



TEMA 7-2019:

Relación sintomatológica de la enfermedad vascular periférica de miembros inferiores y factores de riesgo cardiovascular clásico y genérico en personas con periodontitis en población de Santa Ana, El Salvador.

Recibido: 22/01/2019

Aceptado: 07/09/2019

¹ Acosta Martínez A
² Somoza A
³ Quitana F
⁴ Villacorta D

¹ Departamento de Investigación, Universidad Autónoma de Santa Ana, Km 63 ½ autopista Sur, Santa Ana, El Salvador, Tel.:2440-0245 E-mail: investigador2@unasa.edu.sv

² Escuela de odontología, Universidad Autónoma de Santa Ana.

³ Escuela de medicina, Universidad Autónoma de Santa Ana.

⁴ Escuela de fisioterapia, Universidad Autónoma de Santa Ana.

Resumen

Esta fue una investigación de tipo y alcance correlacional, la selección de la muestra fue dirigida con un total de 126 asistentes clasificados con periodontitis, a los cuales se les realizaron una entrevista clínica, evaluación fisioterapéutica con clasificación de grado sintomatológico de enfermedad vascular de miembros inferiores, exámenes de química sanguínea y polimorfismos genéticos, para valorar factores de riesgo para la enfermedad vascular de miembros inferiores.

El objetivo principal de la investigación fue determinar la relación de la Enfermedad Periodontal, factores genéticos y de riesgo cardiovascular con la sintomatología de la enfermedad vascular de miembros inferiores en población de Santa Ana, El Salvador.

La población de estudio estuvo compuesta por los grados de enfermedad periodontal leve (40.3%), moderada (37.1%), severa (22.6%), las frecuencias polimórficas encontradas fueron para MTFHR: CT:40%, CC:36%, TT:24%; para I/DECA: I/I:33.9%, D/D:16.9%, I/D:49.2%; para Leyden V: GA:1.6%, GG:98.4, AA:0% y para protrombina II: GA:0.8%, GG:99.2%, AA:0% . Además se pudo determinar que los grados de la enfermedad vascular periférica se

encuentra distribuidos de igual manera entre todos los grados de enfermedad periodontal para la prueba de la ANOVA (Sig. 0.243) por lo que no presentó relación significativa, el gráfico de comparación de las medianas presenta un ligero aumento de sintomatología en pacientes con enfermedad periodontal severa.

Palabras claves:

Periodontitis, Polimorfismo, Factores de riesgo cardiovasculares.

Summary

This was a correlational investigation, the selection of the sample was directed with a total of 126 attendees classified with periodontitis, a clinical interview, physiotherapeutic evaluation with degree of symptomatic degree of vascular disease of lower limbs, blood chemistry tests and genetic polymorphisms, for assess risk factors for lower limb vascular disease.

The main objective of the research was to determine the relationship of Periodontal Disease, genetic fac-

tors and cardiovascular risk with the symptoms of vascular disease of lower limbs in the population of Santa Ana, El Salvador.

The study population was composed of the degrees of mild periodontal disease (40.3%), moderate (37.1%), severe (22.6%), the polymorphic frequencies found were for MTFHR: CT: 40%, CC: 36%, TT: 24%; for ECA I/D: I/I:33.9, D/D:16.9, I/D:49.2; for Leyden V: GA: 1.6%, GG: 98.4, AA: 0% and for prothrombin II: GA: 0.8%, GG: 99.2%, AA: 0%. In addition it was determined that the degrees of peripheral vascular disease were It is distributed equally among all the degrees of periodontal disease for the ANOVA test (Sig. 0.243) so it did not present a significant relationship, the comparison chart of the medians shows a slight increase in symptoms in patients with severe periodontal disease.

Key words:

Periodontitis, Polymorphism, Cardiovascular risk factors

Introducción

Se ha discutido que existe una relación entre la enfermedad periodontal y las enfermedades cardiovasculares, algunas de las cuales sustentan que existe aumento del fibrinógeno y en personas con enfermedad periodontal, sin implicancia en la gravedad, tampoco si es sistémica o localizada^(1,2). El aumento del fibrinógeno es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se han encontrado asociaciones moderadamente fuertes entre el nivel de fibrinógeno plasmático y los riesgos de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, mortalidad vascular y mortalidad no vascular en una amplia gama de circunstancias en adultos jóvenes de edad media⁽³⁾, por tanto podría definirse posible implicación de la enfermedad periodontal con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares por su relación en el aumento del fibrinógeno plasmático, podría indicar la posibilidad de ser un factor de riesgo modificable que interactúa con el factor genético. La importancia de las enfermedades cardiovasculares ha sido constante a lo largo de la historia y se ha convertido en un problema de salud en los últimos años, debido a los cambios en los estilos de vida, convirtiéndose en la de mayor prevalencia en la mayoría de países y un problema para la salud

pública por su relación con otras enfermedades y índice de mortalidad^(4,5) por ser la enfermedad periodontal una enfermedad que en la mayoría de casos es prevenible es conveniente indagar sobre su relación con las enfermedades cardiovasculares.

La investigación de polimorfismo genético va encaminada a comprender la influencia de los factores modificables y no modificables al desarrollo de enfermedades, para contribuir con el conocimiento sobre el desarrollo de enfermedades complejas y la interacción del genoma con el ambiente (fármacos, alimentos, condiciones de vida. etc.) estos conocimientos científicos contribuyen a tomar mejores decisiones de prevención, debido a que muchos resultados demostraron no ser extrapolables entre poblaciones, por lo cual no se pueden realizar por el momento recomendaciones generales para toda población.

Existe suficiente evidencia en la cual los pacientes con sintomatología de enfermedad vascular periférica, tienen mayor riesgo de originar un infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o muerte vascular^(7,8).

Materiales y métodos

Esta fue una investigación de tipo y alcance correlacional en el que se busca determinar la relación entre el aumento o disminución del grado de periodontitis con un aumento o disminución de la enfermedad vascular periférica de miembros inferiores, para establecer una relación entre la enfermedad periodontal y factores cardiovasculares, incluyendo las variantes genéticas MTFHR C677T, Factor V Leyden G1691A, protrombina II G20210A, ECA I/D en el desarrollo de sintomatologías de la enfermedad vascular de miembros inferiores, indagando en los factores que puedan inferir en la aparición de la enfermedad, como estilos de vida e historia familiar, de diseño no experimental.

El tipo de muestreo es dirigido, ya que fue elegido por características afines siguientes: todas las muestras biológicas procesadas fueron seleccionadas por haber determinado en los participantes previamente la enfermedad periodontal que fue el principal elemento de discriminador, los participantes cuentan con edades entre 20 a 60 años y son nacidas en el departamento de Santa Ana,

estas muestras fueron captados por las clínicas de Odontología de la Universidad Autónoma de Santa Ana, las cuales están al resguardo en condiciones de almacenamiento de -20 grados en el laboratorio de investigación.

El total de la muestra se procesaron 124 muestras de ADN que cumplieron los criterios establecidos. Mediante el procesamiento de ADN los participantes fueron divididos en función del resultado de su genotipo y haplotipos.

1) historia clínica:

La cual consistió en realizar ciertas preguntas acerca del estado de salud de las encías la cual conlleva el interrogatorio de presencia de hemorragia al cepillado o espontáneamente, hábitos de higiene y otros hábitos que el paciente pudiera tener.

2) Evaluación clínica:

Análisis de los datos recolectados que se obtuvo mediante la revisión con el espejo dental para observar el estado de salud de las encías verificando su color, su consistencia, si presenta inflamación o hemorragia, supuraciones o presencia de infecciones, movilidad dental, recesión gingival y cantidad de sarro o tártaro dental presentes en las diferentes superficies de la pieza dentaria.

3) Examen radiográfico:

Mediante el análisis de dos radiografías periapicales en el sector posterior y una en el sector anterior, en las cuales se observará en un negatoscopio la cantidad de hueso presente o reabsorbido para determinar el tipo de periodontitis que presenta y si existen lesiones periapicales.

4) Procedimiento evaluación de sintomatología de enfermedad vascular periférica de miembros inferiores:

Se realizó exploración física, basada en la observación y palpación de venas varicosas o varices, cicatrices, pulso pedio débil, dolor a la palpación, temperatura de la piel; así como coloración, además la sensibilidad y finalmente se efectuó una evaluación de la marcha del paciente. Posteriormente se analizó cada caso de pacientes y se clasificará en grado I, II, III, IV o V, según la sintomatología clínica según criterios elaborados en la siguiente tabla:

■ **Tabla 1:** Cuadro de clasificación sintomatológica de la enfermedad vascular periférica

Grados	Sintomatología y signos clínicos
Grado 1	Sin signos visibles o palpables/ asintomático
Grado 2	<ul style="list-style-type: none"> • Telangiectasias • Venas reticulares • Marcha antálgica • Dolor al movimiento
Grado 3	<ul style="list-style-type: none"> • Venas tronculares • Dolor a la palpación • Calor localizado • Calambres • Frialdad en zonas distales • Pulso débil • Cicatrices • Hiperpigmentación
Grado 4	<ul style="list-style-type: none"> • Dolor al reposo diario(pesadez) • Palidez • Hipoestesia • Úlcera superficial
Grado 5	<ul style="list-style-type: none"> • Necrosis tisular/ lesión de tejido • Úlcera profunda

Fuente: Desarrollado por Médico internista, Licenciada en Fisioterapia y Terapia Ocupacional, modificado de; Manual de Patología Vascular, Guiones de Angiología y Cirugía Vascular, Bases de la Medicina Clínica, Insuficiencia Venosa de Extremidades inferiores (6,7).

5) Procedimientos de análisis moleculares

El ADN se obtuvo mediante la técnica de extracción en columna invitrogen purelink genomic DNA, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y almacenada a - 20° C.

Los protocolos se realizaron acuerdo al proveedor, como se pueden apreciar en la tabla 2.

■ **Tabla 2:** Protocolo de amplificación

Polimorfismo	Protocolo de amplificación	Producto esperado
MTFHR C677T	30 ciclos: 94°C/0:30', 59 °C/0:30', 72 °C/0:30'; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.	225 pb.
LEYDEN V	33 ciclos: 94°C/0:30', 53 °C/0:30', 72 °C/0:30'; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.	313 pb.
PROTOMBINA II	37 ciclos: 94°C/0:30', 53 °C/0:30', 72 °C/0:30'; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.	371 pb.
ECA I/D	35 ciclos: 94°C/0:30', 58 °C/0:30', 72 °C/0:30'; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.	Inserción 480 pb Deleción 180 pb

Luego de terminado el ciclado, se adiciono a cada tubo de amplificación 1 µl de la enzima de restricción según cada caso y se incubaron por 3 horas a 37°C y luego 10 minutos a 65°C

Fuente: elaborada por los autores según protocolos descritos por ATGen

Se realizó la carga 20 ul de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular en gel de agarosa al 2% preteñido con Red gel (20 ug/ml).

Se permitió su migración a 95 voltios, hasta que el colorante azul de bromofenol del buffer de carga tuvo un recorrido de 3,5 cm en la agarosa, la cual se visualizó en un equipo ENDURO GDS transiluminator la cual se realizó a 302nm a 420 nm UV.

Resultados

■ **Tabla 3:** Descripción general de la población en estudio

Sexo	Recuento	Porcentaje	Edad	Recuento	Porcentaje
Hombre	48	38.7%	De 20 a 50 años	102	82.3%
Mujer	76	61.3%	Mayor de 50 años	22	17.7%
Total	124	100%		124	100%

Fuente: elaborado por los autores de los datos generales de entrevista médica, 2018

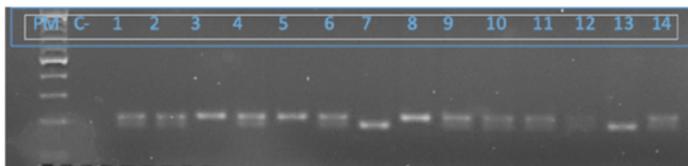
De las 124 muestras válidas para el estudio, la muestra es duplicada por el sexo femenino, las edades de 20 a 50 años representan la porción mayoritaria de la muestra puesto que se espera que no sea este un factor de mayor peso que las demás variables expuestas.

■ **Tabla 2:** Distribución genotípica polimorfismo MTFHR C677TXGenotipo

Distribución genotípica polimorfismo MTFHR C677TXGenotipo	F	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
CT	49	40%	40%	37.6
CC	45	36%	76%	74.3
TT	30	24%	100%	100
Total	124	100		
Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)				0.027512
< 0.05 - la muestra no es consistente para HWE				

Fuente: elaborado por los autores de los datos generales de entrevista médica, 2018

Figura 1 - Electroforesis MTFHR C677T.



PM: marcador de peso molecular, **C-:** control negativo, Carril 1,2 heterocigoto, carril 3 homocigoto normal, carril 7 homocigoto mutado

Fuente: resultados obtenidos por PCR-RFLP, Pm; marcador de peso molecular, C-; control negativo.

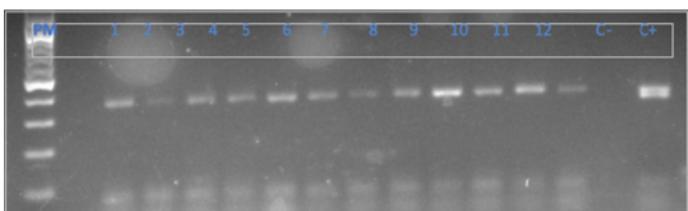
La distribución de polimorfismo se encuentra en equilibrio poblacional de Hardy Weinberg lo que establece que no existe presión selectiva en esta población, el dominio heterocigoto de las muestras y la frecuencia del alelo nativo es muy similar a las reportadas para población latinoamericana, el genotipo TT considerado mutado es similar al estudio anterior reportado en población de Santa Ana (0.22).

■ **Figura 2:** Distribución genotípica polimorfismo Protrombina II G20210AXGenotipo

Distribución genotípica polimorfismo MTFHR C677T X Genotipo	F	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
GA	1	0.8	0.8	0.8
GG	123	99.2	99.2	100
AA	0	0	0	100
Total	124	100	100	
Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)				0.964041
< 0.05 - la muestra no es consistente para HWE				

Fuente: Elaboración propia, distribución del polimorfismo Protrombina II

Figura 3 - Electroforesis Protrombina II



Fuente: resultados obtenidos por PCR-RFLP, Pm; marcador de peso molecular, C-; control negativo, C+; control positivo.

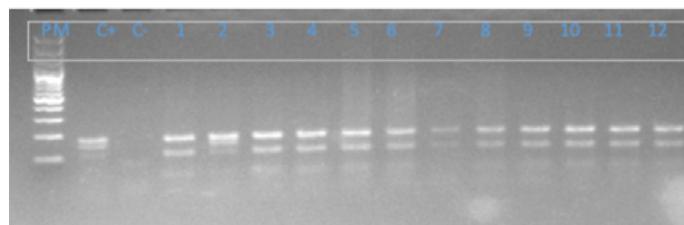
La frecuencia de los heterocigotos para la variante G20210A fue de 0.8% para la muestra en estudio, la cual se encuentra en desequilibrio de Hardy-Weinberg, se sabe que esta mutación puede generar cambios significativos por esa razón existe poca frecuencia en la población encontrada.

■ **Tabla 5:** Distribución genotípica polimorfismo Leyden V G1691A

Genotipos	F	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
GA	2	1.6	1.6	0.8
GG	122	98.4	98.4	100
AA	0	0	0	100
Total	124	100	100	
Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)				0.927864
< 0.05 - la muestra no es consistente para HWE				

Fuente: Elaboración propia, distribución del polimorfismo Leyden V G1691A

Figura 4 - Electroforesis polimorfismo Leyden 5 (carril 1 homocigoto normal, carril 2 mutado heterocigoto mutado, muestra control expresa alelo heterocigoto mutado)



Fuente: Resultados obtenidos por PCR-RFLP; Pm: marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+: control positivo.

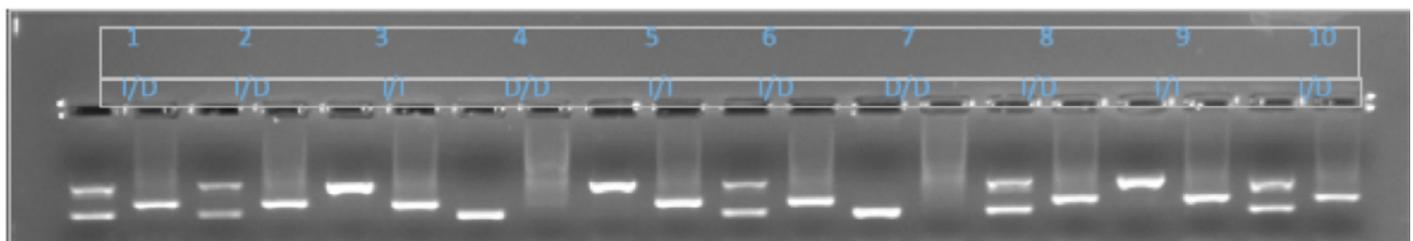
La frecuencia de los heterocigotos para la variante G1691A fue de 1.6 % para la muestra en estudio, la cual se encuentra en desequilibrio de Hardy-Weinberg, debido a la influencia que este cambio puede tener en la persona es poco frecuente encontrar heterocigotos mutados.

■ **Tabla 6:** Distribución genotípica polimorfismo ECA I/D

Genotipos	F	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
I/I	42	33.9	33.9	33.9
D/D	21	16.9	16.9	50.8
I/D	61	49.2	49.2	100
Total	124	100	100	
Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)				0.885579
< 0.05 - la muestra no es consistente para HWE				

La población estudiada presenta un polimorfismo de inserción/ deleción (I/D) para este gen con mayor frecuencia, para la definición genotípica de los alelos se involucra la presencia (alelo I), o la ausencia (alelo D), Se ha considerado el alelo D como un modificador de la actividad de la enzima, aunque en poblaciones Latinoamericana se ha reportado mayor frecuencia del genotipo D, en la población estudio el genotipo I/I fue el segundo genotipo más frecuente.

Figura 5 - Electroforesis polimorfismo inserción/deleción de la ECA (carril 1,2 Heterocigoto I/D, carril 3 Homocigoto I/I, carril 4 D/D)



Fuente: resultados obtenidos por PCR-RFLP; Muestra numero 1: inserción y deleción, lectura a dos carriles, el segundo confirma la presencia de la deleción.

■ **Tabla 7:** Frecuencias de la enfermedad vascular de miembros inferiores por grados en personas con periodontitisXGrado

	F	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Grado 1	19	15%	15%
Grado 2	20	16%	31%
Grado 3	84	68%	99%
Grado 4	1	1%	100%
Grado 5	0	0	100%
Total	124	100%	100%

Las personas con periodontitis fueron analizadas según características sintomatológicas, dentro de las 124 muestras identificadas para el estudio, la mayor parte fue clasificada como estadio 3, que dentro de la sintomatología incluye: Venas tronculares, dolor a la palpación, calor localizado, calambres, frialdad en zonas distales, pulso débil, cicatrices, hiperpigmentación, sintomatologías que ya pueden ser visibles y que pueden estar ocasionando una dificultad para la vida de la persona, lo que corresponde entre los grados uno y tres al 69% de la población en estudio, un factor de riesgo no visible dentro del estudio sería el tiempo en que la persona ha padecido enfermedad periodontal.

Fuente: elaborado por los autores de los datos de evaluación vascular sintomatológica, 2018.

Tabla 8: Distribución de los grados sintomatológicos de enfermedad vascular periférica en grados de enfermedad periodontal. X Enfermedad vascular de miembros inferiores

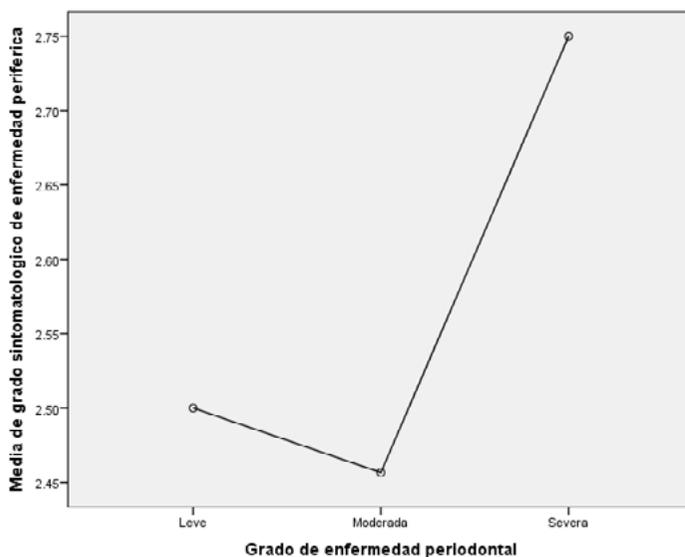
	Suma de cuadrados	Grados de libertad total	Media cuadrática	F	Significación
Entre grupos	1.635	2	0.818	1.431	0.243
Dentro de grupos	69.163	121	0.572		
Total	70.798	123			

Significación 0.05.

Fuente: análisis ANOVA realizado en SPSS por los autores de los análisis recogidos.

Mediante el análisis de la prueba de la ANOVA de un factor para la distribución de grupos, ha permitido analizar uno de los factores de la hipótesis, en cuanto los grados de la enfermedad vascular periférica se encuentra distribuidos de igual manera entre todos los grados sintomatológicos.

Figura 6. Gráfico de medianas comparación de grupos grados sintomatológicos de enfermedad vascular y grados de enfermedad periodontal.



Fuente: Análisis de gráfico de medianas de datos recogidos, elaborada por los autores

Aunque los grados sintomatológicos de enfermedad vascular de miembros inferiores parece estar distribuida para la comparación de grupos (ANOVA) de igual manera en el gráfico de comparación de las medianas se puede apreciar un ligero aumento de sintomatología en pacientes con enfermedad periodontal severa.

Discusión

Este trabajo permitió conocer la frecuencia genotípica, de las variantes: MTHFR C677T, factor V de Leyden, el Factor II de la protrombina y Gen de la ECA I/D, lo que permitirá compararla con las investigaciones a nivel mundial y otros reportes regionales, así como también establecer un patrón de comparación en futuras investigaciones asociadas a otras patologías.

En el caso de la variante protrombina G20210A se encontrado una frecuencia del heterocigoto de 0.08% en la población en estudio no se encontró ningún caso de homocigoto mutado, respecto a la distribución de alelo factor V Leiden (G1691A) la frecuencia del genotipo heterocigoto fue 1.6 % para la variante homocigota mutada no se encontró ningún resultado, en cuanto la distribución del polimorfismo C677T la forma heterocigoto del genotipo se encontró en el 40% de los casos; la forma homocigota para la mutación se identificó en el 24 % de los casos con respecto a la última reportada en 2017 en donde se encontraron 59% y 22% respectivamente, ambas poblaciones se encuentran en equilibrio y son muy parecidas lo que establece una prevalencia general del polimorfismo en población de Santa Ana, para el polimorfismo de inserción/delección de la ECA los genotipos encontrados fueron Homocigoto I/I 33.9%, homocigoto D/D; 16.9% y Heterocigoto I/D; 49.2%.

Se investigó la asociación de la periodontitis, los polimorfismos FV de Leiden, protrombina G20210A y MTHFR C677T con la presencia de sintomatología de la enfermedad vascular de miembros inferiores, la escasa frecuencia de la presencia de las variantes Leiden FV y protombina G20210A imposibilita su analices aunque también nos dice su escaso aporte para ser utilizado en un test de predisposición como único factor de asociación, debido a la alta prevalencia de sintomatología grado 2 y 3 encontrada. . Esto concuerda con investigaciones previas en las cuales se determinó que la asociación del Factor V carece de

valor a menos que estén combinados con otro factor de riesgo u otras variantes polimórficas.

La población en estudio para el alelo I/D de la ECA se encuentra en desequilibrio de Hardy Weinberg, (0.885579) lo que puede suponer un sesgo en la selección de la muestra, debido a que no se ha encontrado relación entre una presión selectiva y la enfermedad periodontal, lo que supone la necesidad de realizar un estudio de frecuencia del alelo a nivel poblacional general, debido a que la frecuencia del genotipo D/D fue menor que la reportada en la región (16.9%)

El sobrepeso y la obesidad es uno de los factores de predisposición cardiovasculares más frecuentes en la población estudiada, los múltiples factores asociados a este tipo de enfermedad requieren un análisis complejo, aunque la selección de la muestra se realizó en base a pacientes con periodontitis, las condiciones de riesgo tradicional aparecen en alta frecuencia, lo que denota que el problema más notable se encuentra en los factores de riesgo modificables

Declaración de conflictos de interés

No existe conflicto de intereses por parte de los investigadores de este proyecto.

Bibliografía

1. Milla T. *Evaluación de fibrinógeno plasmático en pacientes con enfermedad periodontal*. Rev Estomatol Herediana. 2014 ;24(4):256-262.
2. Ebersole J, Cappelli D, Mott G, Kesavalu L, Holt S, Singer R. *Manifestaciones sistémicas de la periodontitis en primates no humanos*. (Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate). J Periodont Res 1999; 34:358-62.
3. Milla T. *Evaluación de fibrinógeno plasmático en pacientes con enfermedad periodontal*. Rev Estomatol Herediana. 2014 ;24(4):256-262.
4. Danesh J, Lewington S. *El nivel de fibrinógeno en plasma y el riesgo de enfermedades cardiovasculares mayores y mortalidad no vascular* (Plasma Fibrinogen Level and the Risk of Major Cardiovascular Diseases and Nonvascular Mortality). 2005;294(14).
5. World Health Organization. *Global status report on non communicable diseases 2011*. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2011. Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/.

6. Romero J. *Enfermedad Arterial Periférica* [Internet] Barcelona 2010. [Consulta 21 de febrero de 2018]. Disponible en:

http://www.podologiaeuskadi.com/Enfermedad_arterial_periferica.pdf

7. Mege M. *Bases de la Medicina Clínica, Insuficiencia Venosa de Extremidades inferiores* [Internet] Chile 2010. [Consulta 27 de febrero de 2018]. Disponible en: http://www.basesmedicina.cl/vascular/insuficiencia_venosa/insuficiencia_venosa_%20de_extremidades_inferiores.pdf