor de confusión importante y que podría condicionar los resultados.

ARNm LEP, ARNm LEPR Y ARNm CCL2.

El uso de las herramientas de la biología molecular ha supuesto un apoyo diagnóstico importante en un amplio número de enfermedades infecciosas y de base genética y que cada día va a cobrar más protagonismo en la práctica médica.

Es por ello por lo que, en nuestro trabajo supuso un esfuerzo importante su inclusión, supliendo nuestras carencias con el apoyo de profesionales experimentados, presentando un trabajo colaborativo que tiene que definir nuestro día a día.

Continuando con la premisa de las características esperadas de un biomarcador, se tuvo en consideración las opciones que nos puede ofrecer la saliva, fácil de conseguir y sin ninguna intervención invasiva.

Si la pandemia nos presentó al SARS-CoV-2 también nos familiarizó con el término del ARNm.

Cuando se calculan los resultados de una qPCR puede utilizarse la cuantificación absoluta o la cuantificación relativa. En la cuantificación relativa, se analizan los cambios en la expresión génica en una muestra determinada en relación con otra muestra de referencia. El resultado final de este método se presenta como el cambio en la expresión del gen objetivo en una muestra en relación con una muestra de referencia, normalizada con respecto a un gen de referencia. Es la forma de cuantificación recomendada para este tipo de estudios por lo que decidimos seguir dicha recomendación (136).

En el estudio de Isler y cols. (15) plantearon la relación entre la expresión de ARNm y determinadas proteínas inflamatorias (adiponectina, leptina, visfatina, IL-6, TNF- α) en las muestras de tejido de granulación de pacientes afectados de periodontitis y perimplantitis encontrando una relación significativa entre la expresión del ARNm de dichos biomarcadores en pacientes afectados de periodontitis y perimplantitis.

El objetivo que nos planteamos en nuestra investigación fue parecido al del estudio de Isler y cols. (15) pero, buscándolo en una muestra de saliva, ya que para obtener una muestra de tejido el paciente se habría tenido que someter a una cirugía previa no cumpliendo con los criterios que nos planteamos en nuestro estudio.

Centramos el estudio en la expresión del ARNm de la leptina y del receptor de la leptina y el ARNm de la CCL2 ya que el papel pleiotrópico de la leptina está respaldado por la distribución universal de su receptor y que el aumento de la leptina se asocia con un aumento de expresión de la CCL2 (102,137). Sin olvidar la relación de estos biomarcadores con la enfermedad periodontal y la AOS (7,12,15,16,17,18,20).

Es por ello por lo que se estudió la correlación entre el ARNm de la leptina, ARNm receptor de la leptina y ARNm de la CCL en los distintos grupos de estudio y entre el resto de los marcadores inflamatorios en sangre y los parámetros de diagnóstico periodontal y de la AOS.

Al estudiar la correlación entre el ARNm de la leptina, ARNm del LEPR y el ARNm de CCL2 dentro de cada grupo encontramos que en el grupo de pacientes no AOS+EP y AOS+EP a medida que aumentaba la expresión del ARNm de la leptina aumentaba también la de su receptor, ARNm LEPR.

En el grupo de pacientes AOS+no EP, esta asociación también se da, pero se trata de una correlación negativa.

El nexo en común de los dos grupos de estudio donde la relación es positiva parece ser la presencia de la enfermedad periodontal. En la cavidad oral hay una expresión de la leptina y de su receptor en tejido gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar. Además, existe una correlación entre el grado de inflamación y la expresión de la leptina y su receptor de hasta el 50% con respecto al tejido sano (113) lo que vendría a explicar el papel de la periodontitis en la correlación positiva entre ARNm de la leptina y el ARNm de su receptor en los dos grupos donde la enfermedad periodontal estaba presente.

Por otro lado, se ha postulado que en el paciente con AOS, los niveles elevados de leptina tendrían como objetivo estimular los centros respiratorios y un déficit de leptina podría ser clave para el desarrollo de un síndrome de hipoventilación (138). Esto guardaría relación con los resultados obtenidos en el grupo de pacientes AOS+noEP, donde menor expresión de ARNm Lep se asociaba con un ODI mayor. Teniendo en cuenta que la AOS se relaciona con un IMC elevado, el déficit de leptina en estos pacientes resulta algo excepcional. En las personas delgadas la leptina se encuentra predominantemente unida a proteínas, mientras que en las personas obesas aumenta la presencia de leptina en forma libre.

Se ha postulado que en estos pacientes podría existir una especie de resistencia a la leptina (138). Esta resistencia podría deberse a una saturación del sistema de transporte (139). Esta circunstancia vendría a explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio. Cualquier posible mutación se traduciría en un receptor de la leptina incompleto incapaz de desarrollar las señales intracelulares correspondientes. De las 5 isoformas distintas del receptor, únicamente la variante de dominio intracelular más largo se considera como un receptor funcional mientras que, los de cadena más corta, se comportarían como receptores solubles (140). Por tanto, en el paciente AOS el problema puede estar relacionado por un déficit del receptor de la leptina o cualquier interferencia en la unión a los receptores hipotalámicos (101,141).

La leptina ejerce su acción fisiológica a través de su receptor. La isoforma larga del receptor (ObRb) es la que presenta la máxima capacidad de señalización. La forma larga se expresa fundamentalmente en el sistema inmune. El papel de la leptina en la inmunidad mediada por células se ha obtenido trabajando en ratones deficientes en receptor de la leptina. La activación de los linfocitos induciría la expresión de la isoforma

larga del receptor de la leptina y valores elevados de receptor han sido detectados en macrófagos y linfocitos (137, 142).

Por otro lado, la correlación positiva y la correlación negativa en un grupo de genes puede tener diferentes explicaciones. Pueden tener una regulación transcripcional compartida, mecanismos de retroalimentación positiva o negativa o interacción con proteínas. Si una proteína activa la vía de señalización de un gen, la expresión del otro puede verse afectada (143, 144).

En base a esta premisa nuestros resultados cobrarían sentido, ya que en el grupo AOS+EP encontramos los valores más elevados de IL-6 y NLR, sin olvidar que también presentaba los valores más elevados del IMC.

Cuando se hizo la correlación del ARNm LEP y ARNm LEPR con los distintos biomarcadores hematológicos, encontramos una tendencia positiva entre la expresión del ARNm del LEP y entre la expresión del ARNm LEPR y los valores de NLR.

Teniendo en cuenta que el grupo AOS+EP presentaba unos valores medios de NLR superiores que en el grupo AOS +noEP podría explicar por qué en el grupo AOS+EP la correlación entre el ARNm LEP y ARNm LEPR era positiva, mientras que en el grupo AOS+no EP fue negativa.

Poco hemos hablado del ARNm de la CCL2. El único parámetro con el que presentó una relación significativa fue con los niveles de HDL en el grupo AOS+ EP.

Si tenemos en presente que la CCL2 está implicada en los procesos de arterioesclerosis, donde la captación de lipoproteínas induciría un estrés celular con necrosis y donde la acumulación sucesiva de células apoptóticas, restos celulares y cristales de colesterol formarían el corazón de la placa de ateroma y está ampliamente estudiada la relación de la AOS y la enfermedad periodontal con el riesgo cardiovascular (145) los resultados obtenidos cumplirían dichas premisas dada la correlación encontrada entre los niveles de HDL y la expresión del ARNm de la CCL2.

En la literatura aparecen múltiples estudios para encontrar posibles biomarcadores tanto para la enfermedad periodontal como para la AOS. La razón por la que la saliva ha sido propuesta como un excelente medio de investigación para biomarcadores de ARNm mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa es que nos brinda la oportunidad de realizar pruebas no invasivas.

Gracias a las técnicas generadas a partir de la biología molecular se ha podido avanzar rápidamente en el campo de la medicina, tanto en alternativas a tratamientos como

soluciones y todavía queda un mundo por descubrir. Este estudio solo es una muestra muy pequeña, pero hay un amplio abanico de estudios sobre ARNm, así como el papel emergente del micro ARN.

En nuestra investigación nos planteamos como reto el estudio de un extenso número de posibles biomarcadores. Si tuviéramos que ampliar nuestro estudio, hoy, es más que probable que centráramos nuestro esfuerzo en el receptor de la leptina. No tanto en la cuantificación de la expresión de su ARNm sino en el estudio de posibles mutaciones y el tipo de receptor predominante.

11. Conclusiones.

1. En los pacientes AOS con periodontitis estaban aumentados los marcadores inflamatorios como IL-6, PCR ultrasensible y el fibrinógeno.
2. Así mismo, en pacientes AOS con periodontitis la relación neutrófilos/linfocitos estaba aumentada.
3. En los pacientes periodontales los niveles altos de NLR y LMR se relacionó con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad periodontal.
4. La fracción de colesterol HDL se encontraba con mayores incrementos cuando la enfermedad periodontal estaba presente. El nivel de HDL se asociaba positivamente con marcadores periodontales como la pérdida del nivel óseo y la ratio PO/E.
5. Se encontró una correlación entre el ARNm LEPR y ARNm LEP en los tres grupos. La presencia de la enfermedad periodontal podría potenciar la expresión de estos genes en los pacientes afectados de AOS.
6. Se encontró una relación negativa entre los niveles de ARN leptina y el índice de desaturación de oxígeno (ODI) en los pacientes AOS, teniendo en cuenta que los niveles elevados de leptina tendrían como objetivo estimular los centros respiratorios, su déficit sería clave para el desarrollo de un síndrome de hipoventilación.

12. Bibliografía.

1. Sanz M, Tonetti M. Periodontitis. Periodoncia clínica.2019:18-24.
2. Hajishengallis G. Immunomicrobialpathogenesis of periodontitis:keystones, pathobionts, and host response. TrendsImmunol.2014 Jan; 35(1):3-11.
3. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol Oral Microbiol. 2012; 27:409-419.
4. Jepsen S, Blanco J, Buchalla W, Carvalho JC, Dietrich T, Dörfer C, et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseaes. J Clin Periodontol. 2017; 44(Suppl 18): S85-S93.
5. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. Lancet Respir Med. 2015; 3(4): 310-8.
6. Kim, S. R., Son, M., & Kim, Y. R. Risk of chronic periodontitis in patients with obstructive sleep apnea: a nationwide retrospective cohort study. Epidemiology and Health, e2023032.
- 7.Sanchez-Cuéllar S, Ancochea Bermúdez J.The use of biomarkers of inflammation in the airway in the management of asthma. Revista de patología respiratoria. 2012;15(4),129-135.
8. Cecoro, G.; Annunziata, M.; Iuorio, M.T.; Nastri, L.; Guida, L. Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review. Medicina. 2020; 56, 272.
9. Milla-Torres, Daniela; Garcia-Linares, S. Evaluation of plasmatic fibrinogen in patients with periodontal disease. Rev. Estomatol Herediana. 2014; vol. 24, no 4.

10. Hussain, S. M., Ebeling, P. R., Barker, A. L., Beilin, L. J., Tonkin, A. M., & McNeil, J. J. Association of Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Level with Risk of Fractures in Healthy Older Adults.2023. JAMA cardiology.
- 11.Gerónimo, J. J. F., Urioste, C. G., Torres, C. G., & Medina, O. N. Regulación de la inmunidad por la leptina. Revista de Educación Bioquímica.2012; 31(3), 92.
12. Gangadhar, V., Ramesh, A., & Thomas, B. Correlation between leptin and the health of the gingiva: a predictor of medical risk. Indian Journal of Dental Research.2011; 22(4), 537.
13. Su, Y., Wang, D., Xuan, D., Ni, J., Luo, S., Xie, B., & Zhang, J. Erratum:“Periodontitis as a Novel Contributor of Adipose Tissue Inflammation Promotes Insulin Resistance in a Rat Model”. Journal of Periodontology.2014; 85(6), 876-876.
14. Bergeron C, Kimoff J, Hamid Q. Obstructive sleep apnea syndrome and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2005; 116(6): 1393-6.
15. Isler SC, Soysal F, Ozcan E, Saygun NI, Unsal FB, Baris E, Ilikci R. Evaluation of adipokines and inflammatory mediator expression levels in patients with periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. Clin Oral Investig. 2021;25(6):3555-3565.
- 16.Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Graetz C,Dórfer CE, Wilftang J, Hásler R. Peri-implantitis versus periodontitis: functional differences indicated by transcriptome profiling. Clin. Implant Dent Relat Res.2014; 16:401-411.
- 17.Shen, Z., Kuang, S., Zhang, M., Huang, X., Chen, J., Guan, M., ... & Lin, Z. Inhibition of CCL2 by bindarit alleviates diabetes-associated periodontitis by suppressing inflammatory monocyte infiltration and altering macrophage properties. Cellular & Molecular Immunology.2021; 18(9), 2224-2235.
- 18.Cortez, A., & Muxfeldt, E. Monocyte chemoattractant protein-1 and hypertension: an overview. Hipertensión y Riesgo Vascular.2022; 39(1), 14-23.

19. Teixeira MK, Lira-Junior R, Lourenco EJV et al. The modulation of the TREM-1/PGLYRP1/MMP-8 axis in peri-implant diseases. *Clin Oral Investig.* 2020;24:1837-1844.
20. Santonocito, S., Polizzi, A., Palazzo, G., & Isola, G. The emerging role of microRNA in periodontitis: pathophysiology, clinical potential and future molecular perspectives. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021,22(11),5456.
21. Bravo, Pérez M, Almerich Silla JM, Ausina Márquez V, Avilés Gutiérrez P, Blanco González JM, Canorea Díaz E, et al. Encuesta de salud oral en España 2015. *RCOE.* 2016; 21: 8 – 48.
22. Darveau RP, et al. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res.* 2012; 91:816–820.
23. Hajishengallis G, Lambris JD. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:187–200.
24. Moutsopoulos NM, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun.* 2012; 39:294–303.
25. Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.* 1991; 62(5): 293–9.
26. Mediano O, González Mangado N, Montserrat JM, Alonso-Álvarez ML, Almendros I, Alonso-Fernández A, Barbé F, Borsini E, Caballero-Eraso C, Cano-Pumarega I, de Carlos Villafranca F, Carmona-Bernal C, Carrillo Alduenda JL, Chiner E, Cordero Guevara JA, de Manuel L, Durán-Cantolla J, Farré R, Franceschini C, Gaig C, Garcia Ramos P, García-Río F, Garmendia O, Gómez García T, González Pondal S, Hoyo Rodrigo MB, Lecube A, Madrid JA, Maniegas Lozano L, Martínez Carrasco JL, Masa JF, Masdeu Margalef MJ, Mayos Pérez M, Mirabet Lis E, Monasterio C, Navarro Soriano N, Olea de la Fuente E, Plaza G, Puertas Cuesta FJ, Rabec C, Resano P, Rigau D, Roncero A, Ruiz C, Salord N, Saltijeral A, Sampol Rubio G, Sánchez Quiroga MÁ, Sans Capdevila Ó, Teixeira C, Tinahones Madueño F, Maria Togeiro S, Troncoso Acevedo

MF, Vargas Ramírez LK, Winck J, Zabala Urionaguena N, Egea C; el Spanish Sleep Network. International Consensus Document on Obstructive Sleep Apnea. Arch Bronconeumol. 2022 ;58(1):52-68.

27. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Bradr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. N Engl J Med. 1993;328(17):1230-1235.

28. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, HLA KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. Am J Epidemiol. 2013;177(9):1006-1014.

29. Benjafield, A. v, Ayas, N. T., Eastwood, P. R., Heinzer, R., Ip, M. S. M., Morrell, M. J., Nunez, C. M., Patel, S. R., Penzel, T., Pépin, J.-L., Peppard, P. E., Sinha, S., Tufik, S., Valentine, K., & Malhotra, A. (2019). Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. The Lancet Respiratory Medicine, 7(8), 687–698.

30. Sateia MJ. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. Chest. 2014;146(5):1387-1394.

31. Álvarez-Sala Walter, J., García Mochón, L., & González Núñez, J. Evaluación sanitaria y socioeconómica del síndrome de apneas e hipopneas del sueño (SAHS) en España, 2020. Madrid: Alberto Alcocer.

32. Kushida CA, Littner MR, Morgenthaler T. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. Sleep.2005;28(4):499-521.

33. Iber C, Redline S, Kaplan Gilpin AM, Polysomnography performed in the unattended home versus the attended laboratory setting- Sleep Heart Health Study methodology. Sleep.2004;27(3):536-40.

34. Lin CM, Davidson TM, Ancoli-Israeli S. Gender differences in Obstructive Sleep Apnea and treatment implications. Sleep Med Rev. 2008;12(6):481-496.

35. Myers KA, Mrkobrada M, Simel DL. Does this patient have obstructive sleep apnea? The Rational Clinical Examination systematic review. *JAMA*. 2013;310(7):731-741.
36. Roure, N., Gomez, S., Mediano, O., Duran, J., de la Peña, M., Capote, F., ... & Barbé, F. Daytime sleepiness and polysomnography in obstructive sleep apnea patients. *Sleep medicine*, 2008; 9(7), 727-731.
37. Gómez G., Matías, Deck G., Bárbara, Santelices B., Pilar, Cavada Ch., Gabriel, Volpi A., Claudio, & Serra M., Leonardo. Transcultural adaptation and validation of the Epworth sleepiness scale in the Chilean population. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 2020; 80(4), 434-441.
38. Moreno, G. Manuel. Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2012; 23(2): p. 124-128.
39. Young, Terry; PEPPARD, Paul E.; TAHERI, Shahrada. Excess weight and sleep-disordered breathing. *Journal of applied physiology*, 2005; 99(4): 1592-1599.
40. Kawaguchi, Yuji, et al. Different impacts of neck circumference and visceral obesity on the severity of obstructive sleep apnea syndrome. *Obesity*, 2011;19(2): 276-282.
41. Adult Obstructive Sleep Apnea Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. Clinical guideline for the evaluation, management, and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *Journal of clinical sleep medicine*. 2009; 5(3):263-276.
42. American Academy of Sleep Medicine Task Force. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep*. 1999;22(5):667-689.
43. Sunnergren O, Broström A, Svanborg E. Positional sensitivity as a confounder in diagnosis of severity of obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. 2013;17(1):173-9.

44. Fleetham, J., et al. CTS Sleep Disordered Breathing Committee: Canadian Thoracic Society guidelines: diagnosis and treatment of sleep disordered breathing in adults. *Can Respir J*. 2006; 13(7): 387-392.
45. Oksenberg, A; Gadoth, N. Are we missing a simple treatment for most adult sleep apnea patients? The avoidance of the supine sleep position. *Journal of sleep research*.2014; 23(2):204-210.
46. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García MÁ, Marín JM, Ferrer A, Corral J, Masa JF, Parra O, Alonso-Álvarez ML, Terán-Santos J. Diagnosis, and treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(3):143-56.
47. Gunaratnam K, Taylor B, Curtis B, Cistulli P Obstructive sleep apnoea and periodontitis: a novel association? *Sleep Breath*. 2009;13(3):233–239.
48. Sanders, A. E., Essick, G. K., Beck, J. D., Cai, J., Beaver, S., Finlayson, T. L., Zee, P. C., Lored, J. S., Ramos, A. R., Singer, R. H., Jimenez, M. C., Barnhart, J. M., & Redline, S. Periodontitis and Sleep Disordered Breathing in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Sleep*.2015; 38(8), 1195–1203.
49. Kim SR, Son M, Kim YR. Risk of chronic periodontitis in patients with obstructive sleep apnea in Korea: a nationwide retrospective cohort study. *Epidemiol Health*.2023.45: e2023032.
50. Nibali L, Donos N. Periodontitis and redox status: a review. *Curr Pharm Des*. 2013;19(15):2687-97.
51. Entzian P, Linnemann K, Schlaak M, Zabel P. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(3):1080-6.

52. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO et al. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.*1997; 82:1313–1316
53. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med.*2002; 165:934–939.
54. Pico-Orozco J, Silvestre FJ, Carrasco-Llatas M, Silvestre-Rangil J. Influence of body mass index and obesity upon the association between periodontitis and sleep apnea-hypopnea syndrome. *Clin Oral Investig.* 2021 ;25(6):3929-3935.
55. Li, X., & He, J. The Association Between Serum/Plasma Leptin Levels and Obstructive Sleep Apnea Syndrome: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Frontiers in endocrinology.*2021; 12, 696418.
56. González-Pliego, J. A., Hernández-Gordillo, D., Castañeda-Barragán, E., García-Lamas, L., & Guzmán-Sánchez, C. M. Obstructive sleep apnea syndrome and ischemic heart disease: Evidence of their relationship. *Archivos de cardiologia de Mexico.*2015; 85(1), 16-22.
57. Arcari, A.; Zito, F.; Di Castelnuovo, A.; De Curtis, A.; Dirckx, C.; Arnout, J.; Cappuccio, F.P.; van Dongen, M.C.; De Lorgeril, M.; Krogh, V.; et al. C reactive protein and its determinants in healthy men and women from European regions at different risk of coronary disease: The IMMIDIET Project. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6, 436–443.
58. Bonaccio, M.; Di Castelnuovo, A.; De Curtis, A.; Costanzo, S.; Persichillo, M.; Donati, M.B.; Cerletti, C.; Iacoviello, L.; de Gaetano, G.; Moli-sani Project Investigators. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower platelet and leukocyte counts Results from the Moli-sani study. *Blood* 2014, 123, 3037–3044.
59. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews immunology.*2015; 15(1), 30-44.

60. Boyapati R, Chintalapani S, Ramiseti A, Salavathi SS, Ramachandran R. Evaluation of Serum Leptin and Adiponectin in Obese Individuals with Chronic Periodontitis. *Contemp Clin Dent*. 2018; 9(2): 210-214.
61. Stefaniuk, P., Szymczyk, A., & Podhorecka, M. The Neutrophil to lymphocyte and lymphocyte to monocyte ratios as new prognostic factors in hematological malignancies—a narrative review. *Cancer management and research*.2020; 12, 2961.
62. Alășan, O., Leucuța, D. C., & Hedeșiu, M. Blood Cell Count Inflammatory Markers as Prognostic Indicators of Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of personalized medicine*.2022; 12(6), 992.
63. Kweider, M., Lowe, G. D. O., Murray, G. D., Kinane, D. F., & McGowan, D. A. Dental disease, fibrinogen and white cell count; links with myocardial infarction? *Scottish medical journal*.1993;38(3), 73-74.
64. Larmann, J., Handke, J., Scholz, A. S., Dehne, S., Arens, C., Gillmann, H. J., ... & Janssen, H. Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio are associated with major adverse cardiovascular and cerebrovascular events in coronary heart disease patients undergoing non-cardiac surgery. *BMC Cardiovascular Disorders*.2020;20(1), 1-9.
65. Shi, D., Meng, H., Xu, L., Zhang, L., Chen, Z., Feng, X., ... & Ren, X. Systemic inflammation markers in patients with aggressive periodontitis: a pilot study. *Journal of periodontology*.2008; 79(12), 2340-2346.
66. Papapanagiotou, D., Nicu, E. A., Bizzarro, S., Gerdes, V. E., Meijers, J. C., Nieuwland, R., ... & Loos, B. G. Periodontitis is associated with platelet activation. *Atherosclerosis*.2009; 202(2), 605-611.
67. Botelho, J., Machado, V., Hussain, S. B., Zehra, S. A., Proença, L., Orlandi, M., ... & D'Aiuto, F. Periodontitis and circulating blood cell profiles: a systematic review and meta-analysis. *Experimental Hematology*.2021; 93, 1-13.

68. Han, S. I., Cha, K. C., Roh, Y. I., Hwang, S. O., Jung, W. J., & Kim, T. Y. Association between novel marker (platelet-lymphocyte ratio, neutrophil-lymphocyte ratio, and delta neutrophil index) and outcomes in sudden cardiac arrest patients. *Emergency Medicine International*. 2021.
69. Ramos-Peñafiel, C. O., Santos-González, B., Flores-López, E. N., Galván-Flores, F., Hernández-Vázquez, L., Santoyo-Sánchez, A., ... & Martínez-Tovar, A. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte, monocyte-to-lymphocyte and lymphocyte-to-platelet ratios for the prognosis of COVID-19-associated complications. *Gaceta médica de México*.2020; 156(5), 413-419.
70. Almubarak A, Tanagala KKK, Papapanou PN, Lalla E, Momen-Heravi F. Disruption of Monocyte and Macrophage Homeostasis in Periodontitis. *Front Immunol*. 2020 Feb 26; 11:330.
71. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003; 19:71–82. 10.1016/s1074-7613(03)00174-2
72. Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, Kiji M, Oda S, Izumi Y. Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2004; 39:72–8.
73. El Sayed S, Patik I, Redhu NS, Glickman JN, Karagiannis K, El Naenaey ESY, Elmowalid GA, Abd El Wahab AM, Snapper SB, Horwitz BH. CCR2 promotes monocyte recruitment and intestinal inflammation in mice lacking the interleukin-10 receptor. *Sci Rep*. 2022; 10;12(1):452.
74. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2015; 35:1306–16. 10.1161.

75. Acharya, A. B., Shetty, I. P., Jain, S., Padakannaya, I., Acharya, S., Shettar, L., & Thakur, S. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in chronic periodontitis before and after nonsurgical therapy. *Journal of Indian Society of Periodontology*.2019; 23(5), 419.
76. Takeda, S., & Karsenty, G. Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. *Bone*. 2008;42(5), 837-840.
77. Usui, M., Onizuka, S., Sato, T., Kokabu, S., Ariyoshi, W., & Nakashima, K. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis—Periodontal bacteria and inflammation. *Japanese Dental Science Review*.2021; 57, 201-208.
78. Barzilay, J. I., Buzkova, P., Kuller, L. H., Cauley, J. A., Fink, H. A., Sheets, K., ... & Mukamal, K. J. The Association of Lipids and Lipoproteins with Hip Fracture Risk: The Cardiovascular Health Study. *The American journal of medicine*. 2022;135(9), 1101-1108.
79. Blair, H. C., Kalyvoti, E., Papachristou, N. I., Tourkova, I. L., Syggelos, S. A., Deligianni, D., ... & Papachristou, D. J. Apolipoprotein A-1 regulates osteoblast and lipoblast precursor cells in mice. *Laboratory Investigation*.2016; 96(7), 763-772.
80. Melián-Rivas, A., Calcumil-Herrera, P., Boin-Bakit, C., & Carrasco-Soto, R. Detection of COVID-19 (SARS-CoV-2) by saliva: a low-invasive diagnostic alternative. *International journal of odontostomatology*.2020;14(3), 316-320.
81. Pérez Bastías, N. A. Análisis de los métodos de cuantificación de quimioquinas en saliva de pacientes con cáncer oral.2021.
82. Rahman, M., Nasrin, F., Masuda, A., & Ohno, K. Decoding Abnormal Splicing Code in Human Diseases. *Journal of Investigative Genomics*. 2015; 2(1), 6-23.

83. Purnamasari D, Khumaedi AI, Soeroso Y, Marhamah S. The influence of diabetes and or periodontitis on inflammation and adiponectin level. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(3):2176-2182.
84. Chen L, Wei B, Xu L, Wu Y. The association of inflammatory markers and periodontal indexes with the risk of coronary heart disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 135:37-44.
85. Leira Y, Ameijeira P, Domínguez C, Leira R, Blanco J. The role of leptin as a biomarker in the relationship between periodontitis and chronic migraine. *J Clin Periodontol*. 2017 ;44(12):1208-1214.
86. Thanakun S, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Izumi Y. Increased oral inflammation, leukocytes, and leptin, and lower adiponectin in overweight or obesity. *Oral Dis*. 2017 ;23(7):956-965.
87. Shi D, Liu YY, Li W, Zhang X, Sun XJ, Xu L, Zhang L, Chen ZB, Meng HX. Association between plasma leptin level and systemic inflammatory markers in patients with aggressive periodontitis. *Chin Med J (Engl)*. 2015 20;128(4):528-32.
88. Purwar P, Khan MA, Gupta A, Mahdi AA, Pandey S, Singh B, Dixit J, Rai P. The effects of periodontal therapy on serum and salivary leptin levels in chronic periodontitis patients with normal body mass index. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(8):633-41.
89. Kanoriya D, Pradeep AR, Mallika A, Singhal S, Garg V. Correlation of crevicular fluid and serum levels of retinol-binding protein 4 and leptin in chronic periodontitis and obesity. *Clin Oral Investig*. 2017 ;21(7):2319-2325.
90. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009; 17;583(24):3966-73.
91. Sánchez, J. C. Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia médica*. 2005;36(1), 50-59.

92. Isola, G., Giudice, A. L., Polizzi, A., Alibrandi, A., Murabito, P., & Indelicato, F. Identification of the different salivary Interleukin-6 profiles in patients with periodontitis: a cross-sectional study. *Archives of Oral Biology*.2021; 122, 104997.
93. Demmer, R. T., Behle, J. H., Wolf, D. L., Handfield, M., Kebschull, M., Celenti, R., ... & Papapanou, P. N. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *Journal of periodontology*.2008; 79(11), 2112-2124.
94. Jeon, Y. S., Cha, J. K., Choi, S. H., Lee, J. H., & Lee, J. S. Transcriptomic profiles and their correlations in saliva and gingival tissue biopsy samples from periodontitis and healthy patients. *Journal of Periodontal & Implant Science*.2020; 50(5), 313.
95. Li, Y., Zhou, X., St. John, M. A. R., & Wong, D. T. W. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *Journal of dental research*.2004; 83(3), 199-203.
96. Hu, S., Wang, J., Meijer, J., Jeong, S., Xie, Y., Yu, T., ... & Wong, D. T. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*.2007;56(11), 3588-3600.
97. Li, Y., St. John, M. A., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R. C., ... & Wong, D. T. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 10(24).2004; 8442-8450.
98. Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of oral biology and craniofacial research*.2016; 6(1), 67-76.
99. Matarese G, Sanna V, Fontana S, Zappacostas. Leptin as a Novel Therapeutic Target for Immune Intervention.*Curr Drug Targete-Inf Aller*.2002;1:13-22.
100. Fantuzzi G, Faggionni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leuk Biol*.2000; 68:437-446.

101. San Miguel, A., Del Campo, F., Mazón, M. A., Alonso, N., Calvo, B., Martín-Gil, F. J., ... & Arranz, M. L. Estructura, funciones e importancia clínica de la leptina. *Química Clínica*.2006; 25(1), 5-9.
102. Bernotiene E, Palmer G, Gabay C. The role of leptin in innate and adaptative immune responses. *Arthritis Res Ther*.2006; 8:217-227.
103. Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Chang Li x, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor expresion and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation,role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J Immunol*.2006; 176:7745-7752.
104. Mancuso, Peter, et al. Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages. *Mechanisms of ageing and development*. 2001; 122: 1899-1913.
105. Mancuso, Peter, et al. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2 γ) protein expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*.2004; 287:.497-502.
106. Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumié, A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*.2004; 53(5), 1285-1292.
107. Napoleone, E. A. D. I. S., Di Santo, A., Amore, C., Baccante, G., Di Febbo, C., Porreca, E., ... & Lorenzet, R. Leptin induces tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells: a link between obesity and cardiovascular risk? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.2007; 5(7), 1462-1468.
108. Martín-Romero, Consuelo, et al. "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cellular immunology* .2000;199: 15-24.

109. Santos-Alvarez, José, Raimundo Goberna, and Victor Sánchez-Margalet. "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." *Cellular immunology*.1999;194: 6-11.
110. AY, Zuhail Yetkin, et al. The gingiva contains leptin and leptin receptor in health and disease. *Odontology*. 2012;100: 222-231.
111. Jonhson, R. B.; Serio, F. G. Leptin within healthy and diseased human gingiva. *Journal of periodontology*.2001; 72: 1254-1257.
112. Kim SJ. Leptin potentiates Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of TNF-alpha in monocyte-derived macrophages. *J Periodontal Implant Sci* 2010. 40:119-124.
- 113.Hernandez Guitián, Jesus. Papel de la leptina en la fisiología y fisiopatología oral. *Investigación clínica*.2015;56:421-431.
114. Falcón GJJ, Gazga UC, González TC, et al. Regulación de la inmunidad por la leptina. *Rev Educ Bioquímica*. 2012;31(3):92-99.
115. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*.2009; 29(6), 313-326.
116. El Solh, A.A., Akinnusi, M.E., Baddoura,F.H. & Mankousi,C.R. Endothelial cell apoptosis in obstructive sleep Apnea: a link to endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 175. 1186-91 (2007).
117. Durán-Cantolla, J., Alkhraisat, M. H., Martínez-Null, C., Aguirre, J. J., Guinea, E. R., & Anitua, E. Frequency of obstructive sleep apnea syndrome in dental patients with tooth wear. *Journal of Clinical Sleep Medicine*.2015; 11(4), 445-450.
118. Johns, Murray W. "A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale." *sleep*. 1991; 540-545.

119. Jeon, Y. S., Cha, J. K., Choi, S. H., Lee, J. H., & Lee, J. Transcriptomic profiles and their correlations in saliva and gingival tissue biopsy samples from periodontitis and healthy patients. *Journal of Periodontal & Implant Science*.2020;50(5), 313.

120. Navazesh, M.Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*.1993; 694(1), 72-77.

121. Proctor, G. B. The physiology of salivary secretion. *Periodontology*.2016; 2000, 70(1), 11-25.

122. Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*.2002;16(1), 47-51.

123. Hernández, A., VASALLO, P. M., Torres, A., & Salido, E. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*.1994; 14(2), 145-162.

124. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T) Method. *Methods*.2001;25:402-408.

125. Tonetti, MS y Sanz M. Implementation of the New Classification of Periodontal Diseases: Decision-making Algorithms for Clinical Practice and Education. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019.

126. Herrera, D., Figuero, E., Shapira, L., Jin, L., & Sanz, M. La nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Revista científica de la Sociedad Española de Periodoncia*.2018; 1(9), 94-110.

127. Morón-Araújo, M. La periodontitis y su relación con las enfermedades cardiovasculares. Promoción de la salud cardiovascular desde el consultorio dental. *Revista Colombiana de Cardiología*.2021; 28(5), 464-472.

128.Peres BU, Hirsch Allen AJ, Fox N, Laher I, Hanly P,Skomro R et al;Canadian Sleep and Circadian Network. Circulating biomarkers to identify cardiometabolic complications

in patients with obstructive Sleep Apnea: a systematic review. *Sleep Med REV* 2019;44:48-57.

129. Van der Touw T, Andronicos NM, Smart N. Is C-reactive protein elevated in obstructive sleep apnea? A systematic review and meta-analysis. *Biomarkers* 2019;24(5):429-35.

130. Li K, Wei P, Qin Y, Wei Y. Is C-reactive protein a marker of obstructive sleep apnea? A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 May;96(19).

131. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, Nida M, Aggarwal S, Sajid H, Naseem J, Loomba R. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med*. 2013; 15;9(10):1003-12.

132. Martínez-Aguilar, Víctor, Carrillo-Ávila, Bertha Arely, Guzmán-Marín, Eugenia, Puerto Solís, Marylín, Bermeo-Escalona, Josué R., & Pozos-Guillén, Amaury. (2017). C-reactive protein as an inflammatory marker in periodontal disease. *New science*, 9 (19), 51-64.

133. Hussain SM, Ebeling PR, Barker AL, Beilin LJ, Tonkin AM, McNeil JJ. Association of Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Level with Risk of Fractures in Healthy Older Adults. *JAMA Cardiol*. 2023; 1;8(3):268-27.

134. Usui M, Onizuka S, Sato T, Kokabu S, Ariyoshi W, Nakashima K. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. *Jpn Dent Sci Rev*. 2021; 57:201-208.

135. LAI, Yun-Ju, et al. Biomarkers in long COVID-19: A systematic review. *Frontiers in medicine*. 2023; vol. 10.

136. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for *quantitative* real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 Aug;3(3):71-85.
137. Pérez-Pérez, Antonio, et al. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & growth factor reviews*, 2017, vol. 35, p. 71-84.
138. Atwood CW. Sleep-related hypoventilation: the evolving role of leptin. *Chest*. 2005 Sep;128(3):1079-81.
139. Rabec C, de Lucas Ramos P, Veale D. Respiratory complications of obesity. *Arch Bronconeumol*. 2011 May;47(5):252-61.
140. Frühbeck, G., Salvador, J., Díez, J. Implications of leptin in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2000 Mar, vol. 12, p. 93-105.
141. Frühbeck, G.; Jebb, S. A.; Prentice, A. M. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clinical physiology*. 1998, vol. 18, no 5, p. 399-419.
142. Güiza, ML Trujillo; Garzón, O. Chaparro; Sivickas, EI Mockus. Expresión de leptina en linfocitos (ARNm). *Endocrinología y Nutrición*. 2002, vol. 49, no 4, p. 100-104.
143. WATSON, James D. *Biología molecular del gen*. 1983.
144. Regulación génica-National Human Genome Research Institute.
<https://www.genome.gov>>Regulación-genica
145. PACKARD, Rene RS; LIBBY, Peter. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical chemistry*. 2008, vol. 54, no 1, p. 24-38.

13. Anexos.

13.1. Hoja de información al paciente.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título	“Evaluación de la expresión de ARNm de la leptina en saliva en pacientes periodontales y/o síndrome de apnea obstructiva”.
Promotor	El servicio de estomatología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.
Investigador principal	Cristina Collado Llinares.
Centro	HOSPITAL UNIVERSITARI DR. PESET DE VALÈNCIA
Teléfono de contacto	9687801179

1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un *estudio de investigación* en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitari Dr. Peset de València, de acuerdo con la legislación vigente y las normas de buena práctica clínica.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

3. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El estudio en el que se le propone participar tiene como objetivo valorar si los niveles del ARN mensajero de la leptina en su saliva tienen relación con la presencia o no de AOS y si se modifican tras un tratamiento periodontal que tiene el objetivo de mejorar su salud periodontal.

4. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Evaluación de la expresión de ARNm de la leptina en saliva en pacientes periodontales y/o síndrome de apnea obstructiva. Le rogamos que lea detenidamente la siguiente información.

Se le va a tomar una muestra de su saliva previa a la realización de una exploración bucodental *que* consiste en la medición de una serie de parámetros clínicos en dientes y encías y posterior tratamiento de sus encías.

La duración de la prueba es de aproximadamente 45 minutos. La participación en el estudio es totalmente voluntaria y el principal beneficio para los participantes es el conocimiento y mejora de su salud bucodental. Se le tomará una muestra de saliva previa a la exploración bucodental. A continuación, se le realizará un tratamiento periodontal para mejorar su salud dental. Los pacientes serán reevaluados a las doce semanas del tratamiento periodontal volviéndose a obtener una muestra de saliva.

5. RIESGOS Y MOLESTIAS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN

La realización de la exploración periodontal no supone molestia ni perjuicio alguno para su salud.

El tratamiento de las encías requiere de la aplicación de anestesia local, lo que le provocará una sensación de acorchamiento del labio o de la cara que desaparecerá al cabo de pocas horas. Mientras dure el efecto de la anestesia, se aconseja precaución y evitar el comer para evitar mordeduras en la lengua o los labios debido a que no las notará como habitualmente.

Es habitual que después del tratamiento advierta un aumento de sensibilidad dentaria que desaparecerá espontáneamente en unos días, volviendo a su estado de sensibilidad inicial.

6. CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y a al Reglamento (UE) 2016/679 de Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Además de los derechos anteriormente citados, también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio.

Si deja de participar en el estudio, los datos obtenidos no se pueden eliminar para así garantizar la validez de la investigación. Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro, como el Promotor, son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Se ha establecido un sistema de seudonimización efectivo asignando un código de letras y números que no guardará relación con el número de la historia clínica ni con ningún dato identificativo del paciente. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 5 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la Unión Europea, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos.

Sepa que tiene derecho a acceder a la información generada sobre usted en el estudio. Se le proporcionará un informe de esta en caso de que así lo solicite.

7. COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El estudio no ha recibido ningún tipo de financiación externa ni existe conflicto de intereses.

Se realiza en la Universidad de Valencia.

Los sujetos de experimentación no obtendrán ninguna compensación económica por la participación en este estudio.

8. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Los resultados se utilizarán con fines de docencia, investigación y/o publicación científica.

Equipo investigador: Dr. Francisco Javier Silvestre Donat (Catedrático de la Universidad de Valencia y jefe del servicio de estomatología del Hospital Universitario del Hospital Peset. Valencia).

Dra. Marina Carrasco Llatas (Dra. En Medicina y Cirugía, ORL del Hospital Universitario Peset. Valencia. Presidenta de la Comisión de Roncopatía y Trastornos Respiratorios del Sueño de la SEORL-CCC).

Diego Arroyo Andújar, Doctor en Bioquímica y Biología molecular por la universidad autónoma de Barcelona. Presidente de la sociedad española de Diagnóstico Molecular (SEDM).

Cristina Collado Llinares. Licenciada en Odontología por la U.V. Máster Universitario en Ciencias Odontológicas. Práctica privada en periodoncia.

9. DATOS DE CONTACTO

Datos de contacto del investigador principal: Si tienen alguna pregunta sobre este proyecto de investigación, puede consultar en cualquier momento al Investigador responsable del estudio Cristina Collado Llinares.

Teléfono de contacto 687801179

Email: cristicollin@hotmail.com

Hospital Universitario Dr. Peset Av. Gaspar Aguilar, 90 Servicio de Estomatología, Consultas externas. El proyecto se realizará siguiendo los criterios éticos internacionales recogidos en la Declaración de Helsinki.

13.2. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título	Evaluación de la expresión de ARNm de la leptina en saliva en pacientes periodontales y/o síndrome de apnea obstructiva
---------------	--

Yo, <<nombre y apellidos del participante>>

- ☐ He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.
- ☐ He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- ☐ He recibido suficiente información sobre el estudio.
- ☐ He hablado con <<nombre del investigador>>
- ☐ Comprendo que mi participación es voluntaria.
- ☐ Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.

- Sin tener que dar explicaciones.

- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Declaro libremente mi conformidad para participar en el estudio. Firma del participante.

Firma del participante

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el paciente)

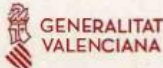
REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Revoco el consentimiento prestado en fecha _____ para participar en el estudio y, para que así conste, firmo la presente revocación.

Firma

En Valencia, a _____ de _____ de 20__.

13.3 Documento del CEIC.

		
Departament de Salut de València - Doctor Peset		
 A/A.: Cristina Collado Odontología.		
 Título: El papel de la leptina como biomarcador en la relación entre la periodontitis y la apnea obstructiva del sueño: expresión de ARN mensajero.		
Proyecto de investigación. Tesis doctoral		
Código CEIm: 133/21		
 DICTAMEN DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCTOR PESET DE VALENCIA		
 Dª. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Etico de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia		
 CERTIFICA:		
 Que este Comité, en la reunión ordinaria celebrada el día 15 de Diciembre de 2021, ha evaluado la propuesta del proyecto de investigación del estudio arriba referenciado.		
 Y considera que:		
 Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto teniendo en cuenta los beneficios esperados.		
 La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para		
Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.		
C/ San Lázaro s/n. Edificio CIPS 1ª Planta. Valencia 46017. Teléfono 96.3131652		
Correo electrónico ceic_peset@gva.es.		

Departament de Salut de València - Doctor Peset
llevar a cabo el estudio.

Que se han evaluado la compensaciones económicas previstas (cuando las haya) y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos y se consideran adecuadas.

Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Que el proyecto se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 957/2020, de 3 de noviembre, por el que se regulan los estudios observacionales con medicamentos de uso humano.

Son adecuados los procedimientos para obtener el Consentimiento Informado y el modo de reclutamiento previsto, así como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio

Que en la precitada reunión y tras el estudio del protocolo, este Ceim emite un Dictamen Favorable a la realización del estudio en el Centro y con Dra. Cristina Collado como investigadora principal

Valencia 20 de Diciembre de 2021



Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Doctor Peset de 2
Valencia.
C/ San Lázaro s/n. Edificio CIPS 1ª Planta. Valencia 46017. Teléfono 96.3131652
Correo electrónico ceic_peset@gva.es.



Sumilab, s. l.

Material Médico Hospitalario

Avda. Músico Maestro Rodrigo, 95, bajo
46015 VALENCIA
Tels. 96 346 23 52 - 96 347 51 59
Móvil 647 391 928 - Fax 96 347 11 79
E-mail: sumilab@sumilab.es

Cristina Collado Llinares
Avd. Gaspar Aguilar, 90
46017 VALENCIA
VALENCIA

Factura

FECHA	NUMERO	S/REFERENCIA	N.º CUENTA	C.I.F. / N.I.F.	FORMA DE PAGO	COMISIONISTA
22/12/2023	702524	Pº E-MAIL	1453	53097407K	Transferencia Vencimiento: 22/12/2023	3

ARTICULO	CANTIDAD	DESCRIPCION	PRECIO	DESCUENTO	IMPORTE
		Albarán nº 1-043385 22/12/2023			
ZZ999999	1	TB Green Premix Ex Taq 5x5ml Ref. RR420W	750,0000		750,00
ZZ999999	1	PrimeScript RT Master Mix 200rxn Ref. RR036A	457,3200		457,32

Ins. en el R. M. de Valencia. Hoja 5915, Folio 240, Tomo 944, Libro Sdes., Sec. 4ª - C.I.F. B-46140109
 Libro Sdes., Sec. 4ª - C.I.F. B-46140109
 C. de 28-10-41 (B.O.E. 1-11-41) y O. de P. G. de 24-5-42 (B.O.E. 29-9-42)
 Material Científico y Productos Químicos sucos de libre contratación y precio por O. M. del Ministerio de I. y C. de 28-10-41 (B.O.E. 1-11-41)

Portes: 0,00

Base Imponible:	0,00	IVA:10%	0,00
Base Imponible:	1.207,32	IVA:21%	253,54
Base Imponible:	0,00	IVA:4%	0,00
Exento:			

Sus datos serán usados legalmente para prestarle nuestros servicios y solo serán cedidos a entidades necesarias para dicha prestación. Conservaremos sus datos mientras dure nuestra relación y nos obliguen las leyes. Siempre podrá saber qué información tenemos sobre usted, rectificarla y eliminarla una vez finalice nuestra relación. También puede solicitar el traspaso de su información a otra entidad (portabilidad). Solicite estos derechos por escrito a nuestra dirección, junto a una fotocopia de su DNI. Si entiende que sus derechos han sido vulnerados, puede reclamar en www.agpd.es.

DTO. ESPECIAL	DTO. P.P.	BASE IMPONIBLE	I.V.A.	RECARGO EQUIV.	TOTAL
		1.207,32	253,54		1.460,86

