

ASOCIACIÓN ENTRE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-PPAD DE *Porphyromonas gingivalis*, CON LOS SIGNOS CLÍNICOS PERIODONTALES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.

Ángela Dayana Algarra Rodríguez

Valentina Escobar Mejía

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC.- MAYO 2019**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Asociación entre los títulos de anticuerpos anti-PPAD de <i>Porphyromonas gingivalis</i> , con los signos clínicos periodontales en pacientes con artritis reumatoide.
Grupo de Investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
Línea de investigación:	Microbiología oral
Otra(s) institución(es) participante(s):	Departamento de ciencia, tecnología e innovación – COLCIENCIAS Hospital Militar Central
Tipo de investigación:	Pregrado/ Grupos
Residentes:	Ángela Dayana Algarra Rodríguez Valentina Escobar Mejía
Director:	Dra. Diana Marcela Castillo Perdomo
Codirector.	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

El agradecimiento de este proyecto va dirigido principalmente a la Dra. Diana Marcela Castillo que desde un inicio depositó su confianza en nosotras y nos dirigió en la realización de este proyecto, que a pesar de todas las dificultades presentadas para lograrlo, la doctora siempre busco miles de alternativas y posibilidades para ayudarnos a sacarlo adelante, así que agradecemos infinitamente su incondicionalidad, ayuda y acompañamiento en todo este proceso. De igual manera agradecemos al laboratorio UIBO por abrirnos sus puertas y a las doctoras que hacen parte de este grupo: Dra. Yormaris Castillo, Dra. Nathaly Delgadillo, Dra. Yineth Neuta por su disposición y amabilidad para colaborarnos en todo lo que necesitamos estando allí en el laboratorio. Queremos agradecer el acompañamiento y guía del Dr. Camilo Castellar por compartirnos sus conocimientos y estar pendiente de nosotras para realizar de la mejor manera nuestro proyecto. También agradecemos a la Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil por su dirección y supervisión en la realización de este trabajo y finalmente agradecemos a nuestros padres que estuvieron pendientes cada instante y sin los cuales esto no hubiera sido posible.

Dedicatoria

Principalmente le damos gracias a Dios por permitirnos culminar este proyecto, por darnos la oportunidad de conocer personas maravillosas durante la realización de este trabajo y brindarnos la posibilidad tan grande de formarnos como unas grandes profesionales.

Le dedicamos de manera especial este trabajo a nuestros padres, que han sido unos luchadores incansables, que se han esforzado día a día por que esto sea posible, los cuales son el pilar de este gran logro y a los que les debemos más que todos nuestros agradecimientos.

A la Dra. Diana Marcela Castillo Perdomo que creyó en nuestras capacidades y confió en nosotras desde el primer momento, por guiarnos en cada momento y por darnos de su conocimiento cada día y a todo el equipo de trabajo del laboratorio UIBO por colaborarnos en el proceso.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

Lista de tablas

	Pág.
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1 Enfermedad Periodontal.....	2
2.2 Artritis Reumatoide.....	3
2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	4
2.4 Gingipaínas.....	5
2.5 Asociación entre la artritis reumatoide y enfermedad periodontal.....	5
2.6 P. gingivalis Peptidyl-Arginine Deiminase (PPAD).....	6
2.7 Asociación entre la artritis reumatoide y PPAD.....	8
3. Planteamiento del problema.....	9
4. Justificación.....	11
5. Situación Actual.....	12
6. Objetivos.....	13
6.1 Objetivo general.....	13
6.2 Objetivos específicos.....	13
7. Metodología.....	14
7.1. Tipo de estudio.....	14
7.2. Población y muestra.....	14
7.2.1 Población.....	14
7.2.2 Muestra.....	14
7.2.3 Control de sesgos.....	14
7.2.4 Criterios de inclusión.....	14
7.2.5 Criterios de exclusión.....	14

7.2.6 Evaluación médica.....	15
7.2.7 Evaluación periodontal.....	15
7.2.8 Muestras.....	16
7.2.8.1 Muestra de suero.....	16
7.2.8.2 Muestra de placa subgingival.....	16
7.3. Materiales y métodos.....	16
7.3.1 Detección de P. gingivalis en placa subgingival por PCR cuantitativa.....	17
7.3.2 Determinación de anticuerpos anti PPAD.....	17
7.4 Plan de tabulación y análisis.	17
a. Hipótesis estadísticas (alterna y nula)	18
b. Estadística descriptiva.....	18
8. Consideraciones éticas.....	19
a. Sustento legal.....	19
9. Resultados.....	20
9.1 Fase descriptiva.....	20
9.2 Fase analítica.....	20
10. Discusión.....	24
11. Conclusiones.....	26
12. Referencias bibliográficas.....	27
13. Anexos.....	32

RESUMEN

Antecedentes: *Porphyromonas gingivalis* es la única una bacteria periodontopatogena que expresa y secreta PAD (Peptidyl-Arginine Deiminase) la cual tiene la capacidad de convertir residuos de arginina en proteínas a citrulinas, se sugiere un papel en la autoinmunidad contra proteínas citrulinadas en el desarrollo de la artritis reumatoide periodonto.

Objetivo: Determinar la asociación entre artritis reumatoide con la presencia de la PPAD, *P. gingivalis* y condición periodontal. **Metodología:**

Un total de 10 pacientes con artritis reumatoide fueron evaluados mediante exámenes reumatológicos y periodontales. Los niveles séricos de anticuerpos anti-PPAD se midieron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se realizó una estadística descriptiva, prueba de Chi² prueba exacta de Fisher, además de una correlación de Spearman. **Resultados:** De los 10 pacientes evaluados el 70% corresponden a mujeres, con una edad promedio de 58,1±4,5. No se encontró una correlación significativa entre anticuerpos anti-PPAD y los signos clínicos periodontales, ni con la presencia de *P. gingivalis* en placa subgingival y los anticuerpos anti-*P. gingivalis*. No se encontraron asociación entre los parámetros clínicos periodontales y los titulo de anticuerpos anti-PPAD. En cuanto a los parámetros clínicos articulares, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en las variables articulaciones dolorosas se encuentra un valor de $p=0.053$, adicionalmente con el índice SDAI de actividad de artritis reumatoide se encontró un valor de $p=0.082$. Estos datos podrían sugerir que los pacientes que presentan anticuerpos anti-PPAD podrían presentar mayor actividad de la artritis reumatoide.

Conclusiones: La mayoría de los pacientes con artritis reumatoide evaluados fueron positivos para anticuerpos anti-PPAD, sin embargo, no hay asociaciones significativas con los parámetros clínicos periodontales y articulares. Aunque hay una tendencia con SDAI y articulaciones dolorosas que podrían asociarse significativamente aumentando el tamaño de la muestra.

Palabras clave: Artritis reumatoide, periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, Peptidyl-Arginine Deiminase (PPAD).

ABSTRACT

Background: *Porphyromonas gingivalis* is the only periodontopathogenic bacterium that expresses and secretes PAD (Peptidyl-Arginine Deiminase) which has the ability to convert arginine residues into proteins to citrullins, a role in autoimmunity against citrullinated proteins are suggested in the development of rheumatoid arthritis periodontium. **Objective:** To determine the association between rheumatoid arthritis with the presence of PPAD, *P. gingivalis* and periodontal condition.

Methodology: A total of 10 patients with rheumatoid arthritis were evaluated by rheumatologic and periodontal examinations. Serum levels of anti-PPAD antibodies were measured by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). We performed a descriptive statistic, Chi² test, Fisher's exact test, additionally a Spearman correlation. **Results:** Of 10 patients evaluated, 70% corresponded to women, with an average age of 58.1 ± 4.5 . No significant correlation was found between anti-PPAD antibodies and periodontal clinical signs nor with the presence of *P. gingivalis* in subgingival plaque and anti-*P. gingivalis* antibodies. No association was found between the periodontal clinical parameters and the anti-PPAD antibody titer. Regarding the joint clinical parameters, although no statistically significant differences were found, in the variable painful joints a p-value = 0.053 was found, in addition to the SDAI index of rheumatoid arthritis activity, a p-value = 0.082 was found. These data may suggest that patients with anti-PPAD antibodies may have increased rheumatoid arthritis activity. **Conclusions:** The majority of patients with rheumatoid arthritis evaluated were positive for anti-PPAD antibodies, however, there are no significant associations with periodontal and articular clinical parameters. Although there is a tendency with SDAI and painful joints that could be associated significantly increasing the size of the sample.

Keywords: Rheumatoid arthritis, periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, Peptidyl-Arginine Deiminase (PPAD).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mediana y rango intercuartil de las variables edad y condición clínica periodontal.....	20
Tabla 2. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y anti-CCP	21
Tabla 3. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y articulaciones dolorosas.....	21
Tabla 4. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y articulaciones inflamadas.....	21
Tabla 5. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y DAS28.....	22
Tabla 6. Asociación entre la presencia de anti-PPAD, VAS y HAQ.....	22
Tabla 7. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y SDAI.....	22
Tabla 8. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y las variables periodontales.....	23
Tabla 9. Correlación de Spearman para edad, anticuerpos séricos y presencia de <i>P. gingivalis</i>	23
Tabla 10. Correlación de Spearman variables periodontales.....	23

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviatura	Término
TNF	Factor de necrosis tumoral
PPAD	<i>P. gingivalis</i> peptidil-arginina deiminasa
RgpA	Arg-gingipaina A
RgpB	Arg-gingipaina B
PAD	Peptidil arginina deiminasa
ACPA	Anticuerpo anticitrulina
VSG	Velocidad de sedimentación globular
AAP	Academia Americana de Periodoncia
CDP	Prevención y el Control de Enfermedades
BSA	Albumina sérica bovina
TMB	Tetrametilbencidina peroxidasa
BIC	Criterios de información Bayesiana

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal y la artritis reumatoide se caracteriza por ser desórdenes inflamatorios crónicos que provocan reabsorción ósea y producción de citocinas proinflamatorias. La presencia de periodontitis en pacientes con artritis reumatoide es cercana a dos veces más que la población general (Bautista *et al.*, 2012). Se ha descrito que la periodontitis además de ser una enfermedad prevalente en el mundo, está altamente involucrada con el desarrollo y/o progreso de patologías sistémicas tales como trastornos cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y artritis reumatoide; esto se debería a el constante paso de bacterias periodonto patógenas al torrente sanguíneo por bacteremia y a la liberación de toxinas y mediadores inflamatorios.

El objetivo del presente trabajo es determinar la asociación entre la presencia de *P. gingivalis* y la PPAD con los signos clínicos periodontales en pacientes con artritis reumatoide comparados con un grupo control sano sistémicamente. Para esto se evaluaron 10 pacientes con artritis reumatoide y 5 individuos sanos sistémicamente apareados por edad y género en una relación 1:1. Se excluyeron pacientes con enfermedades sistémicas adicionales, enfermedades infecciosas, ortodoncia, tratamiento periodontal en el último año, tratamiento antibiótico en los tres meses previos a la toma de las muestras, mujeres embarazadas o lactantes. Para la evaluación médica los pacientes fueron valorados por reumatólogos del servicio de reumatología del Hospital Militar Central y la evaluación periodontal se realizó por periodoncistas calibrados. A todos los grupos de pacientes se les tomó muestra de suero y placa subgingival. Esto es realizado con el fin de generar nuevo conocimiento científico, que pueda ser transferido o difundido a los involucrados principales de esta enfermedad y a la sociedad en general, para mejorar la calidad de vida de estas personas.

2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

2.1 Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal es una alteración en la cavidad oral y de los tejidos periodontales que afecta las estructuras que protegen, soportan y rodean el diente. La enfermedad periodontal presenta dos etapas, la primera es la gingivitis, que es la inflamación inicial del periodonto marginal que puede ser reversible si se elimina la etiología, o con la realización de una profilaxis dental completa y cuidado en la higiene oral. Y la segunda etapa del proceso es la periodontitis, una enfermedad inflamatoria crónica que compromete la integridad de los tejidos de soporte del diente como lo son encía, ligamento periodontal y hueso alveolar. Esta inflamación genera una destrucción progresiva del periodonto (Hajishengallis, 2015; Niemiec, 2008).

Algunos signos y síntomas característicos de la gingivitis, es la presencia de eritema, edema, y hemorragia gingival durante el sondaje, el cepillado, o por trauma mecánico. A medida que se genera una progresión de la gingivitis a periodontitis, los cambios periodontales se intensifican con formación de bolsas periodontales, por aumento de la profundidad del surco gingival, pérdida de inserción, presencia de placa supra y subgingival con formación de cálculos dentales, y pérdida de hueso alveolar (Niemiec, 2008).

Esta enfermedad se caracteriza por ser una enfermedad compleja, de etiología multifactorial que es influenciada por factores microbianos, asociados con cambios en las comunidades microbianas disbióticas, a nivel del hospedador, por factores genéticos predisponentes a la enfermedad (Hajishengallis, 2015), y factores ambientales, que modifican la respuesta del hospedador en donde se incluyen la higiene oral (placa bacteriana), el hábito de fumar y el estrés el cual es considerado un factor importante en la expresión de periodontitis (Belibasakis et al., 2011).

El factor etiológico principal de la enfermedad periodontal, es la placa bacteriana la cual se compone de una matriz orgánica de glicoproteínas y polisacáridos extracelulares

procedentes de la saliva, la cual en el surco gingival, proporciona un ambiente ideal para la proliferación de bacterias anaerobias y Gram-negativas en donde se pueden identificar como principales causantes agentes de la periodontitis la *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* y *Parvimonas micra* que a través de su metabolismo y en función de su virulencia, generan productos metabólicos como citotoxinas y endotoxinas bacterianas con la capacidad de causar inflamación y destrucción en los tejidos periodontales (Hajishengallis, 2015; Lemos et al., 2017). Se ha encontrado que *P. gingivalis* es capaz de estimular la producción de ciertas citoquinas, como la IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α , en células epiteliales del surco periodontal, suscitando un estado pro-inflamatorio (Huertas et al., 2018).

La periodontitis no solo puede llegar a causar pérdida de dientes como consecuencia de una destrucción periodontal avanzada, sino también puede llegar a causar daño a nivel sistémico, al aumentar el riesgo de los pacientes con condiciones como aterosclerosis, artritis reumatoide, neumonía por aspiración y cáncer (Niemi 2008).

2.2 Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica de origen autoinmune multifactorial caracterizada por sinovitis, depósito de fibrina, daño del cartílago, erosión del hueso subcondral e inflamación del tejido blando perióseo, tiene una prevalencia de 0.5-1% a nivel mundial. En esta enfermedad hay una inflamación persistente que se extiende a otras estructuras articulares como el hueso, el cartílago articular, ligamentos y tendones, causando su destrucción. Su presentación y evolución es muy variable y se ven afectados en un principio manos, muñecas y pies, seguido de afectación en cualquier articulación entre las que se encuentran las rodillas, tobillos, hombros y codos (Delgado-Vega et al., 2006).

La causa de esta enfermedad es desconocida y su pronóstico es reservado (McInnes et al., 2011). La epidemiología de la artritis reumatoide según la tasa de incidencia anual se encuentra entre un rango de 20 a 50 casos por 100.000, en países industrializados como América del Norte y Europa con una aparente reducción en los países del sur de Europa

(Loreto et al., 2010). Es más prevalente cuando aumenta la edad, y es más alta en mujeres mayores de 65 años (Scott et al., 2010).

Dentro de los factores de riesgos asociados con la artritis reumatoide se consideran los ambientales, en donde se incluye el tabaquismo como uno de los factores más dominantes y contribuyentes para esta enfermedad y otros posibles factores que pueden estar asociados, pero que no se tiene mucha evidencia, son el consumo de alcohol, la ingesta de café, el estado de vitamina D, el estado hormonal (anticonceptivos orales), y el bajo nivel económico y educativo. En los factores genéticos asociados se incluyen historia familiar positiva para artritis reumatoide, enfermedad anticuerpo positivo o negativo y los alelos HLA-DRB1*0404 y TNF -308A que han sido asociados de manera uniforme con la artritis reumatoide generalmente en población latinoamericana (Scott et al., 2010; Smolen et al., 2016; Delgado et al., 2006).

Las características clínicas de la artritis reumatoide son tumefacción articular por causa de inflamación sinovial, hiperplasia, destrucción del cartílago y del hueso (McInnes et al., 2011). La artritis reumatoide implica varias cascadas inflamatorias que genera la sobreproducción y sobre extensión de Factor de necrosis tumoral (TNF), producida por la interacción entre los Linfocitos B y T, los fibroblastos de tipo sinovial y los macrófagos. Esto conduce a un aumento posterior en la producción de citoquinas, que provocan inflamación de la cápsula sinovial persistente y destrucción articular (Scott et al., 2010).

2.3 Porphyromonas gingivalis

Es un coccobacilo anaerobio estricto, asacarolítico, productor de proteínas, enzimas y productos finales de su metabolismo que le otorgan la facultad de evadir la respuesta del hospedador, ha sido identificado como un colonizador tardío en el biofilm (Huertas et al., 2018). Esta bacteria expresa una serie de factores de virulencia, tales como endotoxinas, vesículas de membrana externa, lipopolisacáridos, hemaglutininas, fimbrias, proteínas cisteinproteasas, proteinasas no cisteinproteasas, inductores de metaloproteinasa de la matriz (favorecen su nutrición y asimilación del grupo hemo), cápsula y una diversidad genotípica y serotípica que permite una variabilidad intra-especie con la potencialidad de

inducir inflamación y destrucción periodontal (Díaz et al., 2012). Pertenece al grupo de los bacteroides negro pigmentados, hace parte del complejo rojo y es un patógeno líder en periodontitis crónica (Haffajee & Socransky 2008; Socransky et al., 1998). Recientemente, se ha informado que produce una enzima bacteriana única, *P. gingivalis* peptidil-arginina deiminasa (PPAD) (Cuéllar et al., 2013), que tiene la capacidad de la conversión enzimática de peptidil-arginina a peptidil-citrulina en las proteínas.

2.4 Gingipaínas

Son proteasas extracelulares que escinden los sustratos en los residuos de lisina o arginina, las cuales pueden descomponer el colágeno, interrumpir la cascada de coagulación, degradar y modificar las inmunoglobulinas, el complemento y las citoquinas. Las Arg-gingipaína también conocidas como gingipaínas R (RgpA y RgpB) actúan en concierto con otro importante factor de virulencia exclusivo de *P. gingivalis*, una enzima peptidylarginine deiminase denotada PPAD.

Arg-gingipain A (RgpA), es uno de los factores de virulencia de *P. gingivalis*, contiene dominio catalítico, dominio de hemaglutinina y dominio subhemaglutinina que incluye HA-1, HA-2, HA-3 y HA-4.

2.5 Asociación entre la artritis reumatoidea y enfermedad periodontal

Los pacientes con artritis reumatoide tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad periodontal, teniendo una presentación mucho más severa y frecuente en estos pacientes con respecto a la población en general. En los últimos años se ha evidenciado similitudes patogénicas entre la artritis reumatoide y la enfermedad periodontal entre ellas que son consideradas trastornos inflamatorios crónicos destructivos. Ambas son caracterizadas por ser de etiología multifactorial y con predisposición a factores ambientales y genéticos influyentes en el desarrollo de esta enfermedad. Tanto la artritis reumatoide como la periodontitis son enfermedades progresivas y destructivas, es decir que a mayor duración de la enfermedad, se va disminuyendo la calidad de vida y la capacidad de función. Ambas afecciones tienen mecanismos patológicos comunes en donde se potencian por una

respuesta inflamatoria exagerada generando un aumento de los mediadores pro inflamatorios, lo cual contribuye a la destrucción tanto de tejido blando como de tejido duro del periodonto en la enfermedad periodontal, y de la membrana sinovial para la artritis reumatoide (De Smit et al., 2011).

Una serie de datos epidemiológicos encontraron que la prevalencia de artritis reumatoide es mayor en pacientes con enfermedad periodontal y se indicó un aumento en las afecciones sistémicas, incluida la artritis reumatoide, cuando la persona presenta enfermedad periodontal (Leech et al., 2015). Monsarrat et al., en su estudio OSARA (Estado oral y artritis reumatoide) evaluó el estado periodontal, oral y protésico de las personas con artritis reumatoide, el cual reportó que el 96% de los pacientes con artritis reumatoide, presentaban periodontitis, siendo el 46% descrita como enfermedad periodontal grave (Monsarrat et al., 2014)

Uno de los factores epidemiológicos compartidos por la artritis reumatoide y la enfermedad periodontal es el tabaquismo, factor identificado como un estímulo para la citrulinación de péptidos mediante la inducción de la enzima PAD (peptidil arginina deiminasa). La citrulinación, es la conversión de la arginina en citrulina, la cual es catalizada por la enzima PAD en un proceso fisiológico generado durante sucesos inflamatorios y de muerte celular. Para que se produzca este proceso, se requiere la movilización de calcio intracelular. Tales péptidos citrulinados podrían conducir respuestas de ACPA (Anticuerpo Anticitrulina) biomarcador positivo para artritis reumatoide (Leech et al., 2015).

Además, se conoce que *P. gingivalis* por presentar una PAD similar a las humanas también favorece este proceso de citrulinación de las proteínas del hospedador favoreciendo el aumento en los títulos anti- CCP.

2.6 *P. gingivalis* Peptidyl-Arginine Deiminase (PPAD)

La citrulinación, también llamada deiminación de arginina, es la conversión postraducciona de arginina a citrulina, catalizado por la enzima peptidil arginina deiminasa. En este proceso, un residuo de arginina dentro de una proteína se convierte en el aminoácido no codificado citrulina. Esta modificación reduce la carga neta de las proteínas a través de la

pérdida de carga positiva por cada residuo de arginina modificada, lo que conduce a una reducción de la capacidad de enlace hidrógeno dando como resultado el despliegue de proteínas y cambios conformacionales y funcionales. (Darrah et al., 2018; Olsen et al., 2018).

Porphyromonas gingivalis es una bacteria periodonto patógena presente tanto en la periodontitis crónica como agresiva, y es el único patógeno conocido en la actualidad, que expresa y secreta PAD (Peptidyl-Arginine Deiminase) (Gabarrini et al., 2015). Esta enzima puede modificar proteínas por medio de la eliminación de residuos de arginina libre presentes en proteínas y péptidos, convirtiéndolos en citrulina, sin necesidad de depender del calcio a diferencia del PAD humano (Olsen et al., 2018). *P. gingivalis* utiliza distintos factores de virulencia para evadir la defensa del huésped y PPAD hace parte de este grupo. La citrulinación de arginina libre le proporciona energía durante el crecimiento anaerobio, mientras que la producción de amoníaco le confiere la capacidad de proteger *P. gingivalis* durante los ciclos de limpieza ácida en la boca, y facilita un efecto inhibitorio en la función del neutrófilo promoviendo mayor infección periodontal (Konig et al., 2014; Gabarrini et al., 2015). Además, se ha propuesto a PPAD y mecanismos complementarios de Rgp, como responsables de la inactivación de componentes del plasma, el aumento del flujo del líquido crevicular gingival y la supervivencia de la *P. gingivalis* dentro de la bolsa periodontal (Konig et al., 2015).

Se ha demostrado, que la ubicación de la PPAD en la membrana externa de *P. gingivalis* con gingipainas específicas de arginina facilita la citrulinación de los residuos de arginina Carboxi- terminal y elimina la arginina libre. Las gingipainas separan las cadenas de proteínas, exponiendo las argininas C-terminales que se citrulinan posteriormente por PPAD (Konig et al., 2015). Por ejemplo, recientes estudios informaron que la PPAD elimina la arginina C-terminal del factor de crecimiento epidérmico, y esta modificación genera efectos adversos posteriores en la actividad biológica de la citoquina, disminuyendo la actividad del EGF en las bolsas periodontales contribuyendo así, a un daño tisular parcial y al retraso de la cicatrización del periodonto (Koziel et al., 2014).

2.7 Asociación entre la artritis reumatoidea y PPAD

La peptidilarginina deiminasa (PAD) es una enzima que cataliza la reacción de modificación postraduccional de los residuos de arginina a la citrulina. Al modificar los autoantígenos en el tejido sinovial y los sitios alternativos de inflamación, la actividad de PAD puede iniciar y mantener la autoinmunidad en la AR positiva para autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) los cuales son muy específicos para la AR y preceden a la aparición de la enfermedad clínica por años (Konig et al., 2014).

Porphyromonas gingivalis puede producir esta enzima (*P. gingivalis* peptidil-arginina deiminasa (PPAD)) la cual tiene la capacidad de convertir residuos de arginina en proteínas a citrulinas. PPAD puede estar involucrada en la desregulación de la red de señalización del huésped y la evasión inmune. Además, se sugiere un papel en la autoinmunidad contra proteínas citrulinadas en el desarrollo de la artritis reumatoide periodonto (Koziel et al., 2014).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica común en las estructuras de soporte de los dientes. Afecta hasta el 30% de la población mundial y puede llegar a ocasionar movilidad dental, pérdida prematura de dientes, halitosis, dolor e inflamación en la zona afectada (Preshaw et al., 2013).

Los signos de inflamación no solo pueden ser identificados localmente con la presencia de bolsas periodontales, sino también a nivel sistémico, por niveles aumentados de mediadores pro-inflamatorios en sangre en pacientes con periodontitis. Esto puede estar directamente relacionado con la formación de placa aterosclerótica y la intensificación de otras enfermedades inflamatorias sistémicas, como enfermedades cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, obesidad y artritis reumatoide (Eriksson et al., 2016).

Se ha planteado un vínculo entre la artritis reumatoide y la periodontitis, al compartir similitudes con respecto a factores de riesgos tanto genéticos como ambientales que intervienen en el desarrollo de la enfermedad; así mismo la fisiopatología de estas enfermedades presentan proximidad, al comprender un conjunto de células inflamatorias, mediadores generadores de la destrucción ósea y citocinas pro inflamatorias similares (Borgnakke et al., 2013; Eriksson et al., 2016).

En pacientes con artritis reumatoide en etapas tempranas o tardías, se ha detectado ADN bacteriano de anaerobios y altos títulos de anticuerpos contra estas bacterias en el líquido sinovial. En la microbiota oral existen bacterias altamente patógenas que pueden mantener una bacteremia crónica hasta causar afección en órganos distantes (articulación y endocardio) (Detert et al., 2010). *Porphyromonas gingivalis* es uno de los patógenos periodontales más frecuentes, y tiene la capacidad de atravesar las uniones epiteliales, invadir las células del endotelio humano, inactivar ciertas citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, degradar componentes extracelulares, y recientemente se ha demostrado la capacidad de *P. gingivalis* de invadir los condrocitos humanos para inducir efectos celulares como la apoptosis (Bingham et al., 2013; Detert et al., 2010).

La citrulinación mediada por las enzimas PAD humanas y probablemente por la PPAD de la bacteria es la responsable de cambios postraduccionales que alteran la conformación de las proteínas generando anticuerpos anti péptidos citrulinados, diferentes autores proponen a la PPAD de *P. gingivalis* como el link entre la enfermedad periodontal y la artritis reumatoide (Leech et al., 2015; Quirke et al., 2013; Maresz et al., 2013; Mangat et al., 2010).

Sin embargo, se ha demostrado que es necesaria la acción de otras proteasas para que las PPAD puedan actuar, por lo que se cree que es probable que las Arg-gingipaínas después de clivar proteínas en el lado carboxilo de la arginina, deje este residuo en el extremo terminal favoreciendo el reconocimiento por la enzima PPAD y así generar péptidos citrulinados (Montgomery et al., 2015; Quirke et al, 2013). En esta vía Quirke et al, en 2013 encontraron un aumento en los anticuerpos anti-PPAD en un grupo de pacientes con artritis reumatoide, mientras que la concentración de anticuerpos contra la gingipaína RpgB no fue más alto en comparación con el grupo control. Se hipotetiza que la acción de las gingipaínas podría ser sinérgica con la PPAD.

Se han reportado altos niveles de anticuerpos anti-*P. gingivalis* en pacientes con enfermedad periodontal, sin embargo, no se conoce si los anticuerpos contra factores de virulencia como las gingipaínas pueden asociarse con signos clínicos de la periodontitis en pacientes sanos sistémicamente comparados con un grupo de pacientes con una enfermedad sistémica como la artritis reumatoide.

4. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal es una de las patologías más prevalentes en la actualidad con un gran impacto a nivel mundial (Ramos et al., 2014). En Colombia, el Estudio Nacional de Salud Bucal III (ENSAB III) de 1998, determinó una prevalencia de 50%. En el ENSAB IV de 2014 se reportó un incremento al 61.8% de acuerdo al último estudio nacional de salud bucal; de esta cifra el 43.46% de los casos corresponden a periodontitis moderada y el 10.62% a periodontitis severa. De esta forma, la presencia de periodontitis a los 18 años muestra una prevalencia de 21.90%, con un 10.6% de periodontitis leve y 10.97% de moderada y para la edad de 35 a 44 años, el 48.29% de las personas presentan periodontitis moderada y el 7.84% evidencia periodontitis avanzada. A partir de los 45 años la periodontitis aumenta por encima del 82.88% y a las edades de 65 a 79 años el 25.99% presentaba periodontitis severa y artritis reumatoide, esta última tiene una prevalencia de 0,5-1% en la población mundial.

Es necesario, evaluar el papel que ejercen los factores de virulencia de *P. gingivalis* en la patogénesis de la enfermedad periodontal y como estos a su vez intervienen en la evolución de la artritis reumatoide. Es por esto, que evidenciar dicha interacción entre *P. gingivalis* y la PPAD en el desarrollo de enfermedades sistémicas permitirá tener una visión más clara de la importancia de correlacionar las patologías orales con las sistémicas, para así sugerir estrategias de terapéuticas y preventivas que reduzcan la morbilidad y la reducción de costos que generaría implementar el tratamiento periodontal en el tratamiento de la artritis reumatoide.

5. SITUACIÓN ACTUAL

La periodontitis se ha asociado con otras enfermedades crónicas e inflamatorias, como la diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, parto prematuro, bajo peso al nacer y artritis reumatoide. Los pacientes con esta última enfermedad tienen mayor riesgo de desarrollar periodontitis con una presentación mucho más severa.

Tanto la artritis reumatoide como la periodontitis son enfermedades progresivas y destructivas, es decir que, a mayor duración de la enfermedad, se va disminuyendo la calidad de vida y la capacidad de función. Ambas afecciones tienen mecanismos patológicos comunes en donde se potencian por una respuesta inflamatoria exagerada generando un aumento de los mediadores pro inflamatorios, lo cual contribuye a la destrucción tanto de tejido blando como de tejido duro del periodonto en la enfermedad periodontal, y de la membrana sinovial para la artritis reumatoide (De Smit et al., 2011).

6. OBJETIVOS

6.1. *Objetivo general*

Determinar la asociación entre artritis reumatoide con la presencia de la PPAD, *P. gingivalis* y condición periodontal.

6.2. *Objetivos específicos*

- Evaluar la presencia de la PPAD en un grupo de pacientes con artritis reumatoide y un grupo control sin enfermedades sistémicas.
- Identificar la presencia de *P. gingivalis* en placa subgingival de pacientes con artritis reumatoide y un grupo control sin enfermedades sistémicas.
- Buscar asociaciones estadísticas entre la presencia de artritis reumatoide con la presencia de la PPAD, la presencia de *P. gingivalis* y la condición periodontal.

7. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio

Estudio observacional analítico de corte transversal.

7.2. Población y muestra

7.2.1 Población: Estos pacientes pertenecen al proyecto Asociación entre la proteasa RgpA y la enzima asociada a procesos de citrulinación PPAD de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes en artritis reumatoide, aprobado por Colciencias contrato 642-2017.

7.2.2 Muestra: Para el cálculo de muestra se evaluará una muestra piloto de 10 pacientes con artritis reumatoide con criterios clasificatorios según el Colegio Americano de Reumatología de 2010.

Se solicitó la firma de consentimiento informado aprobado para el proyecto de Colciencias, aprobado por el comité de ética de la Universidad El Bosque y el Hospital Militar Central.

7.2.3 Control de sesgos: Para control de sesgos todos los individuos fueron apareados por edad y género en una relación 1:1 AR/Control

7.2.4 Criterios de inclusión: Se incluyeron pacientes con diagnóstico de AR de acuerdo a los criterios del Colegio Americano de Reumatología de 2010. Se aparearon controles sin AR evaluados por los mismos criterios para descartar AR, vecinos y acompañantes de los pacientes sin ningún grado de consanguinidad.

7.2.5 Criterios de exclusión: Se excluyeron pacientes de todos los grupos que presenten enfermedades sistémicas adicionales a las descritas anteriormente, enfermedades infecciosas, ortodoncia, tratamiento periodontal en el último año, tratamiento antibiótico en los tres meses previos a la toma de las muestras, mujeres embarazadas o lactantes, pacientes que se rehusaron a firmar el consentimiento informado.

7.2.6 Evaluación médica: Los pacientes fueron valorados por reumatólogos del servicio de reumatología del Hospital Militar Central, cada paciente se clasificó de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología de 2010 para el diagnóstico de artritis reumatoide. Se realizó una valoración de actividad de la enfermedad con el DAS 28 (Disease Activity Score 28), SDAI (Simplified Disease Activity Index), la discapacidad funcional se valoró con el cuestionario de evaluación de la salud VAS/HAQ y conteo de articulaciones dolorosas e inflamadas.

7.2.7 Evaluación periodontal: A todos los pacientes que fueron seleccionados por reumatología se les realizó una valoración periodontal para establecer la presencia de bolsas periodontales, nivel de inserción clínico, sangrado y niveles de placa dental, esta valoración se realizó por periodoncistas calibrados. Los pacientes fueron clasificados teniendo en cuenta los criterios diagnósticos de la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y el Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC) – CDC/AAP- los cuales se basan en las mediciones de variables clínicas como profundidad al sondaje y pérdida de inserción, así (Eke et al., 2012).

No periodontitis: No evidencia de periodontitis leve, moderada o severa

Periodontitis leve: Dos o más sitios interproximales con pérdida de inserción mayor o igual a 3 mm y dos o más sitios con profundidad al sondaje mayor o igual a 4 mm (no en el mismo diente) ó un sitio inter-proximal con profundidad al sondaje mayor o igual a 5 mm.

Periodontitis moderada: Dos o más sitios interproximales con pérdida de inserción mayor o igual a 4 mm (no en el mismo diente); o dos o más sitios interproximales con profundidad al sondaje mayor o igual a 5 mm (no en el mismo diente).

Periodontitis severa: Dos o más sitios interproximales con pérdida de inserción mayor o igual a 6 mm o un sitio inter-proximal con profundidad al sondaje mayor o igual a 5.

Los pacientes se clasificaron en dos grupos para su nivel de análisis:

Grupo A por presencia o no de periodontitis

1. No periodontitis
2. Periodontitis (incluyen todos los grados)

Grupo B por severidad de la periodontitis

1. No periodontitis y periodontitis leve
2. Periodontitis moderada y periodontitis severa.

7.2.8 Muestras

- *Muestra de suero:* Se tomaron muestras de sangre periférica de todos los grupos de pacientes en tubos secos siliconados, una vez formado el coágulo sanguíneo fueron centrifugados a 1500 g durante 15 minutos. El suero se transfirió a crioviales y fueron almacenado a -20°C, de cada paciente se almacenaron varias alícuotas para garantizar que las muestras empleadas en el presente estudio nunca hayan sido descongeladas, ya que esto puede afectar la calidad del suero para la determinación de anticuerpos.
- *Muestra de placa subgingival:* Después de la valoración periodontal de todos los pacientes, se escogieron los 6 sitios más profundos en los pacientes con algún grado de periodontitis y 1 sitio por sextante en los pacientes control. Se eliminó la placa supragingival con una cureta estéril y se aisló el sitio de la muestra con rollos de algodón. Se insertaron puntas de papel absorbente (NewStetic® calibre 40) en cada bolsa durante 20 segundos. Las 6 puntas se recolectaron en un tubo eppendorf estéril para la detección de *P. gingivalis* por qPCR.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1 Detección de *P. gingivalis* en placa subgingival por PCR cuantitativa

Las muestras de placa subgingival de los dos grupos de pacientes se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. La extracción de DNA a partir de esta muestra se realizará por el método de choque térmico y serán purificadas por el método de Salting Out. El DNA será purificado y se realizará la PCR cuantitativa siguiendo las recomendaciones de Boutaga et

al, 2003. En donde se emplearan primers y sonda para el gen que codifica para 16S rRNA P.gF- 5-GCG CTC AAC GTT CAG CC-3 y P.gR, 5-CAC GAA TTC CGC CTGC-3 la secuencia de la sonda Taqman a usar será P.gS, 5-FAM-CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA-BHQ-3 como ha sido estandarizado previamente en nuestro laboratorio (Bello et al., 2016).

7.3.2 Determinación de anticuerpos anti PPAD

La determinación de los anticuerpos IgG se realizó de acuerdo con la metodología de Mouton et al, 1981 [117], se realizó la técnica de ELISA en donde 100 µg/mL de extracto de la proteína PPAD purificada fue diluida en una solución de PBS + Tween 0.1% pH 7.4 para recubrir los pozos de placas de 96 pozos de polietileno de fondo plano y se refrigeró de 4-8°C overnight. Los sitios inespecíficos se bloquearon con albumina sérica bovina (BSA) al 1.5% durante una hora en incubación a 37°C. Después de lavados se añadió el suero de cada paciente en diluciones 1:100, 1:50 y 1:25 en PBS + Tween 0.1% pH 7.4 con 0,675gr de BSA y se incubó durante una hora a 37°C. Posteriormente las placas fueron incubadas con un anticuerpo anti-IgG humana biotinilado diluido 1:10000, a 37°C por 1 hora. Luego, las placas fueron reveladas con sustrato TMB (tetrametilbencidina peroxidasa) durante 10 min y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2M. La reacción se leyó a 450 nm de absorbancia y 620nm de referencia en un lector de ELISA. Los resultados se expresaron en unidades de ELISA (UE).

7.3.3 Plan de tabulación y análisis.

Un total de 10 pacientes con artritis reumatoide fueron evaluados mediante exámenes reumatológicos y periodontales. Los niveles séricos de anticuerpos anti-PPAD se midieron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se realizó una estadística descriptiva, prueba de Chi² prueba exacta de Fisher, además de una correlación de Spearman.

a. Hipótesis estadísticas (alterna y nula)

Hipótesis Nula: La presencia de *P. gingivalis* y la PPAD no se asocian con los signos clínicos periodontales en pacientes con artritis reumatoide.

Hipótesis Alterna: La presencia de *P. gingivalis* y la PPAD se asocian con los signos clínicos periodontales en pacientes con artritis reumatoide.

b. Estadística descriptiva

Se realizó una estadística descriptiva, prueba de Chi² prueba exacta de Fisher, además de una correlación de Spearman.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En el presente proyecto se tomó muestras de suero y placa subgingival en humanos, sin embargo, es considerado de riesgo mínimo y cuenta con el aval ético de la Universidad El Bosque y del Hospital Militar Central. Las leyes y resoluciones que lo sustentan son la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y la Ley 84 de 1989 capítulo VI, Artículo 23 y 26.

a. Sustento legal

Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud: Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud con la utilización de seres humanos.

Ley 84 de 1989 capítulo VI: Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia

-Artículo 23: Los experimentos que se lleven a cabo con animales vivos, se realizarán únicamente con autorización previa del Ministerio de Salud Pública.

-Artículo 26: Para todo experimento con animales vivos deberá conformarse un comité de ética.

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado ANEXO 1

9. RESULTADOS

9.1 Fase descriptiva

De los 10 pacientes evaluados el 70% corresponden a mujeres, con una edad promedio de $58,1 \pm 4,5$, en la tabla 1 además se describe la mediana y rango intercuartil (RIQ) para las variables periodontales (tabla 1).

Tabla 1. Mediana y rango intercuartil de las variables edad y condición clínica periodontal.

Anti-PPAD	Edad	Numero de dientes	Placa	Rojo	Sangrado	Bolsas
Mediana	61	15,5	0,63	0,41	0,46	4,05
(RIQ)	(55-67)	(14-22)	(0,36-0,77)	(0,15-0,7)	(0,3-0,69)	(4-4,1)

9.2 Fase analítica

No se encontraron asociación entre los parámetros clínicos periodontales y los titulo de anticuerpos anti-PPAD. En cuanto a los parámetros clínicos articulares, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en las variables articulaciones dolorosas se encuentra un valor de $p=0.053$, adicionalmente con el índice SDAI de actividad de artritis reumatoide se encontró un valor de $p=0.082$. Estos datos podrían sugerir que los pacientes que presentan anticuerpos anti-PPAD podrían presentar mayor actividad de la artritis reumatoide (Tabla 2 a 8). No se encontró una correlación significativa entre anticuerpos anti-PPAD y los signos clínicos periodontales, ni con la presencia de *P. gingivalis* en placa subgingival y los anticuerpos anti-*P. gingivalis* (tablas 9 y 10).

Tabla 2. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y anti-CCP.

		Anti CCP			
		<20 F(%)	20-39 F(%)	40-50 F(%)	
Anti-PPAD	Negativo	0(0)	3(75)	1(25%)	* $p \leq 0.05$ Chi ² /Fisher
	Positivo	2(33,3)	4(66,6)	0(0)	

Tabla 3. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y articulaciones dolorosas.

		Articulaciones dolorosas	
		Negativo F(%)	Positivo F(%)
Anti-PPAD	Negativo	3(75)	1(25)
	Positivo	6(100)	0(0)

* $p \leq 0.05$ Chi²/Fisher

Tabla 4. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y articulaciones inflamadas.

		Articulaciones inflamadas	
		Negativo F(%)	Positivo F(%)
Anti-PPAD	Negativo	2(50)	2(50)
	Positivo	6(100)**	0(0)

* $p \leq 0.05$ Chi²/Fisher

** $p = 0,053$

Tabla 5. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y DAS28.

		DAS28	
		Negativo F(%)	Positivo F(%)
Anti-PPAD	Negativo	2(50)	2(50)
	Positivo	4(66,6)	2(33,3)

* $p \leq 0.05$ Chi²/Fisher

Tabla 6. Asociación entre la presencia de anti-PPAD, VAS y HAQ.

		VAS/HAQ	
		Negativo F(%)	Positivo F(%)
Anti-PPAD	Negativo	4(100)	0(0)
	Positivo	6(100)	0(0)

* $p \leq 0.05$ Chi²/Fisher

Tabla 7. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y SDAI.

		SDAI		
		<3,3 F(%)	3,3-11 F(%)	>11 F(%)
Anti-PPAD	Negativo	1(25)	3(75)	0(0%)
	Positivo	0(0%)	2(33,3)	4(66,6)**

* $p \leq 0.05$ Chi²/Fisher

** $p=0,082$

Tabla 8. Asociación entre la presencia de anti-PPAD y las variables periodontales.

Anti-PAD	Placa			Rojo			Sangrado		
	0-30 F(%)	30-50 F(%)	>50 F(%)	0-30 F(%)	30-50 F(%)	>50 F(%)	0-30 F(%)	30-50 F(%)	>50 F(%)
Negativo	1(25)	0(0)	3(75)	2(33,3)	0(0)	2(50)	1(25)	1(25)	2(50)
Positivo	2(33,3)	1(16,6)	3(50)	2(33,3)	1(16,6)	3(50)	3(50)	1(16,6)	2(33,3)

* $p \leq 0.05$ Chi²/Fisher

Tabla 9. Correlación de Spearman para edad, anticuerpos séricos y presencia de *P. gingivalis*.

	Anti-PPAD	Edad	Anti Pg IgG1	Anti Pg IgG2	Pg Log10	Anti CCP
Anti-PPAD	1.000					
Edad	0,0359	1.000				
Anti Pg IgG1	-0,0507	-0,3055	1.000			
Anti Pg IgG2	0,2009	-0,6364	0,3082	1.000		
Pg Log10	-0,0758	0,0783	0,6275	0,0951	1.000	
Anti CCP	-0,1439	0,0743	0,4203	0,229	0,7527	1.000

Tabla 10. Correlación de Spearman variables periodontales.

	Anti-PPAD	Numero de dientes	Placa	Rojo	Sangrado	Bolsas
Anti-PPAD	1.000					
Numero de dientes	-0,1782	1.000				
Placa	-0,2138	-0,2744	1.000			
Rojo	-0,0713	-0,1402	0,9146	1.000		
Sangrado	-0,2843	-0,1337	0,8389	0,8997	1.000	
Bolsas	0,0722	0,6142	-0,4568	-0,3087	-0,2277	1.000

10. DISCUSIÓN

Diversos estudios evidencian que la Artritis Reumatoide está asociada con una alta prevalencia de Enfermedad Periodontal (Laugisch et al., 2016). Esto se puede atribuir al descubrimiento de la PPAD, que es singularmente expresada por *P. gingivalis* la cual influye fuertemente en el sistema inmunológico induciendo la producción de autoantígenos que conducen la autoinmunidad en RA (Potempa J et al., 2017). En el presente estudio cinco de los diez pacientes que presentaban AR fueron diagnosticados con enfermedad periodontal lo que corrobora la existencia de una asociación entre estas dos enfermedades.

La edad media de los pacientes con AR fue de 57 años, con un rango intercuartil que oscila entre los 52 y los 62 años de edad. Estos resultados son similares a los datos reportados por estudios epidemiológicos en pacientes con AR, donde reportan que la aparición de la enfermedad presenta un pico en la quinta década de la vida. Por otra parte, informan que la incidencia de la AR es mayor en mujeres que en hombres con una relación de 2:1 hasta aproximadamente 3:1 (Alamanos et al., 2005), que ajustado a los datos epidemiológicos de esta investigación se halló una concordancia, al encontrar que 8 de los 10 pacientes con AR eran mujeres, y 2 eran hombres.

Los anticuerpos anti-PPAD son comunes en pacientes con AR, la importancia de la respuesta del anticuerpo contra este factor de virulencia bacteriana para la enfermedad periodontal asociada a la AR no está clara. En esta investigación, los anticuerpos anti-PPAD no se correlacionaron con la actividad de la enfermedad en los que se tuvieron encuentra índices articulares como dolor e inflamación articular, DAS28, VAS, HAQ y SDAI, lo que refuerza que los anticuerpos anti-PPAD no son parte de la respuesta ACPA (Konig et al., 2015). Sin embargo, hay una tendencia con SDAI y articulaciones dolorosas que podrían asociarse significativamente aumentando el tamaño de la muestra.

Los anticuerpos anti-CCP son asociados con la gravedad de la enfermedad en la AR y se ha postulado que desempeñan un papel patógeno en el proceso de la enfermedad al formar complejos inmunitarios con proteínas citrulinadas que producen la liberación de

mediadores de la inflamación y la destrucción de las articulaciones en la AR (Mikuls et al., 2009). Estudios recientes demostraron que el anticuerpo anti-CCP se encuentra tanto en tejidos periodontales como en los tejidos sinoviales en pacientes con AR, lo que sugiere la presencia de asociación entre los anticuerpos anti-CCP, la enfermedad periodontal y la AR.

(Mohamad et al., 2018). De manera similar a este estudio, observamos una correlación débil debido al tamaño de muestra tan limitado, pero significativa al encontrar que los pacientes con AR que presentaban enfermedad periodontal, tenían anticuerpos anti-CCP, lo cual constata la existencia de una correlación entre estas tres variables de estudio.

Ryan et al, realizaron un estudio en 702 pacientes en donde demostraron que los participantes con un número de dientes perdidos ≥ 5 , experimentaban mayores probabilidades de AR (Demmer et al., 2011). Adicional a esto una revisión sistemática realizada por Kaur y colaboradores reafirmó que el aumento de la pérdida de dientes era más común en individuos con AR que en aquellos sin AR (Kaur et al., 2013). Esta información confirma los resultados obtenidos en nuestro estudio en donde se evidencia una mediana de 16 y un rango intercuartil de 8 a 21 para el número de dientes presentes en cavidad oral de los pacientes evaluados.

Varios estudios han demostrado que la AR afecta la condición periodontal ya que los pacientes con AR tienen una salud periodontal significativamente más deficiente en comparación con pacientes saludables. Puesto que la deficiente higiene oral aumenta el riesgo de periodontitis, es probable que la pérdida de motricidad manual causada por una AR grave disminuya la capacidad de realizar una correcta higiene oral, lo que conlleva al deterioro de la salud bucal. (Hashimoto H et al., 2018). Esta información soporta los resultados obtenidos en el índice de placa, en donde 8 de los 10 pacientes con RA presentaban placa bacteriana lo que corresponde a una mediana de 0.5 y un rango intercuartil de 0-0,73.

11. CONCLUSIONES

La mayoría de los pacientes con artritis reumatoide evaluados fueron positivos para anticuerpos anti-PPAD, sin embargo, no hay asociaciones significativas con los parámetros clínicos periodontales y articulares. Aunque hay una tendencia con SDAI y articulaciones dolorosas que podrían asociarse significativamente aumentando el tamaño de la muestra.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bello JM, Lafaurie GI, Hoyos L, Castillo DM, De-Avila J, Munevar JC, Urniza S, Londoño J, Valle-Oñate R, Romero-Sanchez MC. Periodontal disease in subjects with genetic risk to develop arthritis and early rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J periodontol*, 87:346-456, 2016.
2. Bingham III, C. O., & Moni, M. (2013). Periodontal disease and rheumatoid arthritis: the evidence accumulates for complex pathobiologic interactions. *Current opinion in rheumatology*, 25(3), 345.
3. B. G. Loos, R. P. John, and M. L. Laine, "Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 32, supplement 6, pp. 159–179, 2005.
4. Borgnakke, Wenche S., DDS, MPH, PhD, Glick, M., DMD, & Genco, Robert J., DDS, PhD. (2013). periodontitis. *The Journal of the American Dental Association (JADA)*, 144(7), 764-766. 10.14219/jada.archive.2013.0180
5. Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57-80.
6. Cuéllar H, Victoria M, Cuéllar H, María I, Amaro Hernández R. *Revista Cubana de Reumatología*. 2013 04/;15(1):30-35.
7. Darrah, E., & Andrade, F. (2018). Rheumatoid arthritis and citrullination. *Current opinion in rheumatology*, 30(1), 72–78. doi:10.1097/BOR.0000000000000452
8. Detert, J., Pischon, N., Burmester, G. R., & Buttgereit, F. (2010). The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis research & therapy*, 12(5), 218.
9. Delgado-Vega, A. M., Martín, J., Granados, J., & Anaya, J. M. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿Qué esperar de América Latina?. *Biomédica*, 26, 562-584. 2006.

10. De Smit, M. J., Brouwer, E., Vissink, A., & van Winkelhoff, A. J. (2011). Rheumatoid arthritis and periodontitis; a possible link via citrullination. *Anaerobe*, 17(4), 196-200.
11. Detert, J., Pischon, N., Burmester, GR, y Buttgereit, F. (2010). La asociación entre la artritis reumatoide y la enfermedad periodontal. *Arthritis research & therapy* , 12 (5), 218.
12. Eriksson, K., Lönnblom, E., Tour, G., Kats, A., Mydel, P., Georgsson, P., ... & Lundmark, A. (2016). Effects by periodontitis on pristane-induced arthritis in rats. *Journal of translational medicine*, 14(1), 311.
13. Gabarrini, G., de Smit, M., Westra, J., Brouwer, E., Vissink, A., Zhou, K., ... van Winkelhoff, A. J. (2015). The peptidylarginine deiminase gene is a conserved feature of *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific reports*, 5, 13936. doi:10.1038/srep13936
14. Gregory J Tsay , Shih-Hong Siao , Yi-Hsuan Lee , Justin Sun , Yu-Chao Chang , Jonathan Chen , Joung-Liang Lan , Jinghua Tsai Chang , Moncef Zouali. Anticuerpo contra HA4 de la gingipaína de *Porphyromonas gingivalis* es un posible biomarcador para la artritis reumatoide Anticuerpo contra HA4 de la gingipaína de *Porphyromonas gingivalis* es un posible biomarcador para la artritis reumatoide. *The Journal of Immunology* 1 de mayo de 2017, 198 (1 Suplemento) 55.1
15. G. N. Belibasakis, D. Reddi, and N. Bostanci, “*Porphyromonas gingivalis* induces RANKL in T-cells,” *Inflammation*, vol. 34, no. 2, pp. 133–138, 2011.
16. Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30-44.
17. J. D. Baia, R. S. Lemos, A. B. Moreira, M. A. Gioso. (2017) Periodontal disease: Literature review. *Scientific Electronic Archives*. Vol. 10 (5)
18. König, M. F., Paracha, A. S., Moni, M., Bingham, C. O., & Andrade, F. (2014). Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(11), 2054–2061. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205385

19. Koziel, J., Mydel, P., & Potempa, J. (2014). The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Current rheumatology reports*, 16(3), 408. doi:10.1007/s11926-014-0408-9
20. Loreto, C. Marissa L. Ben W. Rheumatoid arthritis. (2010). *Best practice & Research clinical rheumatology*. Vol 24 (6).
21. Leech, M. T., & Bartold, P. M. (2015). The association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 29(2), 189-2015.
22. Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*; 12:2-9, 2010.
23. Maresz KJ , Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J, Gawron K, Mizgalska D, Marcinska KA, Benedyk M, Pyrc K, Quirke AM, Jonsson R, Alzabin S, Venables PJ, Nguyen KA, Mydel P, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS Pathog*. 2013. 9:e1003627.
24. McInnes, Iain B., and Georg Schett. "The pathogenesis of rheumatoid arthritis." *New England Journal of Medicine* 365.23 (2011): 2205-2219
25. Montgomery AB, Kopec J, Shrestha L, Thezenas ML, Burgess-Brown NA, Fischer R, Yue WW, Venables PJ. Crystal structure of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015. pii: annrheumdis-2015-207656. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207656
26. Monsarrat, P., Vergnes, JN, Blaizot, A., Constantin, A., de Grado, GF, y Ramambazafy, H. (2014). El estado de salud oral en pacientes ambulatorios con artritis reumatoide: el estudio OSARA. *Oral Health Dent Manag* , 13 (1), 113-9.
27. Niemiec, B. A. (2008). Periodontal disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2), 72-80.
28. Olsen, I., Singhrao, S. K., & Potempa, J. (2018). Citrullination as a plausible link to periodontitis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Journal of oral microbiology*, 10(1), 1487742. doi:10.1080/20002297.2018.1487742

29. Preshaw, P. M., & Bissett, S. M. (2013). Periodontitis: oral complication of diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 42(4), 849-867.
30. Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Potempa J, Culshaw S, Guo Y, Fisher BA, Thiele G, Mikuls TR, Venables PJ. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidyl argininedeiminase: potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. Ann Rheum Dis; 73:263-269. 2014.
31. R. J. Genco and W. S. Borgnakke, "Risk factors for periodontal disease," *Periodontology* 2000, vol. 62, no. 1, pp. 59-94, 2013.
32. Smolen, JS, Aletaha, D., y McInnes, IB (2016). Artritis Reumatoide. *The Lancet*, 388(10055), 2023-2038.
33. Scott, DL, Wolfe, F., y Huizinga, TWJ (2010). Artritis Reumatoide. *The Lancet*, 376(9746), 1094-108.
34. T. Yucel-Lindberg and T. Bage, "Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 15, article e7, pp. 1-13, 2013.
35. Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H. and Martínez Cadillo, E. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*, 14(1), p.34.
36. Wilensky D, Hourii-Haddad, Y, Shapira, L. AP. The role of RgpA in the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* in the murine periodontitis model. *J Clin Periodontol* 40:924-932; 2013.
37. Eke PI1, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2012 Dec;83(12):1449-54.
38. Bautista Molano, W., Unriza Puin, S., Carlos Munevar, J., Lafaurie, G., Valle Oñate, R. and Romero Sánchez, M. (2012). Papel de la enfermedad periodontal en el desarrollo de entidades inflamatorias de etiología autoinmune: implicaciones clínicas y desafíos terapéuticos. *Revista Colombiana de Reumatología*, 19(2), pp.84-91.

39. Laugisch, O., Wong, A., Sroka, A., Kantyka, T., Koziel, J., Neuhaus, K., & Eick, S. (2016). Citrullination in the periodontium a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clinical oral investigations*, 20(4), 675-683.
40. Mikuls, T. R., Payne, J. B., Reinhardt, R. A., Thiele, G. M., Maziarz, E., Cannella, A. C., & O'Dell, J. R. (2009). Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *International immunopharmacology*, 9(1), 38-42.
41. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2017;13(10):606-620.
42. Konig, M. F., Paracha, A. S., Moni, M., Bingham, C. O., & Andrade, F. (2015). Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(11), 2054-2061.
43. Mohamad, W. M. W., Jia, S. K., Ghazali, W. S. W., & Taib, H. (2018). Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Periodontal Status in Rheumatoid Arthritis Patients. *Pakistan journal of medical sciences*, 34(4), 907.
44. Alamanos, Y., & Drosos, A. A. (2005). Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*, 4(3), 130-136.
45. Hashimoto H, Hashimoto S, Muto A, Dewake N, Shimazaki Y. Influence of plaque control on the relationship between rheumatoid arthritis and periodontal health status among Japanese rheumatoid arthritis patients. *Journal of Periodontology*. 2018;89(9):1033-1042.
46. Demmer, R. T., Molitor, J. A., Jacobs Jr, D. R., & Michalowicz, B. S. (2011). Periodontal disease, tooth loss and incident rheumatoid arthritis: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiological follow-up study. *Journal of clinical periodontology*, 38(11), 998-1006.
47. Kaur, S., White, S., & Bartold, P. M. (2013). Periodontal disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Journal of dental research*, 92(5), 399-408.

13. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE LA MUESTRA DE SANGRE Y DE LA ENCÍA PARA UN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN PACIENTES CON ARTRITIS.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Diana Marcela Castillo Perdomo, MSc, Microbiología, cPhD Biotecnología. Teléfono: 633-1368 ext 1521-1345 Universidad El Bosque, celular 300 201 59 97

CO-INVESTIGADORES RESPONSABLES POR UNIVERSIDAD PARTICIPANTE:

Gloria Inés Lafaurie Odontóloga Periodoncista, MSc, epidemiología. Universidad El Bosque.

María Consuelo Romero Sánchez: MSc, PhD. Universidad El Bosque. Cel. 3127771226

Yormaris Castillo: Bcl. Universidad El Bosque. Cel.3002448538

Eliana Patricia Calvo: Química, PhD Química. Universidad El Bosque. Cel. 3016299915

Nathaly Andrea Delgadillo: Bcl. Universidad El Bosque. Cel.3182200539

Wilson A. Bautista: M Reumatólogo – Universidad Militar Nueva Granada Cel. 313 496 4245

Rafael Valle: Médico Reumatólogo. Hospital Militar Central Cel.3153527618

Juan Manuel Bello: Médico Reumatólogo. Hospital Militar Central Cel. 3208094232

Philippe Chalem: Médico Reumatólogo. Fundación Instituto de Reumatología Fernando Chalem Cel. 315 337 13 38

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Asociación entre la proteasa RgpA y la enzima asociada a procesos de citrulinación PPAD de *Porphyromonas gingivalis* y su impacto en pacientes en

artritis reumatoide.

El presente es un formato de aceptación para que mi muestra sea usada en un estudio sobre artritis, que a diferencia del que ya he participado se realizarán pruebas adicionales asociadas a determinar si algunos componentes de una bacteria que genera enfermedad en la boca puede influenciar el desarrollo de artritis. El término artritis agrupan a una serie de enfermedades que tienen como principal manifestación la inflamación de las articulaciones de la columna y en algunos casos de las manos, muñecas y codos, Se cree que infecciones en la boca pueden estar relacionadas con estas enfermedades. Por lo tanto, la muestra tomada de sangre y de su encía será estudiada para ver el contenido de sustancias y microorganismos que pueden ayudar a controlar y entender estas enfermedades.

Conozco que para el manejo actual correcto como paciente con artritis o como individuo sano sistémicamente, es importante que mis muestras de sangre y de la encía, sean analizadas para otras pruebas diferentes a las que ya le han hecho, por lo tanto autorizo para que una parte de la muestra sea usada en el estudio y en otros estudios que se deriven de esta investigación.

Tengo claro que no requeriré evaluaciones médicas a las ya hechas a mí para el protocolo de investigación en el que participe previamente.

Muestras de placa bacteriana y líquido crevicular: Las muestras de la placa dental al igual que el líquido se encuentra debajo de las encías fueron tomadas en varias áreas de su boca usando instrumentos dentales estériles para identificar una de las bacterias que generan enfermedad en sus encías. El procedimiento para tomar las muestras fue similar a una limpieza dental y se tomó una pequeña muestra de la placa dental y de líquido crevicular introduciendo una punta de papel absorbente especializadas para esta toma. Este procedimiento no es doloroso, algunas veces se siente una pequeña molestia.

Toma de sangre. Las muestras fueron tomadas el mismo día por una persona experta de manera similar a una muestra de sangre que se toma de rutina, el suero proveniente de

mi muestra se

encuentra almacenada a -20°C bajo custodia de la Investigadora principal del protocolo investigación en el que voluntariamente estoy participando.

COMPENSACIÓN: Usted no recibirá dinero por participar en el estudio, pero mi ayuda en el futuro podría beneficiar a los pacientes con artritis, al obtenerse resultados científicos y saber si las infecciones de la boca pueden afectar la enfermedad. Los costos del examen microbiológico y el examen de sangre para evaluar sus defensas serán cubiertos por el estudio. Otros procedimientos para tratar la enfermedad que se realizarán posteriormente no serán cubiertos.

RIESGOS: Usted debe entender que no correrá riesgos, las muestras que usted aportó para proyectos anteriores (Marcadores de actividad de la enfermedad reumática y aspectos clínicos y microbiológicos de la enfermedad periodontal. Código 130854531734 de Colciencias y Seguimiento de la actividad clínica reumática en individuos con riesgo de desarrollar Artritis Reumatoide y de pacientes en estados tempranos de la enfermedad asociados a indicadores periodontales. Código 130865740792 de Colciencias) serán las que se usaran en el presente, por lo que no se harán nuevas tomas de muestras.

BENEFICIOS: La información obtenida de este estudio será muy importante para establecer el tipo de bacterias que pueden causar la afección de sus encías y necesita tratamiento a seguir para el control de sus encías. También se le harán exámenes de sangre para evaluar el estado en que se encuentran sus defensas y la actividad de su artritis.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información obtenida en este estudio se mantendrá estrictamente confidencial, con la excepción de que la Ley requiera la información. Si existe alguna publicación como resultado de este estudio, usted no será identificado por su nombre.

COMPLICACIONES: Usted no tendrá complicaciones generadas por este nuevo protocolo, debido a que no habrá una nueva intervención ni toma de muestras.

RETIRO DEL ESTUDIO: Usted está de acuerdo en que su participación en este estudio es completamente voluntaria y que puede retirarse del mismo en cualquier momento avisando con tiempo a los investigadores. Esta decisión no lo afectará en el presente o futuro. Es posible que alguno de los investigadores pueda retirarlo del estudio si es necesario al encontrar alguna situación que lo requiera para su beneficio.

DERECHOS DE LA PERSONA: A usted se le ha dado la oportunidad de preguntar acerca de este estudio y de su participación en él. Tiene derecho a que sus preguntas se respondan a su completa satisfacción. Usted debe hacer sus preguntas ahora antes de firmar este documento o en cualquier momento después de firmarlo. Si usted desea alguna otra información o tiene preguntas acerca de los derechos de una persona que participa en investigación, puede contactar a los investigadores encargados en cada Universidad en cualquier momento a los números de teléfono que se encuentran en la parte inicial del documento. No habrá subordinación en los pacientes de las fuerzas militares

ACUERDO: Yo he leído y entendido este informe de consentimiento. Estoy de acuerdo en que voy a participar en este estudio de investigación. Cuando firme este documento recibiré una copia de este informe de consentimiento.

_____/_____/_____/_____

Nombre del Participante

cédula

Firma

Fecha

Dirección

teléfono

____/____/____

Nombre del Testigo 1 y cédula

Firma

Fecha

Dirección y teléfono

____/____/____

Nombre del Testigo 2 y cédula

Firma

Fecha

Dirección y teléfono

Diana Marcela Castillo Perdomo
Investigador Principal

**En caso de inquietud comunicarse con: Responsable proyecto: Diana
Marcela Castillo Perdomo, cel 3002015997.**