



Evaluación del polimorfismo rs9594738 C>T de RANKL en pacientes con periodontitis apical crónica

Evaluation of the rs9594738 C>T polymorphism of RANKL in patients with chronic apical periodontitis

Editado por:
María Fernanda Barboza-Dávalos.
Departamento de Biología Molecular y Genómica del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, México.

Ramón Chávez-Mireles^{1*}, Claudia Azucena Palafox-Sánchez^{1,2,3}, Luis Gerardo Gascón-Guerra⁴, Alvaro Cruz-González^{2,4}, Diana Celeste Salazar-Camarena^{3,4*}

¹Doctorado en Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. ²Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB), Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. ³Grupo de Inmunología Molecular, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. ⁴Especialidad en Endodoncia, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

Cartel presentado en la XXXIV Semana de Investigación Científica, celebrada en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud en octubre 2023.

***Correspondencia**
Ramón Chávez-Mireles. Correo: ramon.chavez9890@alumnos.udg.mx
Diana Celeste Salazar-Camarena. Correo: celeste.salazar@academicos.udg.mx

Recibido: 6 de diciembre, 2023

Aceptado: 21 de diciembre, 2023

Publicado: 1 de enero, 2024

Cómo citar este artículo:
Chávez-Mireles R, Palafox-Sánchez CA, Gascón-Guerra LG, Cruz-González A, Salazar-Camarena DC. Evaluación del polimorfismo rs9594738 C>T de RANKL en pacientes con periodontitis apical crónica. Ósmosis Revista Médica Estudiantil. 2024;(3):19-24

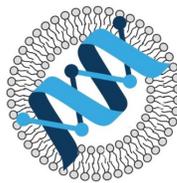
Resumen

Introducción: La periodontitis apical crónica (PAC) es una inflamación que afecta los tejidos alrededor del diente, incluyendo el hueso alveolar y el ligamento periodontal. El ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL, por sus siglas en inglés), producido por osteoclastos y células T activadas, está implicado en la resorción ósea característica de la PAC. El polimorfismo de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) rs9594738 C>T puede tener un efecto sobre la expresión de RANKL, pero la asociación entre la variante polimórfica en población del occidente de México y la susceptibilidad de la enfermedad continúa siendo desconocida. **Objetivo general:** Evaluar la asociación de la variante polimórfica rs9594738 C>T de RANKL con las frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con PAC. **Metodología:** Se incluyeron 151 pacientes con PAC y 148 sujetos clínicamente sanos (CCS); la variante rs9594738 del gen *TNFSF11* (RANKL) se determinó por medio de sondas TaqMan con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) (Cat. 4351379, *Applied Biosystems*) a partir de ADN genómico; se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), las razones de probabilidad, y los intervalos de confianza (IC) del 95%; el nivel de significancia estadístico fue de un alfa del 5% ($p < 0.05$). **Resultados:** Según el EHW, la población de CCS se encuentra en equilibrio. El genotipo polimórfico (TT) fue el más prevalente en el grupo de PAC, sin significancia estadística. No hubo diferencias significativas entre la distribución genotípica y alélica para ambos grupos. **Conclusiones:** La variante polimórfica rs9594738 para RANKL no es un marcador genético de susceptibilidad en pacientes con PAC pertenecientes al occidente de México.

Palabras clave: Periodontitis apical crónica (PAC); RANKL; rs9594738.

Introducción

La periodontitis apical (PA) es una enfermedad inflamatoria crónica de origen infeccioso que afecta los tejidos de soporte dental, tales como el hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal. La PA se presenta aproximadamente en el 40% de los adultos a nivel mundial y su prevalencia aumenta con la edad del paciente [1,2]. En esta enfermedad, la respuesta inmunitaria del hospedero ante la acumulación de bacterias en el tejido, como *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, suele presentarse de forma aguda o crónica [3]. Mientras que en el periodo asintomático la evaluación de la PA principalmente se basa en exámenes radiográficos, la sintomatología orienta al diagnóstico conforme el dolor se incrementa y se forman



Departamento de
Biología Molecular y
Genómica CUCS|UdeG



La propiedad intelectual de este artículo le pertenece a los autores. "Ósmosis Revista Médica Estudiantil" es una revista de libre acceso y se rige completamente bajo el criterio legal de *Creative Commons* en su licencia Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional ([CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)).

Abstract

Introduction: Chronic apical periodontitis (CAP) is an inflammation affecting the tissues surrounding the tooth, including the alveolar bone and the periodontal ligament. The receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), produced by osteoclasts and activated T cells, is implicated in the characteristic bone resorption observed in CAP. The single nucleotide polymorphism (SNP) rs9594738 C>T may influence RANKL expression, but the association between this polymorphic variant in the population of Western Mexico and disease susceptibility remains unknown. **Overall Objective:** To evaluate the association of the polymorphic variant rs9594738 C>T in RANKL with genotypic and allelic frequencies in patients with CAP. **Methodology:** A total of 151 patients with CAP and 148 clinically healthy subjects (CHS) were included. The rs9594738 variant of the *TNFSF11* gene (RANKL) was determined using TaqMan probes with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique (Cat. 4351379, Applied Biosystems) from genomic DNA. Genotypic and allelic frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), odds ratios (OR), and 95% confidence intervals (CI) were calculated. The statistical significance level was set at an alpha of 5% ($p < 0.05$). **Results:** According to HWE, the CHS population is in equilibrium. The polymorphic genotype (TT) was the most prevalent in the CAP group, without statistical significance. There were no significant differences in genotypic and allelic distribution between both groups. **Conclusions:** The polymorphic variant rs9594738 for RANKL is not a genetic marker of susceptibility in patients with CAP from Western Mexico.

Keywords: Chronic apical periodontitis (CAP); RANKL; rs9594738.

abscesos en los sitios afectados por caries o enfermedad periodontal [4].

Existe evidencia de que la bacteriemia e inflamación sistémica de bajo grado asociadas con la PA pueden afectar negativamente a la salud en general. En pacientes que padecen PA se ha reportado un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, y diabetes mellitus (DM). Por otro lado, pacientes con trastornos autoinmunes, como en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y psoriasis, muestran una mayor prevalencia de PA y peor pronóstico postratamiento debido a la respuesta inmune desregulada propia de su padecimiento de base [5].

La PA crónica (PAC) es una de las secuelas de la infección primaria del conducto radicular, la cual se promueve por un proceso de inflamación persistente en el tejido periapical que, en consecuencia, incrementa la resorción ósea y la formación de lesiones en el sitio de la infección [5]. Las lesiones presentadas en este padecimiento se deben, en esencia, a los procesos de formación y resorción ósea, llevados a cabo por los osteoblastos y osteoclastos, respectivamente; mismos que son dependientes del receptor activador para el factor nuclear kappa-B (RANK) y su ligando (RANKL, por sus siglas en inglés). También se enlistan otros factores propiciantes, como las interacciones bacterianas patógenas, la actividad proliferativa de células epiteliales y una respuesta inmunitaria

impulsada por citocinas, quimiocinas, y la polarización de células Th1 y Th17 [6,7]. En la PA, se ha asociado la expresión de RANKL por parte de osteoblastos, monocitos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, y de linfocitos T activados, con la destrucción ósea característica de este trastorno inflamatorio [1,6,7].

El descubrimiento del RANKL ha sido clave para entender cómo esta citocina induce directamente la osteoclastogénesis, proponiéndose así una explicación más clara del mecanismo para la resorción ósea alveolar en la periodontitis y de procesos homeostáticos (supervivencia y activación de osteoclastos) [8]. RANKL es un polipéptido de 314 aminoácidos que se encuentra codificado por el gen *TNFSF11*, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), y se expresa en forma de proteína unida a la membrana o en forma secretada. Es el regulador maestro de la diferenciación de los osteoclastos y desempeña un papel importante en la resorción ósea periodontal [9,10]. La unión de RANK con su ligando puede transmitir una señal en forma bidireccional que logra activar a los osteoclastos y a los osteoblastos por medio de una cascada de señalización de los receptores asociados al TNF, como lo son el NF- κ B y la proteína c-Fos [10,11]. Debido a que en pacientes con PA y PAC está reportada una alta expresión de RANKL en tejido, diversos estudios se han enfocado en dilucidar el papel de la resorción ósea mediada

por RANKL, así como su intervención en la promoción de supervivencia y activación de los osteoclastos [10–12].

Como toda enfermedad que conlleva un involucro de tipo inflamatorio, la presencia de factores genéticos puede afectar la respuesta que presenta el hospedero. Visto de esta manera, varios estudios epidemiológicos genéticos han logrado demostrar la asociación de ciertos genes con la patogénesis de la PA [13]. Aquí, el enfoque principal han sido los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), que se definen como la variación en la posición de una base nitrogenada única en la secuencia de ADN que afecta a más del 1% de la población. Los SNP pueden conllevar un efecto en la regulación de la proteína, la actividad de esta o en su producción [14]. Por ello, pueden fungir como biomarcadores genéticos, típicamente para detectar susceptibilidad genética ante una cierta enfermedad [14].

La importancia de los polimorfismos radica en la información clave que aportan a la comprensión de una enfermedad, principalmente en cuanto a la predisposición genética resultante; si bien existen SNP en los genes que codifican para RANKL que confieren un cierto grado de protección o algún tipo de efecto en la transcripción o expresión de la proteína, otros se han asociado con una mayor incidencia de la PA [15,16]. De los diversos SNP para RANKL, la variante rs9594738 (C>T), ubicada en una región intrónica del cromosoma 13, se ha asociado con un riesgo disminuido de PA en presencia del alelo menor (T) [13,15,17]. En este sentido, un estudio llevado a cabo en población brasileña reportó que los sujetos portadores del alelo T de la variante rs9594738 tenían una menor probabilidad de padecer PA persistente [15]. Otros estudios han reportado que la expresión del alelo menor (T) en pacientes con osteoporosis se asocia de forma positiva con la densidad mineral ósea, es decir, que los portadores del alelo polimórfico presentan menor frecuencia de fracturas o resorción ósea [17–19]. Por otro lado, la variante rs9594738 con el genotipo TT se ha asociado con un incremento en la expresión de RANKL en fibroblastos de la unión periodontal [13,20]. De acuerdo con la evidencia, el genotipo homocigoto TT capaz de estar presente en la variante rs9594738 de RANKL podría, entonces, originar un proceso distrófico en el periodonto [20].

En México aún no se cuentan con estudios de

asociación genética entre la variante polimórfica y la susceptibilidad de la PAC, mucho menos en población del occidente de México. Por lo que continúa siendo un área de oportunidad para desarrollarse, en aras de encauzar los esfuerzos de la comunidad científica hacia el tratamiento personalizado de esta enfermedad bucal común.

Métodos

Se genotificaron a 151 pacientes con PAC y 148 controles clínicamente sanos (CCS), procedentes del occidente de México que acudieron al servicio de Endodoncia (posgrado) de las Clínicas Odontológicas Integrales de la Universidad de Guadalajara. La frecuencia del alelo menor (MAF, por sus siglas en inglés) reportada para población latinoamericana en la base de datos de *1000Genomes* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs9594738>) es de 41.17%, y fue utilizada como referencia para esta investigación ya que este SNP no había sido estudiado en población mexicana.

La pureza y la concentración de las muestras de ADN genómico del biobanco se establecieron con una relación entre 1.7 y 2.0 (aceptable) de absorbancia 260/280 nm medida con espectrofotometría. La concentración final de las muestras resultó entre 2 y 20 ng/μL. Para la determinación del polimorfismo rs9594738 se emplearon sondas TaqMan (Cat. 4351379, *Applied Biosystems*) con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés). Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas; el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se obtuvo mediante el *software* SNPStats [21] en los CCS; se hizo un análisis de distribución para comparar las frecuencias genotípicas y alélicas con la prueba Ji-cuadrada (X^2); y se estimó la medida de asociación de razón de momios (*Odds Ratio* [OR]). El nivel de significancia estadístico fue de un alfa del 5% ($p < 0.05$).

Resultados

De acuerdo con el análisis del EHW, los CCS se encuentran en equilibrio (Tabla 1). Lo que implica la ausencia de alteraciones alélicas y genotípicas a lo largo del tiempo en la población de estudio. La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas para la variante rs9594738 C>T de RANKL en población del occidente de México se muestra en la Tabla 2. Las frecuencias genotípicas y alélicas no

mostraron diferencias significativas entre el grupo de PAC y los CCS. Las frecuencias del genotipo TT (homocigoto polimórfico, 46.4%) en pacientes con PAC fue mayor que en los CCS (38.5%), mientras que el genotipo CT fue menor en los pacientes con PAC (38.4%) que en los CCS (45.3%). A pesar de no encontrar asociación del genotipo TT con PAC, resultaría importante evaluar en futuros estudios la expresión de RANKL en población mexicana con PAC por medio de ARN mensajero (ARNm). Esto en base a investigaciones como la de Küchler *et al*, quienes reportaron que el genotipo TT de la variante rs9594738 se relacionó con una mayor expresión de RANK, asociado a su vez con un proceso de resorción ósea acentuado [15].

En nuestro estudio, la frecuencia del alelo T

fue menor en pacientes con PAC (53.6%) en comparación con los CCS (61.5%), sin ser estadísticamente significativo; en contraste con un estudio de población brasileña, donde se reportó una asociación entre el alelo polimórfico con un menor riesgo de PA [15].

La frecuencia del alelo T en CCS y PAC resultó mayor que la reportada en el proyecto de *1000Genomes* para población de Los Ángeles (EUA) con ascendencia mexicana (T= 35.9%) y para la población latinoamericana (T= 41.17%); pero coincide con la reportada para población europea, en las que el alelo T es más frecuente (T= 56%) [13, 17]. Lo anterior puede explicarse debido a una mayor penetrancia del alelo T en la población de mestizos del occidente de México.

Tabla 1. Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para la variante rs9594738 C>T de RANKL

Genotipo	Valores observados	Valores esperados	p
CC	24	22	0.6 ^a
CT	67	70	
TT	57	55	
Total	148	147	

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confianza al 95%. ^aPrueba Ji-cuadrada.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas para la variante rs9594738 C>T de RANKL

Frecuencias genotípicas	PAC n (%)	CCS n (%)	OR	IC 95%	p
CC	23 (15.2%)	24 (16.2%)	---	1.00	0.37 ^a
CT	58 (38.4%)	67 (45.3%)	0.70	0.43 – 1.16	
TT	70 (46.4%)	57 (38.5%)	0.78	0.40 – 1.53	
Frecuencias alélicas					
C	70 (46.4%)	57 (38.5%)	---	1.00	0.17 ^a
T	81 (53.6%)	91 (61.5%)	0.72	0.46 – 1.15	

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confianza al 95%. ^aPrueba Ji-cuadrada.

Conclusiones

El presente proyecto tuvo como objetivo evaluar la asociación de la variante polimórfica rs9594738 C>T en el gen de RANKL en pacientes con PAC. Los resultados del grupo de estudio (PAC)

y de los CCS no demostraron una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo y la susceptibilidad de la enfermedad. En cuanto a los hallazgos citados previamente que sugieren una

importancia clínica del genotipo de la variante rs9594738 C>T en RANKL, ya sea homocigoto polimórfico (variante distrófica) o heterocigoto (variante protectora), el IC del 95% de la razón de momios obtenido para la presencia del alelo menor fue de 0.46 a 1.15 ($p=0.17$). Esto imposibilita establecer una asociación, directa o inversa, entre la frecuencia del alelo T y la incidencia de PAC. Por lo tanto, tomando como base este estudio, la variante polimórfica rs9594738 no puede ser considerada un marcador genético de susceptibilidad para pacientes con PAC del occidente de México.

Es debido señalar que una de las limitaciones principales del estudio fue el tamaño de muestra. Por lo que se recomienda considerar una (n) mayor para próximos estudios enfocados en esta línea de investigación.

Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con los lineamientos de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación, Investigación y Bioseguridad del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (número de aprobación CI/01515).

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Campos-Pérez Wendy Yareni y la Dra. Martínez-López Erika por las facilidades otorgadas para el uso del Espectrofotómetro ThermoScientific μ Drop Duo Plates, ubicado en el Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional (INNUGET), Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

Conflicto de intereses

Los autores han declarado explícitamente que no existen conflictos de intereses en relación con este artículo.

Financiamiento

Este proyecto fue financiado con el Programa de Apoyo a la Mejora en las Condiciones de Producción de los Miembros del SNI y SNCA-PROSNI 2023 otorgado a DCSC.

Referencias bibliográficas

- Figdor D. Apical periodontitis: A very prevalent problem. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):651–2.
- Morales-Ruiz P, Moreno-Barrera A, Ribas-Pérez D, Rodríguez-Menacho D, Flores-Fraile J, Gómez-Salgado J, et al. Periodontal health of a low socioeconomic level population in Yucatan (Mexico): A cross-sectional study. *Medicine.* 2023 Nov 10;102(45):e35748.
- Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. Vol. 40, *Journal of Endodontics.* 2014. p. 155–63.
- Al-Abdulla N, Bakhsh A, Mannocci F, Proctor G, Moyes D, Niazi SA. Successful endodontic treatment reduces serum levels of cardiovascular disease risk biomarkers—high-sensitivity C-reactive protein, asymmetric dimethylarginine, and matrix metalloproteinase-2. *Int Endod J.* 2023 Dec 1;56(12):1499–516.
- Niazi SA, Bakhsh A. Association between Endodontic Infection, Its Treatment and Systemic Health: A Narrative Review. Vol. 58, *Medicina (Lithuania).* MDPI; 2022.
- Teodorescu AC, Martu I, Teslaru S, Kappenberg-Nitescu DC, Goriuc A, Luchian I, et al. Assessment of Salivary Levels of RANKL and OPG in Aggressive versus Chronic Periodontitis. *J Immunol Res.* 2019;2019.
- Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. Vol. 77, *Acta Odontologica Scandinavica.* Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 173–80.
- Yun Kong Y, Feige U, Sarosi L, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. 1999;
- Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: Where does RANKL Come from? Vol. 2014, *BioMed Research International.* Hindawi Publishing Corporation; 2014.
- Tsukasaki M. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. Vol. 39, *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* Springer Japan; 2021. p. 82–90.
- Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. Vol. 39, *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* Springer Japan; 2021. p. 2–11.
- Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MPA, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. Vol. 2, *Journal of Oral Microbiology.* 2010.
- Küchler EC, Mazzi-Chaves JF, Antunes LS, Kirschneck C, Baratto-Filho F, Sousa-Neto MD. Current trends of genetics in apical periodontitis research. Vol. 32, *Brazilian Oral Research.* Sociedade Brasileira de Hematologia e

- Hemoterapia; 2018. p. 126–32.
14. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 8va ed. Elsevier; 2015.
 15. Ferreira Petean IB, Calvano Küchler E, Vilarinho Soares IM, Bezerra Segato RA, Bezerra da Silva LA, Alves Antunes LA, et al. Genetic polymorphisms influence gene expression of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. *Odontology*. 2020 Jul 1;108(3):493–502.
 16. Kakhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Arch Oral Biol*. 2013 May;58(5):530–6.
 17. Arid J, Xavier TA, da Silva RAB, De Rossi A, da Silva LAB, de Queiroz AM, et al. RANKL is associated with persistent primary teeth and delayed permanent tooth emergence. *Int J Paediatr Dent*. 2019 May 1;29(3):294–300.
 18. Zhang YP, Liu YZ, Guo Y, Liu XG, Xu XH, Guo YF, et al. Pathway-based association analyses identified TRAIL pathway for osteoporotic fractures. *PLoS One*. 2011;6(7).
 19. Paternoster L, Lorentzon M, Vandenput L, Karlsson MK, Ljunggren Ö, Kindmark A, et al. Genome-wide association meta-analysis of cortical bone mineral density unravels allelic heterogeneity at the RANKL locus and potential Pleiotropic effects on bone. *PLoS Genet*. 2010 Nov;6(11).
 20. Garmash, O. Single-nucleotide polymorphisms of the ESR1 [rs2234693], IL-1b [rs1143627], RANKL [rs9594738] and [rs9594759] genes as possible risk markers for various variants of the course of periodontal disease in patients born macrosomic. *Ukrainian Dental Almanac*. 2020;(1): 5-18. doi: 10.31718/2409-0255.1.2020.01
 21. Petean IBF, Küchler EC, Soares IMV, Segato RAB, Silva LAB da, Antunes LAA, et al. Genetic Polymorphisms in RANK and RANKL are Associated with Persistent Apical Periodontitis. *J Endod*. 2019 May 1;45(5):526–31.