UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Tesis

"VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN *AMY1*, CODIFICANTE PARA LA ALFA-AMILASA SALIVAL, Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE CARIES DENTAL"

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ciencias en

Biomedicina

Presenta:
M. en C. Rubi Mauricio Castillo

Dirigido por:
Director: Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz
Co-directora: Dra. en C. Eva Olivia Vázquez Martínez

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz
Presidente

Dra. en C. Eva Olivia Vázquez Martínez
Secretaria

Dr. en C. Pablo García Solís
Vocal

Dr. en C. Nicolás Camacho Calderón
Suplente

Dr. en C. Rubén Abraham Domínguez Pérez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario, septiembre 2026
México

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

RESUMEN

Objetivo: Establecer la posible relación entre el número total de caries (TC) y la gravedad de las caries (CS) con el número de copias del gen *AMY1* (AMY1GCN).
Materiales y métodos: Se realizó un estudio observacional, transversal, poblacional y de asociación con 303 participantes. A cada participante se le realizó una anamnesis completa y una exploración estomatológica; además, se obtuvo sangre periférica para la extracción de ADN genómico (gDNA). El TC y la CS se determinaron, respectivamente, como el número de caries detectadas durante la exploración dental y el número de superficies dentales afectadas por caries; el AMY1GCN se determinó mediante qPCR. **Resultados:** Se observó una prevalencia elevada de caries (92,7 %); el TC y la CS fueron de 8 ± 10 y 10 ± 13 (mediana ± rango intercuartílico). Se registraron valores más altos de TC y CS en aquellos participantes con un AMY1GCN superior al valor medio (valores p de 0,02 y 0,01, respectivamente). Se halló una correlación positiva entre el TC y la CS con el *AMY1*GCN (valores r de 0,11 y 0,125; valores p de 0,03 y 0,01, respectivamente), así como una asociación entre el TC y la CS con el *AMY1*GCN (valores de OR de 1,5 y 1,6; valores p de 0,48 y 0,26, respectivamente).
Conclusión: El TC y la CS mostraron una relación positiva con el *AMY1*GCN.
Relevancia clínica: La caries dental presenta una alta prevalencia y una etiología multifactorial, habiéndose relacionado con un componente genético. De hecho, la enzima salival alfa-amilasa podría desempeñar un papel significativo en la susceptibilidad a la caries, dado que el gen que la codifica (*AMY1*) puede presentar variaciones en su número de copias. Esto puede considerarse un factor importante a nivel genético en el desarrollo de la caries.

Palabras clave: Número de copias del gen *AMY1*; variación en el número de copias; número total de caries; gravedad de las caries.

SUMMARY

Objective: To establish the possible relation between total caries (TC) and caries severity (CS) with the *AMY1* gene copy number (*AMY1*GCN). **Materials and methods:** This was an observational, cross-sectional, population-based, and association study with 303 participants. Each participant underwent a complete anamnesis and stomatological check-up, and peripheral blood was obtained to extract gDNA. TC and CS were determined as the number of caries at the dental exploration and the number of dental surfaces affected by caries, respectively, and *AMY1*GCN was determined by qPCR. **Results:** We found an elevated caries prevalence (92.7%); TC and CS were 8 ± 10 and 10 ± 13 (median ± IR). There were higher TC and CS in those participants with AMY1GCN above the mean value (0.02 and 0.01 p values, respectively). A positive correlation between TC and CS with *AMY1*GCN (0.11 and 0.125 r values, 0.03 and 0.01 p values, respectively) was found, in addition to an association between TC and CS with AMY1GCN (1.5 and 1.6 OR values, 0.48 and 0.26 p values, respectively).
Conclusion: TC and CS were positively related to the *AMY1*GCN.
Clinical relevance: Dental caries has a high prevalence and a multifactorial etiology and has been related to a genetic component. Indeed, the salivary enzyme alpha-amylase could play a significant role in caries susceptibility, considering that its codifying gene (*AMY1*) can show variation in its gene copy number. This can be considered an important factor for the development of caries at a genetic level.

Keywords: *AMY1* gene copy number; Total caries, Caries severity.

A mi director de tesis Dr. Juan Carlos Solís Sáinz, su brillantez intelectual es solo comparable con su enorme calidad humana, gracias por su apoyo incondicional. Su guía y su confianza fueron el pilar para culminar este proyecto, trabajar a su lado ha sido uno de los mayores honores en mi vida académica y personal, y siempre llevare con orgullo el haber aprendido de usted, su ejemplo cómo científico y persona me acompañará siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mi amado esposo Andres, por ser el mejor compañero de vida, todos mis logros son gracias a tu apoyo, tu paciencia y tu amor incondicional

A mis queridos hijos, que son mi mayor motivación para seguir adelante.

Gracias infinitas a mi director de tesis, Dr. Juan Carlos Solís Sáinz, su apoyo incondicional, disponibilidad, enseñanzas y guía fueron esenciales para hacer posible este trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Nicolás Camacho Calderón. Gracias de todo corazón por su enorme respaldo y por abogar por mí en cada momento necesario para hacer posible mi titulación. Su valiosa intervención y gestiones fueron determinantes para alcanzar esta meta. Este logro también se debe a su invaluable empeño y disposición.

Un reconocimiento a los integrantes de mi comité tutoral, Dra. Olivia Vázquez Martínez, Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez y Dr. Pablo García Solís, Agradezco sinceramente su disposición, su lectura atenta y las acertadas observaciones, que fueron fundamentales para enriquecer este proyecto con sus valiosas aportaciones.

Agradezco al programa de Ciencias en Biomedicina, a la Facultad de Medicina y a la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme un espacio de formación académica y profesional de excelencia. Asimismo, extiendo mi gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca de posgrado (734773) el cual fue fundamental para dedicarme de lleno a la realización de esta investigación.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Características generales de la población según su *AMY1* GNC…… 14

Figura 1 Diagrama de la interacción de factores genéticos y la caries…… 2

Figura 2 Estructura Gen *AMY1* ……. 6

Figura 3 Diagrama de flujo de inclusión de participantes en el estudio…….. 9

Figura 4 Ensayo TaqMan …….. 12

Figura 5 Distribución de número de copias *AMY1* en participantes …….. 15

Figura 6 Relación de caries total y gravedad con *AMY1* GNC…….…….... 16

Figura 7 Correlación de caries total y severidad con *AMY1* GNC…..……... 17

CONTENIDO

1. Antecedentes

1.1. Caries dental ……1
1.2. Saliva ……....3
1.3. Alfa amilasa salival …… 4
1.4. Variación de copias en el gen *AMY1*…….....……...5
1.5. Posible relación entre la alfa-amilasa y caries ……...……...…7

2. Justificación …….……..……8

3. Hipótesis…….……..…….8

4. Objetivo general …….……....8
4.1. Objetivos específicos ……8

5. Metodología ……9
5.1. Sujetos ……..9
5.2. Diseño de estudio ……10
5.3. Anamnesis y exploración clínica oral ……10
5.4. Recolección y procesamiento de muestras ……..10
5.5. Análisis estadístico……13
5.6 Criterios de inclusión ……13
5.7. Criterios de exclusión …….....13
5.8. Criterios de eliminación ……13

6. Resultados .....……..…13

7. Discusión……..……..……17

8. Conclusión ……21

9. Anexos ……22

10. Referencias ……..……..30

1. ANTECEDENTES

1.1. Caries dental

La OMS define la lesión cariosa como un proceso patológico externo y localizado, que se presenta tras la erupción del diente y que supone un reblandecimiento de los tejidos duros, con lo cual da formación a la cavidad. En términos mundiales, entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y cerca del 100% de los adultos presentan caries dental en algún momento de su vida, a menudo con presencia de dolor o sensación de molestia (OMS, 2012). Según la OMS, las caries dentales se consideran la cuarta plaga mundial, después de los cánceres, las enfermedades cardiovasculares, y la infección por VIH (Ahmadi *et al.,* 2016).

La caries se considera una enfermedad compleja, crónica, multifactorial y una de las enfermedades más prevalentes y una de las afecciones más estudiadas y conocidas de la cavidad bucal (Opal *et al.,* 2015, Culp *et al.,* 2021). Es una enfermedad infecciosa y contagiosa que resulta de la desmineralización y destrucción de la estructura dental por bacterias que forman ácidos (Ahmadi *et al.,* 2016, Singh *et al.,* 2015).

La caries ocurre cuando las fases de acidificación superan las fases de alcalinización, lo que permite establecimiento de una microbiota más acidógena, menos alcalinogénica, que a su vez da como resultado valores de pH de placa más bajos con desmineralización del esmalte mejorada y prolongada (Burne *et al.,* 2000). Esta microbiota acidógena esta enriquecida por *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp*., que son capaces de fermentar rápidamente los carbohidratos de la dieta y reducir el pH en la medida en que cantidades significativas de desmineralización dental pueden ocurrir. Es así como, la pérdida del potencial de generación de álcalis se ha asociado también como un riesgo para desarrollar caries (Reyes *et al.,* 2014).

Los avances recientes en el campo de la biología molecular y las técnicas de análisis de secuencia de ADN permitieron determinar el significado de los factores

hereditarios de muchas enfermedades humanas comunes. Los estudios de mecanismos genéticos en la etiología de la caries abarcan, principalmente, 4 grupos principales de genes responsables de (1) el desarrollo del esmalte, (2) la formación y composición de la saliva, (3) las respuestas inmunológicas y (4) el metabolismo de los carbohidratos (Piekoszewska *et al*., 2017).

La caries parece concentrarse en grupos específicos de individuos. Este fenómeno se denomina polarización y su causa permanece oscura, lo que representa uno de los aspectos de la enfermedad epidemiológica en el que una parte de la población tiene más necesidad de tratamiento. Se han proporcionado pruebas de la resistencia de un individuo a caries a pesar de estar en una dieta altamente cariogénica. Esto sugiere que la susceptibilidad o resistencia a la caries podría ser el resultado de una o más influencias genotípicas, fenotípicas y ambientales **(Figura 1**; Opal *et al.,* 2015).

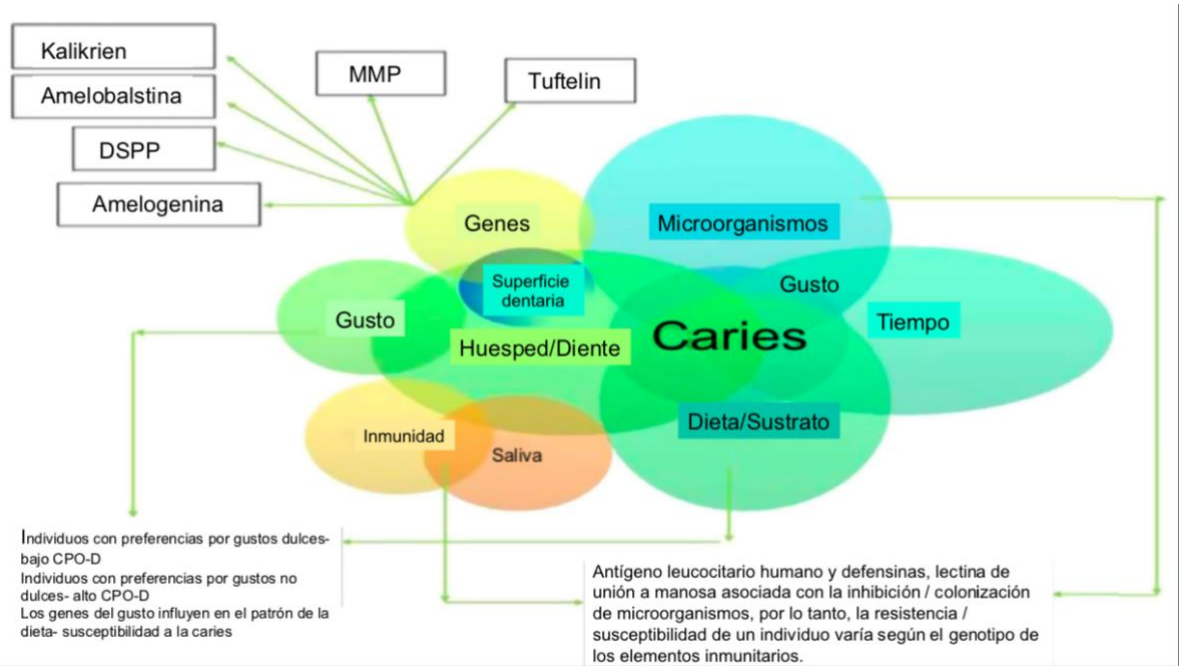


Figura 1. Diagrama de la interacción de factores genéticos. En este diagrama se pueden observar todos los factores que pudiesen influir en el desarrollo y establecimiento de la caries dental. Modificado de Opal *et al.,* 2015.

1.2. Saliva

La saliva tiene muchos roles cruciales en la promoción de la salud, incluida la protección de la cavidad bucal y la facilitación de la alimentación. Dentro de la boca, la saliva hidrata los tejidos de la mucosa, elimina los residuos celulares y alimentarios, amortigua el pH oral, lubrica la cavidad oral ayudando a la trituración y previniendo el desgaste dental, contribuye con la formación del bolo alimenticio, protege contra la desmineralización de los dientes, tiene actividad antimicrobiana, previene infecciones y cierra heridas mientras estimula la curación.

Hay tres pares de glándulas salivales principales (parótidas, submandibulares y sublinguales) responsables de la mayoría de los 500–1,500 mL de saliva que se produce normalmente cada día por un humano sano. La saliva es liberada por las células acinares y su secreción es regulada después de la estimulación del neurotransmisor por las ramas simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo (Santos *et al.,* 2012).

La saliva es un fluido biológico que representa todos los iones que generalmente se encuentran en los fluidos corporales y es capaz de amortiguar los ácidos que son esenciales para mantener los valores de pH en el ambiente oral. Asimismo, la saliva ha sido considerada como un potencial biomarcador de la caries dental. Los componentes salivales, como las proteínas y las enzimas (además de su función protectora), tienen funciones importantes a través de las diversas interacciones con bacterias orales, como las actividades antibacterianas, o que proporcionan receptores para la adhesión bacteriana (Ahmadi *et al.,* 2016).

El estudio de la saliva siempre ha sido un aspecto interesante, ya que la saliva representa todos los iones que suelen estar presentes en los fluidos corporales, el papel de la saliva en la protección de la caries se puede resumir en cuatro aspectos: eliminación, capacidad amortiguadora, equilibrio de la desmineralización o remineralización y acción antimicrobiana (Singh *et al.,* 2015).

El agua es el principal componente de la saliva (99%) tamponada con electrolitos. Un total de aproximadamente 2,000 proteínas constituyen el peptidoma salival, de las cuales aproximadamente 400–600 se derivan directamente de las glándulas salivales, la alfa-amilasa salival representa la principal enzima secretada por las glándulas salivales (Santos *et al.,* 2012). Es decir, la alfa-amilasa es la enzima más abundante que se encuentra en la saliva humana, sin embargo, a pesar de que se describió el papel protector de la saliva contra la caries, se ha informado que las concentraciones altas de alfa amilasa-salival se relacionan con causa de caries (Singh *et al.,* 2015).

1.3. Alfa-amilasa salival

La alfa-amilasa salival es un componente importante del proteoma salival. La proteína está codificada por el gen *AMY1* y se sintetiza y glicosila en las glándulas salivales. Se secreta en la cavidad oral bajo el control nervioso autónomo y contribuye a la digestión de los alimentos a través de la hidrólisis del almidón a glucosa y la maltosa. Su actividad varía significativamente entre individuos debido al número de copias de *AMY1*, el contenido de alfa-amilasa salival y el estado de glicosilación, y la regulación neural de la secreción de alfa-amilasa salival (Yang *et al.,* 2015).

Aunque los humanos presentan elevadas cantidades de alfa-amilasa salival, esta proteína ha sido identificada en la saliva de otras especies como herbívoros y omnívoros, excepto en especies estrictamente carnívoras. En los omnívoros existe una mayor presencia de proteínas, posiblemente debido a que los hábitos nutricionales influyen en su expresión (Boehlke *et al.,* 2015).

Por otro lado, la variación del número de copias genéticas (GCN) puede inducir cambios en la expresión fenotípica de un gen, como es el caso del gen *AMY1* (Fernández *et al.,* 2017), por lo cual se pudiera ver influenciada de alguna manera la proteína. Por lo tanto, a mayor número de copias, mayor cantidad de enzima.

La alfa-amilasa salival es responsable del inicio de la hidrólisis del almidón (Mejía *et al.,* 2015), representa la principal enzima secretada por las glándulas salivales, es una enzima que utiliza calcio como cofactor enzimático, que inicia la digestión del almidón en la cavidad oral. El almidón es un polímero de glucosa que consiste en dos estructuras primarias: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas con alfa-1,4 enlaces glicosídicos, que constituyen aproximadamente el 20-30% de la mayoría de los almidones. La amilopectina es un polímero altamente ramificado que consiste en enlaces alfa -1,4 y alfa -1,6. La alfa-amilasa salival cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos internos de alfa -1,4, produciendo una mezcla de maltosa, isomaltosa, pequeñas cantidades de glucosa y pequeñas cadenas lineales y ramificadas de oligosacáridos llamados dextrinas (Santos *et al.,* 2012).

1.4. Variación de copias en el gen *AMY1*

Durante los últimos años, se han identificado cientos de nuevas variaciones en las regiones repetitivas del ADN, lo que lleva a los investigadores a creer que las variaciones en el número de copias (GCN) cómo un componente tan importante de la diversidad genómica como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

El número promedio de copias del gen *AMY1* es mayor en las poblaciones que evolucionaron con dietas altas en almidón en comparación con las dietas bajas en almidón y es directamente proporcional al contenido de alfa-amilasa en la saliva (Santos *et al.,* 2012, Perry *et al*., 2007, Ooi e*t al* 2017). Aproximadamente el 20–35% de la variabilidad en la expresión de alfa-amilasa salival se puede atribuir a la variación en el número de copias de *AMY1* **(Figura 2)**. Los genes de amilasa humana forman un grupo en el cromosoma 1, que contiene los genes de la alfa-amilasa salival (*AMY1)* y pancreático (*AMY2*), los cuales varían en número de copias, en *AMY1* tiene un rango observado de 2–18 copias por persona y un promedio de 6 copias por persona (Pinho *et al*., 2018).

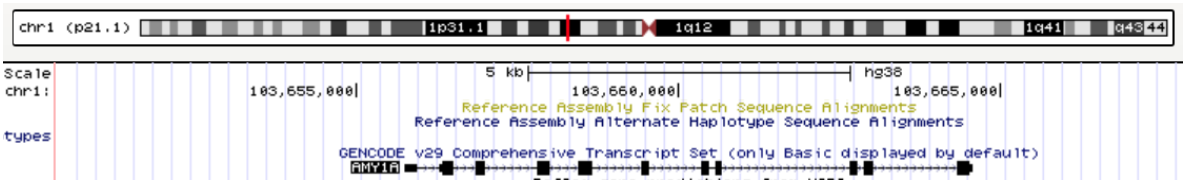


Figura 2. Gen *AMY1*, codificante para la alfa-amilasa salival. Locus: 1p21.1; 9,262 pb de longitud consiste en 11 exones, separados por 10 intrones. Codifica para una proteína de 511 aa, con un PM de 57.76 kDa. Tomado de https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.plgene=AMY1A.

Cada segmento duplicado del gen *AMY1* contiene las secuencias reguladoras necesarias para la expresión específica de la saliva y, por lo tanto, puede influir directamente en el ARN mensajero (ARNm) y en los niveles de expresión de proteínas. Se han observado altos números de copias de *AMY1* en poblaciones en las que los ancestros consumían dietas ricas en almidón; esto sugiere una selección direccional hacia una alfa-amilasa salival más alta para la digestión del almidón (Peyrot *et al*., 2016). De esta forma el número promedio de copias del gen *AMY1* es mayor en las poblaciones que evolucionaron con dietas altas en almidón en comparación con las dietas bajas en almidón (Santos *et al.,* 2012).

El término haplotipo consiste en una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Los haplotipos estructurales también sugieren la historia mutacional del locus *AMY1*. Los haplotipos *AMY1-odd* más comunes difieren en el número de copias de un casete duplicado en tándem que contiene dos genes *AMY1.* Estos haplotipos *AMY1-odd* (haplotipos AH1, AH3, AH5, AH7) se segregan en muchos de los mismos haplotipos de SNP. La frecuente recombinación homóloga no alélica, que involucra la matriz en tándem podría haber generado estas muchas formas estructurales (haplotipos AH1, AH3, AH5, AH7). En contraste, los haplotipos que contienen números pares de copias *AMY1* parecen segregarse en distintos fondos de haplotipos de SNP, lo que es consistente con el surgimiento de eventos mutacionales únicos que involucraron reordenamientos más complejos por un mecanismo de mutación más raro (Usher *et al.,* 2015).

Cómo ya se mencionó anteriormente, se han reportado en múltiples publicaciones que el número de copias (CNV) de *AMY1* se correlaciona positivamente con la cantidad y la actividad de la alfa-amilasa salival (León *et al.,* 2018). Sin embargo, el nivel de la alfa-amilasa salival no está determinado únicamente por las CNV del gen *AMY1*. Los SNP y los factores epigenéticos, como la metilación, también pueden influir en la actividad de la alfa-amilasa salival. Además, la eficiencia de transcripción o traducción puede diferir entre diferentes haplotipos (Choi *et al.,* 2015).

1.5. Posible relación entre la alfa-amilasa y caries

La digestión de los carbohidratos de tipo polisacáridos, constituye el sustrato principal de las bacterias cariogénicas, este, que como ya se mencionó anteriormente comienza con la enzima salival alfa-amilasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces α-1,4-glucosídicos de almidón (Heianza *et al.,* 2017)

Dicho lo anterior, es importante puntualizar estudios donde se habla de las relaciones entre los factores ya mencionados, Mandel y colaboradores encontraron que el CNV *AMY1* influyó significativamente en la concentración y la actividad de la alfa-amilasa salival, que para lo que es nuestro tema de interés, se esperaría con esto una mayor probabilidad de desarrollar caries dental.

Ahmadi y cols (2016) reportaron que valores de alfa-amilasa sérica fue significativamente mayor en los grupos activos de caries en comparación con los grupos sin caries (p= 0,001) para ambos sexos. Stangvaltaite y colaboradores (2021), reportaron una asociación entre CNV *AMY1* y una alta experiencia de caries, en una población de 193 adultos, sin embargo, concordamos con lo que ellos mismos sugieren, que se necesitan más estudios con poblaciones más grandes.

2. JUSTIFICACIÓN

Con este proyecto se buscó evaluar la actividad de la alfa-amilasa saliva y el número de copias del gen *AMY1*, y el efecto de esta sobre la caries dental. Con el fin de ver la interacción genética y las condiciones propias de la cavidad bucal.

Tradicionalmente la caries se ha visualizado como una enfermedad generada por el mal hábito y prácticas de higiene oral. Con este trabajo se pretende ampliar el panorama en el entendimiento de una de las enfermedades más prevalentes, como lo es la caries. Estudiando la enfermedad desde un enfoque genético relacionado con el número de copias del gen *AMY1* como un factor predisponente a la aparición de caries dental y no solo relacionado a los malos hábitos de cuidado de la salud bucal.

3. HIPÓTESIS

Existe una relación positiva entre el número de copias del gen *AMY1* con la prevalencia de caries dental.

4. OBJETIVO GENERAL

Establecer la posible relación entre el número de copias del gen *AMY1*, con la prevalencia de caries, como consecuencia de un incremento en la actividad de la proteína.

4.1. Objetivos específicos:

1. Identificar del número de copias del gen *AMY1* en la población estudiada.
2. Establecer la prevalencia de caries en la población de estudio.
3. Establecer la relación entre la prevalencia de caries con el número de copias del gen *AMY1*

5. METODOLOGÍA

5.1. Sujetos

La n calculada fue de 300 sujetos, según la fórmula de cálculo para estudios transversales (OpenEpi; Kelsey et al.) con los siguientes parámetros:

- Nivel de significancia: 95%
- Poder calculado: 80%
- No expuestos con el resultado: 25%
- Expuestos con el resultado: 40%
- OR (mínimo a detectar): 2.0

Se evaluaron un total de 330 sujetos, que al aplicar los criterios correspondientes de inclusión, exclusión y eliminación, obtuvimos una muestra final fue de 303 sujetos **(Figura 3).**

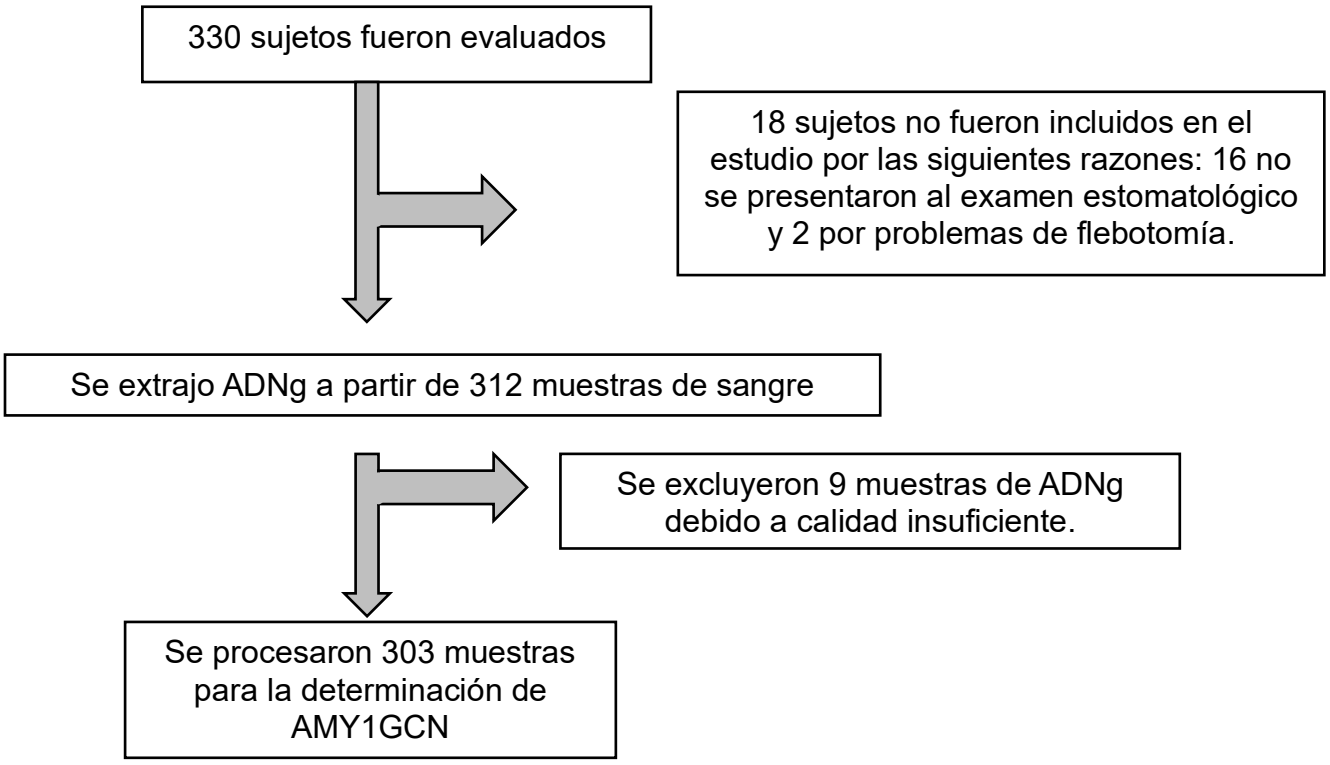


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de inclusión de los participantes en el estudio.

5.2. Diseño del estudio

Se trato de un estudio observacional, transversal, de tipo poblacional y de asociación. Esto con el fin de analizar el estado de salud bucal en cualquiera de sus estadios, lo cual nos permitirá tener una asociación más objetiva y exacta sobre la posible relación entre el estado de salud bucal con el número de copias del gen *AMY1.*

5.3. Anamnesis y exploración clínica oral

Se realizó a cada uno de los sujetos una historia clínica completa, la cual comprendió de un cuestionario sobre salud en general, antecedentes heredofamiliares, antecedentes no patológicos, así como una minuciosa revisión odontológica que consistió en llenado de odontograma e índice CPO-D; del cual se obtendrá el historial de caries (O.D. perdidos por caries, restos radiculares, caries activa, caries incipiente, caries recidiva y restauraciones por caries), todo en formato impreso, realizado con estuche de exploración (1x4) estéril (ver Anexo 6.2).

5.4. Recolección y procesamiento de muestras

La toma de sangre se realizó a partir de las 7:00 a.m. con el sujeto en ayunas, se tomaron muestras de sangre venosa de la fosa cubital. Se recolectaron en tubos *Vacutainer*^{TM}, de tapa lila y amarilla cada uno de 5 a 6 mL aproximadamente. Los tubos de tapa amarilla se reservaron para la obtención de la química sanguínea, la cual incluyo la medición de glucosa, urea, creatinina, insulina y perfil lipídico. Estas mediciones se realizaron por medio del A-15 en la unidad de análisis clínicos de la Facultad de Medicina, utilizando los siguientes reactivos: 12503 (glucosa), 12516 (urea), 12502 (creatinina), 12557 (colesterol HDL directo), 12585 (colesterol LDL directo) y 12528 (triglicéridos) (BioSystems Buenos Aires; Argentina). La determinación de insulina por medio de Insulin AccuBind ELISA Kits (Num. Cat. 2425-300A Monobind Inc.; Lake Forest, CA, U.S.A.).

Para la estimación y cuantificación de las variantes de números de copias del gen *AMY1* se utilizaron tubos de tapa lila para la recolección de las muestras de sangre total, por medio de PCR en tiempo real con sondas TaqMan.

Se procedió a la extracción de DNA y a la realización de los ensayos TaqMan Copy Number (Num. Cat. 4400292 Applied Biosystem Thermo Fisher Scientific U.S.A.) los cuales ofrecen un enfoque específico que combina alta precisión, especificidad, facilidad de uso y rendimiento de la muestra, para validar cambios en el número de copias. Los ensayos TaqMan Copy Number consisten en un experimento dúplex que utiliza un ensayo objetivo marcado con FAM y un ensayo de referencia marcado con VIC en el mismo pocillo para cuantificar pequeños cambios de pliegue. El ensayo de referencia se dirige a un gen de número de copia conocido y estable. Por ejemplo, RNase P se usa a menudo para muestras humanas, ya que se ha demostrado que está presente y es estable a 2 copias. Para determinar el número de copias, se realiza un análisis de cuantificación relativa entre la muestra desconocida y una muestra de calibrador (uno en el que se conoce el número de copias del gen objetivo). La muestra se combina con ambos ensayos, mezcla maestra y luego se ejecuta por cuadruplicado en el instrumento de PCR en tiempo real (http://www.thermofisher.com/ask).

En la **Figura 4**, se muestra un ejemplo en el que el gen objetivo está en el cromosoma X. En una muestra masculina, deberíamos encontrar un número de copia de 1 para el objetivo. Se determina un umbral de ciclo restado basal o dCt entre los dos ensayos. En nuestro ejemplo, la muestra desconocida tiene un dCt de1.5 Y el calibrador un dCt de 0.5. A continuación se resta el dCt del calibrador del dCt de lo desconocido. Así convertimos este valor a una cantidad relativa, luego multiplique la cantidad relativa o RQ por el número de copia del calibrador, que en este caso son 2 con RnaseP. Thermo Fisher Scientific ofrece un programa de software gratuito para realizar todo el análisis de los datos exportados desde un instrumento compatible. El software proporciona estadísticas para ayudar a evaluar

la confianza de los datos y puede calcular el número de copias incluso cuando no se usa una muestra de calibrador (http://www.thermofisher.com/ask).

Las estimación y cuantificación de las variantes de números de copias del gen *AMY1* se realizó en colaboración con el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

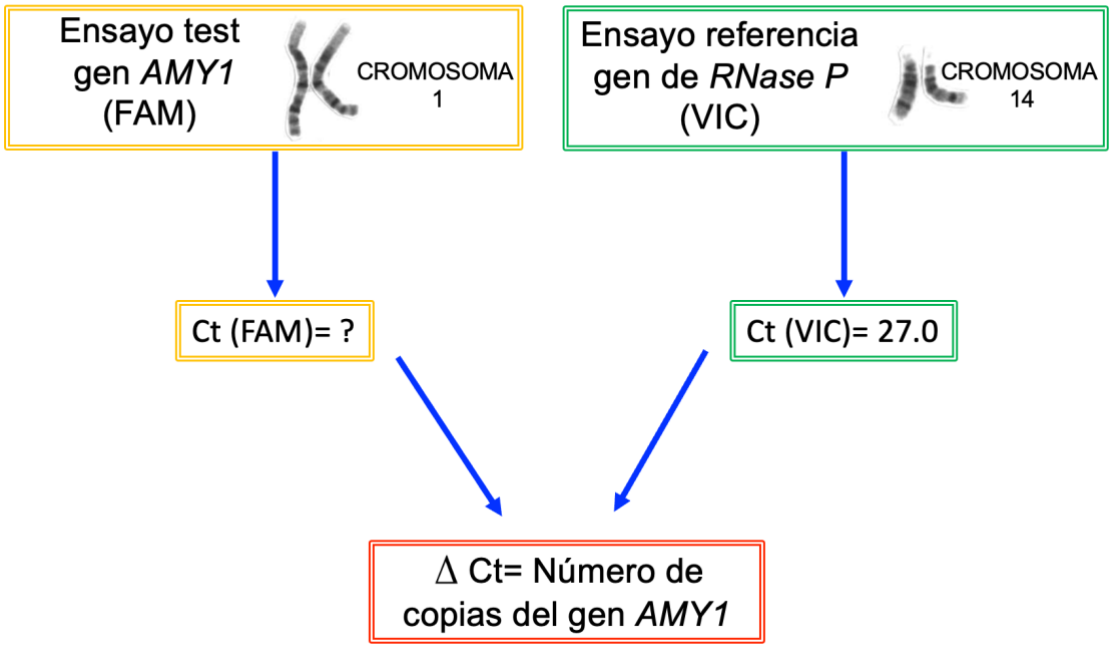


Figura 4. Ensayo TaqMan. Este ensayo cuenta con un control interno, así como con un calibrador, por lo cual ofrece alta precisión y especificidad para la identificación de variantes de copias. Tomado de http://www.thermofisher.com/ask.

De igual forma, se realizará bioimpedancia, por medio del *Body Composition Analyzer* TANITA, modelo SC3317101 y medición de cintura, así como toma de presión arterial en ambos brazos, con el fin de obtener la mayor información posible acerca de su salud.

5.5 Análisis estadísticos

La normalidad en la distribución de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para todas las variables analizadas. Se realizaron correlaciones de Spearman de una cola y se utilizaron pruebas de Mann-Whitney para evaluar la diferencia entre medianas; además, se utilizaron pruebas de chi-cuadrado para verificar la hipótesis. El programa estadístico empleado para los análisis fue IBM SPSS Statistics para Windows, versión 25 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.).

5.6. Criterios de inclusión

-Sujetos adultos que hayan firmado el consentimiento informado.

-Sujetos adultos que cumplan con todo el estudio completo.

5.7. Criterios de exclusión

- Sujetos con presencia de ≤19 O.D.

- Sujetos que presenten alguna enfermedad sistémica o local que afecte la secreción de glándulas salivales, o bien, que modifique la microbiota oral.

5.8. Criterios de eliminación

- Muestras que no se puedan procesar.

- Sujetos de los que no se tenga la historia clínica y/o evaluaciones incompletas.

- Sujetos que deseen abandonar el estudio.

6. RESULTADOS

6.1 Población de estudio

Las características generales de la población estudiada, así como la prevalencia y severidad de caries, se muestran en la **Tabla 1**.

Se encontró una elevada prevalencia de caries en los participantes del 92,7%.

VARIABLE		GLOBAL	*AMY1*GCN		P VALOR
			≤7	≥8	
Sexo	Masculino (n)	181	114	67	0.43 [a]
	Femenino (n)	122	78	44	0.48 [a]
Edad (años; mediana±IR)		27±14	27±14	28±15	0.11 [b]
Total caries (mediana±IR)		***8±10***	***7±21***	***10±11***	***0.022*** [b]
Severidad caries (mediana±IR)		***10±13***	***9±11.7***	***12±14***	***0.017*** [b]
GNC *AMY1* (mean)		7.5	-	-	-
Placa (%; mediana±IR)		12±17	12±16	10±21	0.25 [b]
Presencia de cálculo (mediana±IR)		226	106	120	0.23 [a]
Clasificación de cálculo (n)	0	77	52	25	-
	≤1/3 = 1	63	39	24	0.3 [a,c]
	≥1/3-≤2/3 = 2	75	43	32	0.12 [a,c]
	≥2/3 = 3	88	58	30	0.47 [a,c]

Tabla 1. Características generales de la población estudiada y su comparación según su *AMY1* GCN.

Donde: IR, rango intercuartil; [a], determinada mediante una prueba de Chi-cuadrado; [b], determinado mediante una prueba de Mann-Whitney; los valores de [c], p se obtuvieron comparando cada clasificación de cálculo con el valor 0. Negrita y cursiva

representan valores estadísticamente diferentes.

6.2 *AMY1* GCN.

La distribución de *AMY1* GCN en los sujetos estudiados 117 osciló entre 2 y 37 copias diploides, con un valor medio de 7.5 (**Figura 5).**

6.3 Caries y *AMY1* GCN.

Al analizar TC y SC, se encontraron valores significativamente más altos para ambas variables en aquellos participantes con un valor de *AMY1 GCN* superior a 8 (valores de p de 0.022 y 0.017, para TC y SC respectivamente; **Figura 6 A y B**). Además, se observó una correlación positiva significativa entre TC y SC con GNC *AMY1* (valores de r de 0.11 y 0.125, valores de p de 0.03 y 0.01, para TC y SC, respectivamente; **Figura 7 A y B**).

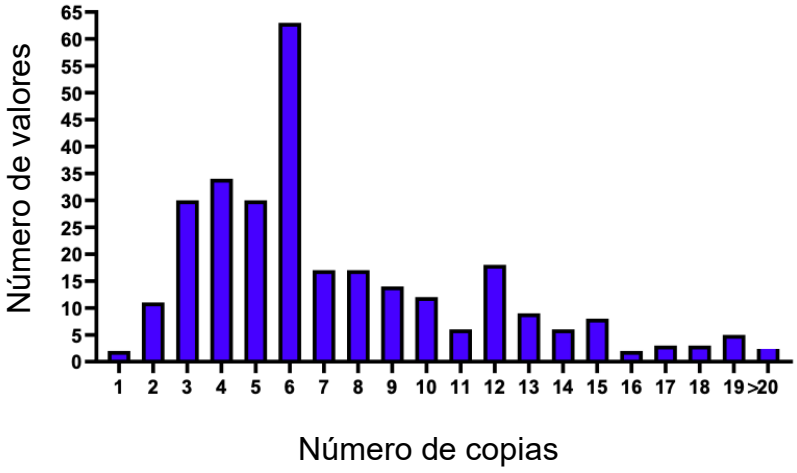


Figura 5. Distribución del número de copias en los 303 sujetos participantes del estudio.

Bin Center	# valores
1	3
2	12
3	30
4	35
5	29
6	65
7	18
8	16
9	15
10	15
11	7
12	18
13	11
14	7
15	8
16	2
17	2
18	3
19	3
>20	4

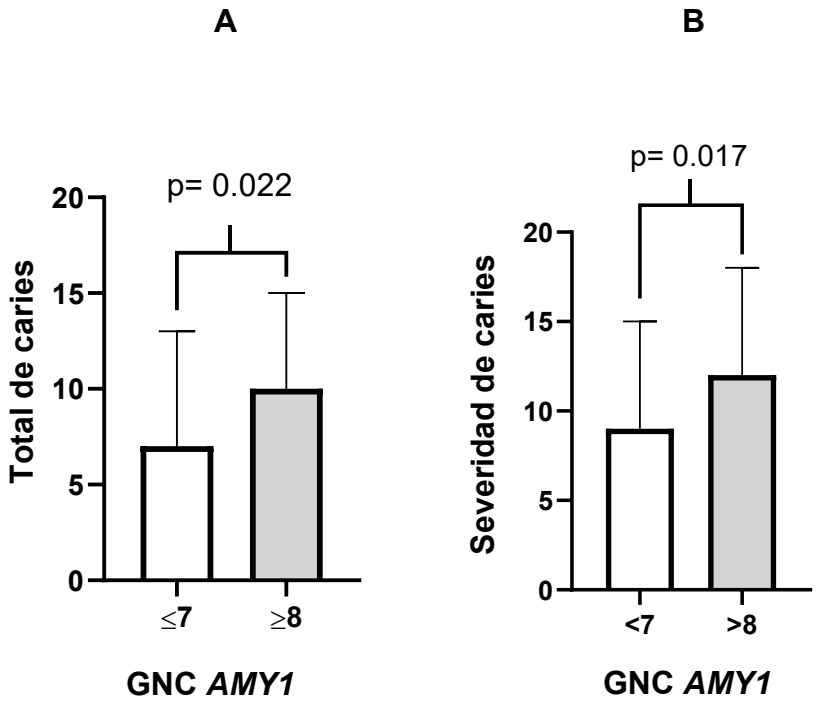


Figura 6. Relación de caries total (A) y gravedad de caries (B) con *AMY1* GCN. Los valores de *AMY1* GCN se dividieron entre los que están por encima y por debajo del número medio. Se analizaron 303 participantes y se encontró un valor de p de 0.022 y 0.017 para ambas variables. Se empleó una prueba de Mann-Whitney, las barras representan valores medios ± SE.

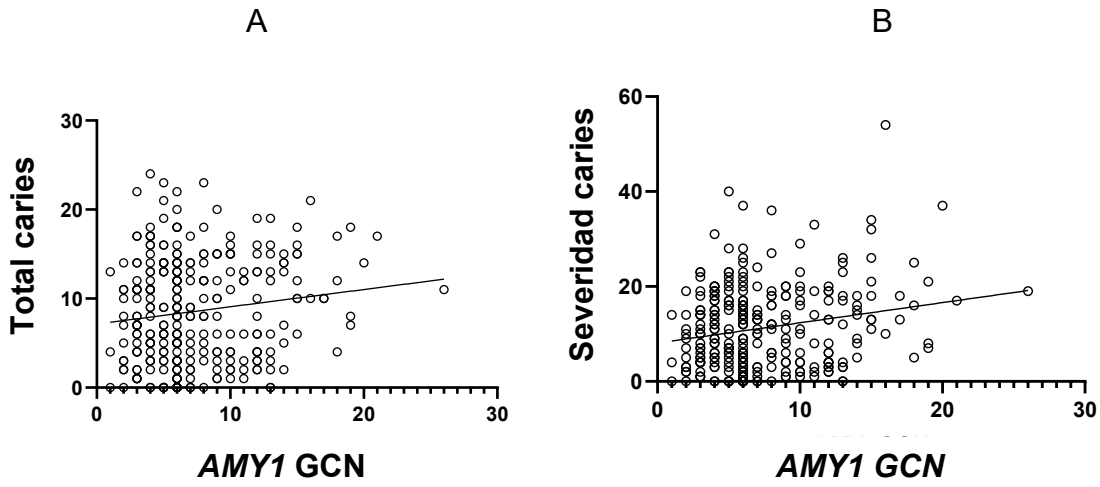


Figura 7. Correlaciones de caries total (A) y severidad de caries (B) con *AMY1* GCN. Se emplearon correlaciones de Spearman y se encontraron valores de r de 0.11 y 0.125 y valores de p de 0.03 y 0.01 para la caries total y la gravedad de la caries; respectivamente.

7. DISCUSIÓN

En este estudio, se encontró una relación positiva significativa entre la caries total y la gravedad de la caries con *AMY1* GCN. La caries dental en general es la afección más estudiada en la cavidad bucal. Debido a su naturaleza multifactorial, ha sido un desafío asignar un peso preciso a un factor etiológico específico (Opal *et al.,* 2015, Guo *et al.,* 2013, Piekoszewska-Ziętek *et al.*, 2017, Parsaie et al., 2022). Tradicionalmente, se ha reconocido que la falta de higiene dental es el principal factor que contribuye a la caries dental; sin embargo, la identificación de los factores predisponentes ha evolucionado hacia relaciones más complejas, donde tanto factores genéticos como ambientales contribuyen a su desarrollo (Kor *et al.,* 2017).

La asociación entre la alfa-amilasa salival y la caries dental ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, esta relación ha sido controvertida. En varias publicaciones se ha informado que no hubo diferencias significativas entre la presencia de caries y la película in situ y las actividades de alfa-amilasa salival en estudios realizados en poblaciones de niños y adultos (Prabhakar *et al.,* 2008, de Farias *et al.,* 2003, Grychtol *et al.,* 2015, Kirsch *et al.,* 2017). Curiosamente, también se ha informado de una correlación negativa entre la actividad de la alfa-amilasa salival y la presencia de caries dental en poblaciones de la primera infancia, concluyendo que una enzima baja está relacionada con la caries dental (Parsaie *et al.,* 2022, Borghi *et al.,* 2017, Mojarad *et al.,* 2013). Por otro lado, y de acuerdo con nuestros resultados, existen estudios donde se encontró una correlación positiva significativa entre la actividad de la alfa-amilasa salival y la caries dental en niños y adultos (Ahmadi-Motamayel *et al.,* 2016, Singh *et al.,* 2015, Balekjian et al., 1975). Sin embargo, hay varios factores que podrían explicar estas discrepancias, como el tipo de muestra empleada (película in situ, saliva o sangre), método de obtención (saliva estimulada o no estimulada), diferentes condiciones ambientales y diferentes tamaños de muestra y edades de los participantes. Además, existen otros factores que potencialmente podrían modificar la actividad de la enzima y explicar al menos en parte las discrepancias anteriores. También se sabe que la alfa-amilasa salival tiene dos formas, la proteína glicosilada y la no glicosilada, y que la proporción de residuos N-glicosilados puede afectar la secreción, estabilidad y actividad de la enzima (Yang *et al.,* 2015). Además, se sabe que factores epigenéticos, el grado de metilación, los polimorfismos de un solo nucleótido, el estrés emocional o incluso hábitos como fumar podrían disminuir notablemente la actividad de la alfa-amilasa salival (Boehlke *et al., 2015*, Choi *et al.,* 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que la cantidad y actividad de la alfa-amilasa tanto en saliva como en sangre se correlacionan positivamente con su *AMY1* GCN (Mandel *et al.,* 2010, Yang *et al.,* 2015, Parsaie *et al.,* 2022, Carpenter *et al.,* 2017). Sin embargo, la información disponible sobre la relación entre caries dental y *AMY1* GCN es escasa. Hasta donde sabemos, sólo hay un estudio (Stangvaltaite-Mouhat

et al., 2021) que informa esta asociación en una población adulta con 193 participantes. De manera similar a nuestros resultados, estos autores encontraron una asociación entre *AMY1* GCN y la experiencia de caries, pero solo en superficies dentales lisas. En este estudio se encontraron valores de OR más altos para los números más bajos de GNC *AMY1* y valores de OR más bajos para valores de *AMY1* GCN más altos, 4–5 (OR 13,3; IC del 95 %: 2,1–86,3), 6–9 (OR 7,0; IC del 95 %: 1,4–34,1) y 10–16 (OR 5,8; IC del 95 %: 1,2–32,2).
En comparación con los participantes que presentaban un número de copias (NC) de AMY1 de 2–3, se observó una mayor probabilidad de un índice D3MFS en superficies lisas > 14 en aquellos participantes con un NC de 4–5 (OR 13,3; IC del 95 %: 2,1–86,3), 6–9 (OR 7,0; IC del 95 %: 1,4–34,1) y 10–16 (OR 5,8; IC del 95 %: 1,2–32,2).

Estas observaciones son contrarias a la correlación positiva encontrada en este estudio entre TC y SC con *AMY1* GCN. Sin embargo, estas discrepancias podrían atribuirse a diferencias ambientales y antecedentes genéticos entre ambas poblaciones. En este estudio también se incluyó una evaluación del cálculo y la placa dental, considerando que se ha informado que la alfa-amilasa salival se encuentra en la placa dental y se une a una proteína de unión a amilasa de los estreptococos (Scannapieco *et al.,* 1993, Nikitkova *et al.,* 2012). Al proporcionar a las bacterias una fuente de nutrientes, esta interacción podría contribuir a la formación de placa y al inicio de la colonización de la superficie dental (Haase *et al.,* 2017, Lahiri *et al.,* 2021). Sin embargo, en este estudio no se encontró correlación entre la presencia de placa y calculo dental con *AMY1* GCN. Aunque se ha informado que la alfa-amilasa se une a varias especies de estreptococos orales, se ha descrito que la enzima no se une a *Streptococcus mutans*, un patógeno clave en la caries que presenta diversos factores de virulencia. (Lahiri *et al.,* 2021, Jing *et al.,* 2017).

Esto podría explicar, al menos en parte, la falta de correlación entre la placa y el cálculo dental con *AMY1* GCN en este estudio. Sin embargo, se debe considerar

que muchos otros factores podrían interferir en el establecimiento y desarrollo de la caries dental. Entre estos factores, la dieta es relevante, y varios estudios han discutido su relación con la amilasa salival a nivel evolutivo. Se considera que *AMY1* GCN ha aumentado durante la evolución de los homínidos provocada por presiones de selección, por ejemplo, cambios en la dieta hacia un alto contenido de almidón (Boehlke *et al.,* 2015). De hecho, se ha descrito una relación positiva entre un mayor número de *AMY1* GCN en poblaciones con un alto consumo de almidón como consecuencia de la adaptación evolutiva, facilitando así la digestión del almidón (Boehlke *et al.,* 2015, Rukh et al., 2017, Perry et al., 2017, Pajic *et al.,* 2019). Es importante destacar que se considera que los niveles de alfa-amilasa en la saliva influyen en la percepción del gusto, y que esto a su vez podría predisponer al individuo a una dieta rica en azúcares, contribuyendo al crecimiento de bacterias cariogénicas y a un mayor número de caries dentales. (Boehlke *et al.,* 2015, Pajic *et al.,* 2019) Es importante considerar que la población en la que se realizó este estudio tiene una dieta rica en contenido de almidón; sin embargo, no se incluyó un cuestionario sobre la dieta de cada participante y no se pueden realizar suposiciones sobre el papel de la dieta. Se necesitan más estudios *in situ* para dilucidar las implicaciones de la alfa-amilasa en la boca y cómo influye tanto en la salud bucal como en la nutricional.

Con base en los resultados obtenidos en nuestro estudio, planteamos la hipótesis de que aquellos individuos con mayor *AMY1* GCN presentan una mayor expresión y actividad de alfa-amilasa salival, lo que conduce a una liberación más abundante del sustrato, favoreciendo así las condiciones adecuadas para el crecimiento de bacterias cariogénicas, con el consiguiente aumento de la presencia y gravedad de las caries. La principal limitación de este estudio es la falta de mediciones in situ, como la cantidad y actividad de alfa-amilasa salival, los niveles de pH y la carga bacteriana oral, que podrían respaldar aún más la hipótesis anterior. Otra posible limitación del estudio es el tamaño relativamente bajo de la muestra; por lo tanto, es necesario realizar estudios futuros con un tamaño de muestra mayor para obtener inferencias estadísticas más sólidas.

8. CONCLUSIÓN

En conclusión, los presentes resultados muestran una relación directa entre el número y la gravedad de la caries dental con *AMY1* GCN en la población estudiada. Debido a lo anterior, en conclusión, podemos aceptar la hipótesis planteada en esta investigación.

9. ANEXOS

9.1. Historia clínica

Historia Clínica

- Esta información es de carácter estrictamente confidencial y deberá ser entregada exclusivamente al personal médico de la UAQ.

Nombre:			Número de empleado:	Sexo M F
Fecha de nacimiento:	Edad:	Ocupación:	Escolaridad:	
Dirección:				
Teléfono:	Celular:	Correo electrónico:		

TA (promedio de brazo derecho e izquierdo):				Fecha de última menstruación:			
#	Afecciones	SI	NO	#	Afecciones	SI	NO
1	Tabaquismo			13	Problemas del hígado, hepatitis, ictericia		
2	Alcoholismo			14	Problemas del riñón, problemas urinarios		
3	Toxicomanías			15	Problemas respiratorios, asma		
4	Diabetes			16	Tos constante o tos con sangre		
5	Hipertensión			17	Tuberculosis (TB) o vivir con infectados de TB		
6	Enfermedades tiroideas			18	Tratamiento de cáncer o radiaciones		
7	Transfusiones de sangre			19	Problemas emocionales, depresión, estrés excesivo		
8	Sangrado excesivo o coagulación anormal			21	¿Ha tenido algún trasplante de órganos?		
9	Anemia			22	¿Esta usted en buena salud?		
10	Desmayos, convulsiones, epilepsia			NOTAS:			
11	Problemas digestivos, gastritis, ulceras, colitis						
12	Problemas del corazón, infarto, soplos, angina						

¿Ha sido hospitalizado? SI NO	En cuantas ocasiones:	Motivos:	
¿Embarazada? SI NO	Mes de embarazo:	N° de embarazos:	N° de abortos:
¿Toma usted algún medicamento de cualquier tipo (pastillas, inyecciones, etc.)? incluyendo anticoagulantes, aspirina, vitaminas, anticonceptivos, antihistamínicos.			
¿Cualquier otro problema médico relevante que no se le haya preguntado?			
¿Alergia a medicamentos, anestesia, alimentos?			

Ampliar las respuestas positivas

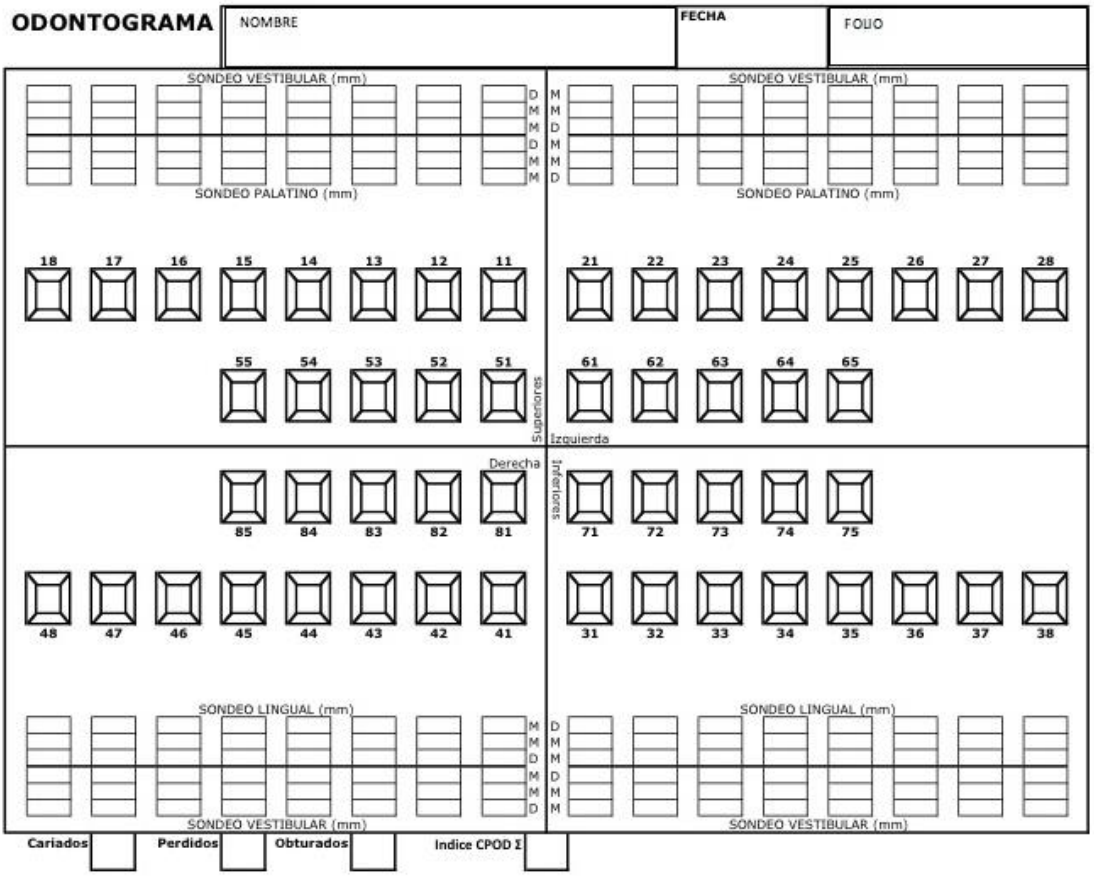
Problemas médicos actuales	Medicamentos actuales

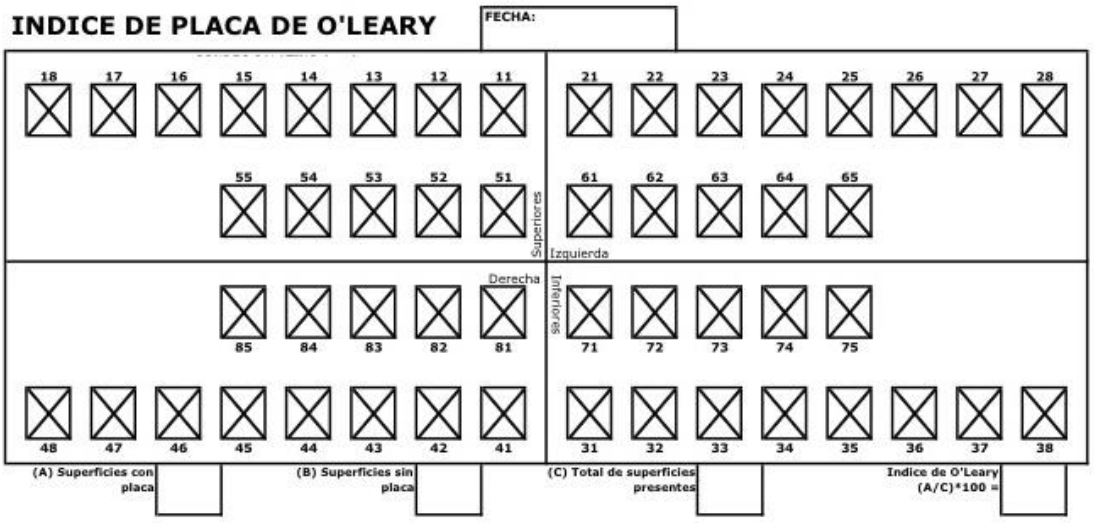
- Certifico que en lo que a mí respecta todas las respuestas son certeras y correctas.

Fecha: _____ Firma participante: _____

Firma personal UAQ: _____

9.2. Formato Odontológico





9.3. Formato explicativo

RECOMENDACIONES GENERALES

Al leer los resultados de su revisión odontológica recuerde que: los dientes para fines prácticos de diagnostico se identifican con números de 2 dígitos. Revise el esquema abajo, el odontograma, para orientarse.

El estado de higiene señalado se refiere a la cantidad de placa que se encontró el día de la revisión (por medio de la pastilla reveladora rosa), mas no se refiere al estado de salud bucal en general.

Se recomiendan 2-3 cepillados diarios con el auxilio ocasional del hilo dental para remover los residuos en medio de los dientes. Las cerdas del cepillo deben ser de dureza "suave" o "media". La cerdas duras a largo plazo causan desgastes en dientes y encías.

Se recomienda a todos el uso de cepillos dentales con cabezas pequeñas, para facilitar el cepillado en los lugares mas posteriores y de difícil acceso de la boca (eje: dientes del juicio, caras internas de los dientes, alrededor de prótesis...).

Evitar usar los dientes como instrumentos para abrir, cortar, prensar y destapar objetos ya que el mal uso puede llegar a desgastar, fracturar las superficies dentarias y desgarrar encías, labios, lengua o mejías de forma accidental.

Un control periódico de 1 a 2 veces al año con su dentista es un buen habito que permite interceptar a tiempo posibles riesgos mayores, de este modo tendrán solución mas fácil, rápida, indolora y mas económica.

LEYENDA

CARIES INCIPIENTE: caries muy reducidas y recientes. Sin tratamiento se tornan francas.

CARIES FRANCA: caries establecidas de gran tamaño y color obscuro. Se consideran como caries también las curaciones temporales, empastes que se hayan caído y dientes fracturados. Se resuelven con empastes.

PERIODONTO: todo el sistema de soporte que da estabilidad al diente: incluye la encía, hueso, ligamento periodontal y cemento radicular.

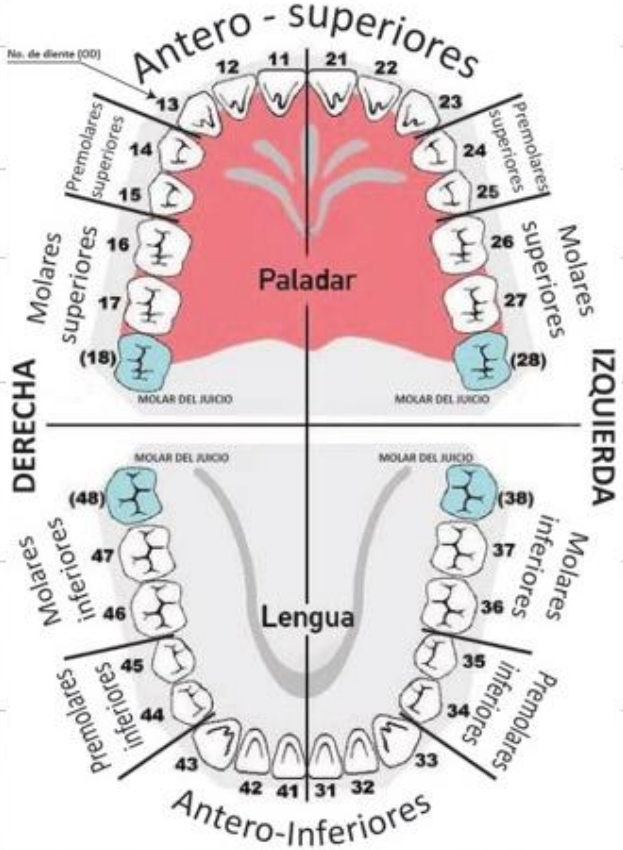
PLACA: masilla de color blanquecina/amarillenta que se forma sobre los dientes compuesta por microorganismos y residuos de alimentos. Causa mal aliento, gingivitis, caries y es fácilmente removible con el cepillado diario.

CALCULO: o también llamado sarro o tártaro, es la placa que con el paso del tiempo se vuelve dura como piedra de color amarillento o grisácea. Causa mal aliento, caries, gingivitis, enfermedad periodontal y perdida de dientes. No puede ser removida con el cepillado solo con limpieza dental por un profesional.

GINGIVITIS: Inflamación de las encías causada por placa y cálculo generalmente. Las encías se tornan inflamadas, enrojecidas, sangran facilmente y pueden molestar. Se soluciona mejorando la técnica de cepillado y su frecuencia tambien.

ENFERMEDAD PERIODONTAL: inflamación crónica de las encías y todo el periodonto que empezó con la gingivitis no tratada. Resulta en mal aliento, exposición de las raíces, sensibilidad dentaria, infecciones de las encías, aflojamiento de los dientes y por ultimo perdida de estos.

ODONTOGRAMA



RECESIÓN RADICULAR: descubrimiento de las raíces dentales con frecuencia asociada al retiro de las encías por enfermedad periodontal y cálculo. Causa sensibilidad, mayor retención de placa y caries radicular. Se soluciona con cirugía periodontal.

RESTO RADICULAR: restos fracturados dentales, generalmente quedan solo partes de raíz en la encía. Se consideran focos sépticos por predisponer a acumulación de placa e infecciones. Tienen la máxima prioridad de tratamiento y se resuelve solo con extracción.

BRUXISMO: también conocido como rechinar y/o apretar sus dientes, de día o durante el sueño. Condición muy común causada con frecuencia por estrés. El tratamiento se lleva controlando la causa del estrés y con guardas oclusales.

9.4. Formato resultados odontológicos

RESULTADOS ODONTOLÓGICOS				FOLIO INICIALES
CARIES				
CARIES FRANCA:	CARIES INCIPIENTES:	PRÓTESIS O EMPASTES CARIADOS O FRACTURADOS:	RESTOS RADICULARES:	NOTAS:
EN LOS DIENTES:	EN LOS DIENTES:	EN LOS DIENTES:	EN LOS DIENTES:	
ESTADO PERIODONTAL (de las encías)				
ESTADO:	CALCULO:	RECESIONES GINGIVALES:	NOTAS:	
EN LA ENCÍAS DE LOS DIENTES:	EN LOS DIENTES:	EN LA ENCÍAS DE LOS DIENTES:		
HIGIENE (según la placa encontrada)		***ESTADO DE SALUD BUCAL***		
RECOMENDACIONES PERSONALES				

Médico Estomatólogo Rubi Mauricio
Ced. Prof. 8900218

9.5. Formato resultados química sanguínea, perfil de lípidos, insulina, exploración

física y somatometría.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Número de folio/ Iniciales:	0 / 0	Edad:	años	Fecha:
	TA promedio:	0 / 0	mmHg	

Determinaciones bioquímicas

Variable	Resultado	Valores de referencia
Glucosa	0,0	70-110 mg/dL
Urea	0,0	15-45 mg/dL
BUN	0,0	7-20 mg/dL
Creatinina	0,0	Mujer: <0.96 mg/dL Hombre: <1.3 mg/dL
Ácido úrico	0,0	2.5-7.7 mg/dL
Colesterol	0,0	<200 mg/dL
HDL-C	0,0	35-60 mg/dL
LDL-C (no teórico)	0,0	<160 mg/dL
VLDL-C	0,0	20-45 mg/dL
Triglicéridos	0,0	<160 mg/dL
Insulina		<10 µUI/mL

Determinaciones antropométricas

Variable	Resultado		Valores de referencia	Interpretación
Peso		Kg	-	-
Talla		cm	-	-
Índice de Masa Corporal (IMC)			18.5-24.9 = normal 25-29.9 = sobrepeso ≥30 = obesidad	
Porcentaje de grasa corporal		%	11-21,9%	
Edad metabólica			-	

Hallazgos

Firma y nombre del responsable: Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz (Cédula Prof.: 4568197)

9.6. Consentimiento informado

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del estudio:

"VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN *AMY1*, CODIFICANTE PARA LA ALFA-AMILASA SALIVAL, Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE CARIES DENTAL"

El objetivo del estudio es establecer la relación entre el número de copias del gen *AMY1*, sobre la cantidad de la alfa-amilasa salival y el efecto de esta sobre la caries dental, con esto se pretende ver la interacción genética, y las condiciones propias de la cavidad bucal en pacientes adultos. **El responsable del proyecto es la M. en C. Rubi Mauricio Castillo** adscrita a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro con dirección en Calle Clavel no. 200 Col. Prados de la capilla, Querétaro, Qro. Teléfono (442)192-1200 Ext. 6240. Bajo la dirección del **Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz**, con la misma dirección y teléfono.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Su participación incluye una entrevista, una valoración bucal y la toma de una muestra sanguínea para análisis bioquímicos y genéticos con la finalidad de determinar la posible asociación de alguno de estos factores con el estado de salud bucal, así como toma de presión arterial en los dos brazos, toma de medidas antropométricas como la medición de cintura y toma de bioimpedancia. Las muestras obtenidas serán utilizadas exclusivamente para investigación y para realizar este estudio, siguiendo en todo momento la Norma Oficial Mexicana **NOM-024.SSA3-2012** que establece garantizar el procesamiento, interpretación, confidencialidad, seguridad y uso de estándares y catálogos de la información de los registros electrónicos en salud.

Como parte del estudio se obtendrá información genética con la finalidad de evaluar la presencia de polimorfismos en la variación del número de copias (CNV) en el gen conocido como *AMY1*. Los resultados obtenidos serán utilizados exclusivamente para fines de investigación científica. Así mismo, **nos comprometemos a no utilizar sus muestras tanto sanguíneas como de saliva en futuros análisis genéticos adicionales que no tengan relación con el presente proyecto y que no se hayan mencionado.**

Los exámenes practicados no tendrán costo alguno para usted. Se realizará a usted una historia clínica completa, la cual comprenderá de un cuestionario sobre salud en general y alimentación, antecedentes heredofamiliares, antecedentes no patológicos, así como una minuciosa revisión odontológica, que constará de exploración oral, medición de pH con tiras reactivas, una muestra de saliva no estimulada, para su análisis bacteriológico y se tomará una muestra sanguínea de su antebrazo, las cuales no ponen en ningún momento en riesgo su salud. De esta forma se obtendrá una química sanguínea que incluye medición de glucosa, urea,

creatinina, insulina y perfil lipídico; lo cual nos ayudará a identificar tempranamente o confirmar alguna alteración metabólica en su salud como diabetes mellitus, alteración renal, dislipidemias (grasas en sangre alteradas), entre otras. De igual forma, se realizará bioimpedancia, con el fin de obtener la mayor información posible acerca de su salud, así como medición de cintura. Los resultados obtenidos en estas valoraciones le serán entregados por escrito para que sean discutidos con su Médico de confianza. En lo que respecta a la exploración odontológica se le entregará un informe detallado de su estado de salud bucal, ya que se incluirá, diagnóstico de tejidos blandos (carrillo, lengua, labios, paladar, y encías), tejidos duros (dientes con caries, sanos y con movilidad), estado de higiene bucal (presencia de placa dentobacteriana, cálculo y cepillado). Los hallazgos encontrados en esta valoración y su tratamiento sugerido le serán entregados por escrito para que sean discutidos con su Odontólogo de confianza.

Este estudio busca relacionar el estado de salud bucal con el número de copias del gen *AMY1* (alfa-amilasa salival), el cual se ha visto que tiene una variante de copias, es decir, es un segmento de ADN cuyo número de copias es variable comparándolo con un genoma de referencia. Se ha descrito que dependiendo del número de copias del gen *AMY1*, aumentan los niveles de la esta enzima, los cuales influyen en el estado de salud bucal. En caso de que se detecten niveles bajos o altos de esta enzima **no se le administrará ningún suplemento o medicamento**, ya que esta relación continúa en proceso de investigación. Toda la información obtenida de su parte será completamente confidencial, y los resultados serán utilizados únicamente para fines de investigación; tal y como lo establece el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Los resultados le serán entregados en un sobre cerrado única y exclusivamente a usted previa identificación. Los resultados obtenidos serán publicados en revistas científicas de circulación internacional, protegiendo en todo momento su identidad y sin utilizar nombres u otros datos de identificación. Su participación en el estudio no le limita a seguir tratamiento alguno. **Su participación en este estudio es completamente voluntaria.** Si usted rechaza participar no tendrá implicaciones en su centro de trabajo ni en la atención recibida.

Los procedimientos a realizar no implican ningún riesgo para su salud. Siguiendo las consideraciones de la declaración de Helsinki: “Aunque el objetivo principal de la investigación médica es generar nuevos conocimientos, este objetivo nunca debe tener primacía sobre los derechos y los intereses de la persona que participa en la investigación”. La aplicación de cuestionarios, exploración odontológica, toma de muestra de saliva no estimulada y toma de muestra de sanguínea no representa riesgo alguno para usted, exceptuado posiblemente los relacionados a la venopunción, la cual será realizada por un profesional de la salud con probada experiencia en esta área.

Declaramos que no existen conflictos de intereses de ninguna índole de parte del centro de trabajo (***LUGAR DONDE SE REALIZARÁ EL MUESTREO***), responsable

de la investigación, co-responsable y colaboradores. El financiamiento de la investigación se obtendrá de recursos otorgados directamente por la Universidad Autónoma de Querétaro.

Yo:

_____

(Escribir el nombre completo **y su firma**)

Declaro libre y voluntariamente que acepto que participar en el estudio titulado: "VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN *AMY1*, CODIFICANTE PARA LA ALFA-AMILASA SALIVAL, Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE CARIES DENTAL"

Es de mi conocimiento que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. Sé que la información que yo proporcionaré será completamente confidencial para fines exclusivos de investigación.

Los datos obtenidos serán manejados exclusivamente por los investigadores de este estudio en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Recibiré los resultados obtenidos por mi participación y podré retirarme del estudio con previo aviso a los investigadores, si así lo decido.

Nombre y firma del investigador:

_____

Testigo 1: Nombre y firma: _____

Testigo 2: Nombre y firma: _____

Querétaro, Qro. a_____ del mes de_____ del año 2019.

10. REFERENCIAS

1. Ahmadi-Motamayel Fatemeh, Taghi Goodarzi Mohammad, Jamshidi Zohreh, Mahdavinezhad Ali, Rafieian Nasrin. Evaluation of salivary and serum alpha amylase level in dental caries of adolescence. Brazilian Dental Science doi:10.14295/bds.2016.v19i2.1227
2. Boehlke C, Zierau O, Hannig C (2015) Salivary amylase - the enzyme of unspecialized euryphagous animals. Arch Oral Biol 60(8):1162–1176. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05. 008
3. Balekjian AY, Meyer TS, Montague ME, Longton RW (1975) Electrophoretic patterns of parotid fluid proteins from caries- resistant and caries-susceptible individuals. J Dent Res 54(4):850– 856.
4. Borghi GN, Rodrigues LP, Lopes LM, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M. Relationship among α amylase and carbonic anhydrase VI in saliva, visible biofilm, and early childhood caries: a longitudinal study. Int J Paediatr Dent. 2017 May;27(3):174-182. doi: 10.1111/ipd.12249. Epub 2016 Jul 19. PMID: 27430359.
5. Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett. 2000 Dec 1d193(1):1h6.
6. Carpenter D, Mitchell LM, Armour JA (2017) Copy number variation of human AMY1 is a minor contributor to variation in salivary amylase expression and activity. Hum Genomics 11(1):2. https://doi.org/10.1186/s40246-017-0097-3
7. Choi YJ, Nam YS, Yun JM, Park JH, Cho BL, Son HY, Kim JI, Yun JW. Association between salivary amylase (AMY1) gene copy numbers and insulin resistance in asymptomatic Korean men. Diabet Med. 2015 Dec;32(12):1588-95. doi: 10.1111/dme.12808. Epub 2015 Jun 4.
8. Culp DJ, Robinson B, Cash MN. Murine Salivary Amylase Protects Against Streptococcus mutans-Induced Caries. Front Physiol. 2021 Jul 2;12:699104. doi: 10.3389/fphys.2021.699104. PMID: 34276419; PMCID: PMC8283412.

9. de Farias DG, Bezerra AC. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. Clin Oral Investig. 2003 Sep;7(3):154-7. doi: 10.1007/s00784-003-0222-7. Epub 2003 Aug 12. PMID: 12915963.
10. Fernández CI, Wiley AS. Rethinking the starch digestion hypothesis for AMY1 copy number variation in humans. Am J Phys Anthropol. 2017 Aug;163(4):645-657. doi: 10.1002/ajpa.23237. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28568243.
11. Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D, Magnusson I. Could alkali production be considered an approach for caries control? Caries Res. 2010d44(6):547h54. Epub 2010 Nov 13.
12. Grychtol S, Viergutz G, Pötschke S, Bowen WH, Hoth-Hannig W, Leis B, Umanskaya N, Hannig M, Hannig C (2015) Enzymes in the in-situ pellicle of children with different caries activity.
13. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. J Calif Dent Assoc. 2013 Feb;41(2):107-9, 112-8. PMID: 23505756; PMCID: PMC3825179.
14. Haase EM, Kou Y, Sabharwal A, Liao YC, Lan T, Lindqvist C, Scannapieco FA (2017) Comparative genomics and evolution of the amylase-binding proteins of oral streptococci. BMC Microbiol 17(1):94. https://doi.org/10.1186/s12866-017-1005-7
15. Heianza Y, Sun D, Wang T, Huang T, Bray GA, Sacks FM, Qi L. Starch Digestion-Related Amylase Genetic Variant Affects 2-Year Changes in Adiposity in Response to Weight-Loss Diets: The POUNDS Lost Trial. Diabetes. 2017 Sep;66(9):2416-2423. doi: 10.2337/db16-1482. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28659346; PMCID: PMC5566300.
16. JingM,ZhengT,GongT,YanJ,ChenJ,LinY,TangB,MaQ, Zhou X, Li Y (2022) AhrC negatively regulates Streptococcus mutans arginine biosynthesis. Microbiol Spectr 10(4):e0072122. https://doi.org/10.1128/spectrum.00721-22
17. Kirsch J, Hannig C, Pötschke S, Basche S, Bowen WH, Rupf S, Trautmann S, Umanskaya N, Hannig M (2017) Enzymology and

ultrastructure of the in situ pellicle in caries-active and caries- inactive patients. Caries Res 51(2):109–118.

18. Kor M, Pouramir M, Khafri S, Ebadollahi S, Gharekhani S. Association between Dental Caries, Obesity and Salivary Alpha Amylase in Adolescent Girls of Babol City, Iran-2017. J Dent (Shiraz). 2021 Mar;22(1):27-32. doi: 10.30476/DENTJODS.2020.84190.1070. PMID: 33681420; PMCID: PMC7921765.
19. Lahiri D, Nag M, Banerjee R, Mukherjee D, Garai S, Sarkar T, Dey A, Sheikh HI, Pathak SK, Edinur HA, Pati S, Ray RR (2021) Amylases: biofilm inducer or biofilm inhibitor? Front Cell Infect Microbiol 27(11):660048. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021. 660048
20. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, López-Contreras BE, Morán-Ramos S, Macias-Kauffer LR, Acuña-Alonzo V, Del Río-Navarro BE, Salmerón J, Velazquez-Cruz R1, Villarreal-Molina T, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. Low Salivary Amylase Gene (AMY1) Copy Number Is Associated with Obesity and Gut. Nutrients. 2018 Nov 1;10(11). pii: E1607. doi: 10.3390/nu10111607
21. Mandel AL, Peyrot des Gachons C, Plank KL, Alarcon S, Breslin PA. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary α-amylase levels, and the perception of oral starch. PLoS One. 2010 Oct 13;5(10): e13352. doi: 10.1371/journal.pone.0013352. PMID: 20967220; PMCID: PMC2954178.
22. Mejía-Benítez María A., Bonnefond Amélie, Yengo Loïc, Huyvaert Marlène, Dechaume Aurélie, Peralta-Romero Jesús, Klünder-Klünder Miguel, García Mena Jaime. El-Sayed Moustafa Julia S, Falchi Mario, Cruz Miguel, Froguel Philippe. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. Diabetologia (2015) 58:290–294 DOI 10.1007/s00125-014-3441-3.
23. Mojarad F, Fazlollahifar S, Poorolajal J, Hajilooi M (2013) Effect of alpha amylase on early childhood caries: a matched case-con- trol study. Braz Dent Sci 16(1):41–45.

24. Nikitkova AE, Haase EM, Scannapieco FA (2012) Effect of starch and amylase on the expression of amylase-binding protein A in Streptococcus gordonii. Mol Oral Microbiol 27(4):284–294. https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00644.x
25. OMS, www.who.int, 2016, nota informativa No.318, abril 2012.
26. Ooi DS, Tan VM, Ong SG, Chan YH, Heng CK, e YS. Differences in AMY1 Gene Copy Numbers Derived from Blood, Buccal Cells and Saliva Using Quantitative and Droplet Digital PCR Methods: Flagging the Pitfall. PLoS One. 2017 Jan 26;12(1): e0170767. doi: 10.1371/journal.pone.0170767. PMID: 28125683; PMCID: PMC5268653.
27. Opal S, Garg S, Jain J, Walia I. Genetic factors affecting dental caries risk. Aust Dent J. 2015 Mar;60(1):2-11. doi: 10.1111/adj.12262. Review.
28. Pajic P, Pavlidis P, Dean K, Neznanova L, Romano RA, Garneau D, Daugherity E, Globig A, Ruhl S, Gokcumen O (2019) Inde- pendent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals. Elife 14(8):e44628. https://doi.org/10. 7554/eLife.44628
29. Parsaie Z, Rezaie P, Azimi N, Mohammadi N. Relationship between Salivary Alpha-Amylase Enzyme Activity, Anthropometric Indices, Dietary Habits, and Early Childhood Dental Caries. Int J Dent. 2022 Mar 26;2022:2617197. doi: 10.1155/2022/2617197. PMID: 35378726; PMCID: PMC8976663.
30. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R, Carter NP, Lee C, Stone AC. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. Nat Genet. 2007 Oct;39(10):1256-60. doi: 10.1038/ng2123. Epub 2007 Sep 9. PMID: 17828263; PMCID: PMC2377015.
31. Peyrot des Gachons C, Breslin PA. Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. Curr Diab Rep. 2016 Oct;16(10):102. doi: 10.1007/s11892-016-0794-7. Review.
32. Piekoszewska-Ziętek P, Turska-Szybka A, Olczak-Kowalczyk D.Caries Res. Single nucleotide polymorphism in the aetiology of caries

2017;51(4):425-435. doi: 10.1159/000476075. Epub 2017 Jul 1. Review.

33. Pinho S, Padez C, Manco L., High AMY1 copy number protects against obesity in Portuguese young adults Ann Hum Biol. 2018 Aug;45(5):435-439. doi: 10.1080/03014460.2018.1490452. Epub 2018 Sep 10.

34. Prabhakar AR, Shubha AB, Mahantesh T (2008) Estimation of calcium, phosphate and alpha amylase concentrations in stimu- lated whole saliva of children with different caries status: a com- parative study. Malays Dent J 29(1):6–13

35. Reyes E., Martin J., Moncada G., Neira M., Palma P., Gordan V., Oyarzo JF., Yevenes I. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. J Appl Oral Sci. 2014 Jun;22(3):235-40.

36. Rukh G, Ericson U, Andersson-Assarsson J, Orho-Melander M, Sonestedt E (2017) Dietary starch intake modifies the relation between copy number variation in the salivary amylase gene and BMI. Am J Clin Nutr 106(1):256–262. https://doi.org/10.3945/ ajcn.116.149831

37. Santos JL, Saus E, Smalley SV, Cataldo LR, Alberti G, Parada J, Gratacòs M, Estivill X. Copy Number Polymorphism of the Salivary Amylase Gene: Implications in Human Nutrition Research. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2012;5(3):117-31. doi: 10.1159/000339951. Epub 2012 Sep 3.

38. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ (1993) Salivary alpha- amylase: role in dental plaque and caries formation. Crit Rev Oral Biol Med 4(3-4):301–307. https://doi.org/10.1177/1045441193 0040030701

39. Stangvaltaite-Mouhat L, Pūrienė A, Aleksejūnienė J, Stankeviciene I, Tommeras B, Al-Haroni M. Amylase Alpha 1 Gene (AMY1) Copy Number Variation and Dental Caries Experience: A Pilot Study among Adults in Lithuania. Caries Res. 2021;55(3):174-182. doi: 10.1159/000514667. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33735865.

40. Singh S, Sharma A, Sood PB, Sood A, Zaidi I, Sinha A. Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. J Oral Biol Craniofac Res. 2015 May-Aug;5(2):59-64. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.05.001. Epub 2015 Jun 3.

41. Usher CL, Handsaker RE, Esko T, Tuke MA, Weedon MN, Hastie AR, Cao H, Moon JE, Kashin S, Fuchsberger C, Metspalu A, Pato CN, Pato MT, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler DM, Frayling TM, Hirschhorn JN, McCarroll SA. Structural forms of the human amylase locus and their relationships to SNPs, haplotypes and obesity. Nat Genet. 2015 Aug;47(8):921-5. doi: 10.1038/ng.3340.

42. Yang Z, Lin J, Chen L, Zhang M, Yang X, Chen W. Influences of AMY1 gene copy number and protein expression on salivary alpha-amylase activity before and after citric acid stimulation in splenic asthenia children. J Tradit Chin Med. 2015 Jun;35(3):266-72.

43. Yang ZM, Lin J, Chen LH, Zhang M, Chen WW, Yang XR (2015) The roles of AMY1 copies and protein expression in human sali- vary α-amylase activity. Physiol Behav 138:173–178. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.037