



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Presencia de RgpA, anticuerpos anti- RgpA y su asociación con artritis reumatoide**

**Diana Marcela Castillo Perdomo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Doctorado en Biotecnología  
Bogotá D.C, Colombia

2022



# **Presencia de RgpA, anticuerpos anti-RgpA y su asociación con artritis reumatoide**

**Diana Marcela Castillo Perdomo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Biotecnología**

Director:

Ph.D., MSc, OD. Jaime Eduardo Castellanos Parra

Codirectora:

Ph.D., MSc, BcL. María Consuelo Romero Sánchez

Línea de Investigación:

Microbiología Oral-Medicina Periodontal

Grupo de Investigación:

Unidad de Investigación Básica Oral-UIBO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Doctorado en Biotecnología

Bogotá D.C, Colombia

2022



*“El éxito en la vida no se mide por lo que logras  
sino por los obstáculos que superas”*

*Laureano Gallardo*

*A mi familia que ha sido mi soporte en este  
proceso. A mis padres Nancy y Jaime. A mi  
amado esposo Freddy y mi bella hija Luciana  
que llevo a traer luz en el camino. A mi mono  
David y a mi hermana.*

*Ustedes son mi motor y mi serotonina diaria.*



## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Diana Marcela Castillo Perdomo

Fecha 07/10/2022

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue desarrollado gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación-Minciencias, mediante el contrato 642-2017, código 130874455642, además de la Universidad El Bosque, Vicerrectoría de Investigaciones Proyecto UB 405-2016, el Hospital Militar Central proyecto HMC 2016-018 y a la Fundación Instituto De Reumatología Fernando Chalem.

Agradezco a la Universidad El Boque, a la Vicerrectoría de investigaciones y a la Facultad de Odontología por apoyar y patrocinar económicamente mi formación doctoral al 100%. A la Dra. María Clara Rangel que desde el inicio de este proceso apoyo este proyecto.

Quiero agradecer a los pacientes y a los individuos sanos que aceptaron participar en este estudio y donaron sus muestras para el avance en el entendimiento de la Artritis reumatoidea.

A los médicos reumatólogos, especialmente al Dr. Wilson Bautista y al Dr. Juan Manuel Bello, por su gran labor en la valoración clínica de los pacientes e individuos sanos incluidos en este trabajo.

A las periodoncistas que realizaron la valoración clínica periodontal de los pacientes e individuos sanos incluido en este trabajo.

De manera muy especial agradezco a mi director, el Dr. Jaime Castellanos, que ha sido mi maestro no solo en este proceso de formación, sino desde el inicio de mi vida profesional, como se lo he manifestado en varias oportunidades MIL GRACIAS, por mostrarme la luz al final del túnel, por ser el “para rayos” y por su confianza. Gracias por todo el apoyo y por sus ideas maravillosas para sacar adelante todos los procesos metodológicos que no fueron fáciles de lograr, con su ayuda, su tiempo, energía positiva y orientación los pudimos superar de manera exitosa.

A mi codirectora la Dra. Consuelo Romero por su confianza desde el inicio de la línea de investigación, confió en mí como apoyo en sus proyectos previos a este y me dio su voto de confianza en este planteamiento dentro de su línea de investigación. Le agradezco por su colaboración en la consecución de la población incluida en este trabajo, por ser la conexión con los clínicos, por toda la organización y logística en la toma, embalaje,

## Agradecimientos

---

trasporte y almacenamiento de las muestras, consecución y organización de los datos clínicos y posterior interpretación de los resultados.

A la Dra. Gloria Lafaurie, no tengo sino palabras de agradecimiento, por ella inicié este proceso de formación doctoral y gracias a ella logré culminarlo con éxito a pesar de los tropiezos. Gracias Doc por 20 años de aprendizaje, por toda su confianza, usted día a día me ha retado y me ha llevado hasta donde no me lo imagine, gracias por llamarme su “mano derecha” para mi es un honor serlo. Gracias por este diseño experimental, por el análisis de los datos, por ayudarme a darle un sentido a todos los datos obtenidos desde la estadística, la epidemiología y aterrizarlos a la medicina periodontal.

A mi super equipo de trabajo Nathaly, Yormaris y Yineth por su apoyo, por cubrirme en las demás actividades en el laboratorio y con las clases cuando debía dedicar más tiempo a este trabajo, por su apoyo técnico en diferentes procesos que se realizaron durante este tiempo, por las largas jornadas experimentales, por sus palabras de apoyo y de animo cuando los experimentos no fluían adecuadamente. Sin ustedes y su gran apoyo hoy no estaría entregando este documento.

A la Dra. Myriam Lucia Velandia del Grupo de Virología, muchas gracias por tu colaboración desinteresada en el manejo ético, responsable y amoroso de los animales para la obtención de los antisueros, no lo hubiera hecho sin ti. Gracias por todos los préstamos, por ofrecer los equipos e incluso materiales a brazos abiertos para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Eliana Calvo, por sus enseñanzas maravillosas en la producción de proteínas recombinantes, aprendí mucho de ti, ojalá en el futuro pueda aprender muchos más.

A La Dra. Zayda Corredor, por tu ayuda fundamental en un momento en el que lo necesitaba, mil gracias por tus enseñanzas en la producción de proteínas recombinantes, por los préstamos, por la paciencia, el tiempo porque gracias a esto las recombinantes fluyeron.

A Katterine Ospina Garcia y posteriormente a Carlos Nieto quienes me entrenaron en el manejo del equipo de FPLC-BioLogic DuoFlow™ (BioRad) y en un comienzo me apoyaron para la ejecución de las cromatografías. A en este mismo sentido al Dr. Javier Escobar director del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana, por permitirme el uso de este equipo.

A mis compañeros del Instituto UIBO, por su apoyo durante mi formación doctoral, por sus palabras de aliento y colaboración en todo momento.

En la Vicerrectoría de Investigaciones agradezco por su apoyo al Dr. Miguel Otero por su apoyo, a Lili y a Carito que siempre estuvieron dispuestas a colaborar en todo lo administrativo, al Dr. Fabian Cortez y a la Dra. Diana Granados por sus aportes en los informes parciales y el final para Minciencias.

Al Doctorado en Biotecnología, a la Profesora Sonia Ospina y al Profesor Daniel Uribe, por sus aportes y porque desde la dirección del programa me ayudaron para culminar con éxito mi formación doctoral. A los demás profesores del programa, al comité tutorial por sus valiosos aportes en este trabajo. A Raquel porque sin tu gestión y organización permites que los procesos sean más amigables.

Agradezco infinitamente a mi Dios, que me dio esta oportunidad por la fuerza, perseverancia y persistencia que me permiten hoy culminar este proceso.

A Tamara Asprilla, por ayudarme a hacer las paces con el proceso en el momento mas critico en el que pensé no continuar, gracias porque me enseñaste a no perder la paz.

A mi gran amiga Yamile Adriana, por el apoyo incondicional y las palabras de ánimo, por recordarme que nada debe alejarme de lo esencial y lo prioritario, como a la familia la de sangre y la que la vida nos regala, gracias por sacarme de la rutina y por alivianar las cargas.

A Camilo Asprilla por todas las agujitas que fueron y siguen siendo de gran ayuda, gracias por los raticos de esparcimiento.

Por ultimo y no menos importante a mi familia, por el apoyo incondicional, por ser mi motor, mi camino, mi luz en el camino. A mis papas por todo, por colaborar con mi hija en momentos críticos de experimentos largos y de escritura de los documentos en que debía ausentarme. A mi esposo, porque sin su paciencia infinita y su amor incondicional esto no hubiera sido posible, por las ausencias y el tiempo, por las palabras de aliento y las felicitaciones. A mi pedacito de vida, Luciana, llegaste a medio de este proceso a enseñarme que a veces hay que hacer un alto en el camino para recargar las energías y poder tomar de nuevo el rumbo con mucha más luz, gracias por ser mi alegría y por ceder parte de nuestro tiempo juntas para que mami pueda cumplir sus sueños. A mi mono David, por estar ahí, por sus abrazos cuando estoy cansada, sus palabras de aliento y por permitirme ser un ejemplo para seguir. A mi hermana, por estar presente y porque me hace saber que soy la hermana “ñoña” de la que se siente orgullosa.

## Resumen

### Presencia de RgpA, anticuerpos anti-RgpA y su asociación con artritis reumatoide

Estudios clínicos y epidemiológicos han corroborado la asociación bidireccional entre la artritis reumatoide (AR) y la periodontitis. Esta asociación es atribuida a *Porphyromonas gingivalis*, por la presencia de la enzima peptidil arginina deiminasa (PPAD) y con la actividad de las Arg-gingipaínas en la citrulinación, vinculadas con el quiebre de la tolerancia inmunológica en la AR. Se ha confirmado que los anticuerpos anti-*P. gingivalis* acompañan el desarrollo de la AR. Sin embargo, pocos estudios indagan la asociación de factores de virulencia específicos de esta bacteria con la AR. En este estudio hemos producido la PPAD de manera recombinante y purificado la gingipaína RgpA nativa a partir de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis* ATCC33277, la actividad enzimática se evaluó con sustratos fluorogénicos. La presencia de las proteínas se confirmó por SDS-PAGE y Western Blot y fueron usadas como antígenos en la detección de los anticuerpos contra estos factores de virulencia mediante ELISA en 143 pacientes con AR y 112 individuos sin AR. Se encontraron diferencias significativas en los títulos de anti-RgpA entre los dos grupos y se determinó asociación con el diagnóstico de AR (OR 4.09; IC 95% 1.2-13.9), mientras que los anti-PPAD no presentan diferencias. La interacción anti-RgpA/anti-PPAD se asoció con diagnósticos de AR (OR 6.63; IC 95% 1.61-27). Además, se purificaron con éxito los dos factores de virulencia de *P. gingivalis* y se desarrolló el ELISA, permitiendo la detección de los anticuerpos frente a estas proteínas. Los anticuerpos anti-RgpA y la doble positividad de los anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD pueden ser marcadores diagnósticos de la AR.

**Palabras clave:** *Porphyromonas gingivalis*, Gingipaínas, RgpA, PPAD, Artritis Reumatoidea, Periodontitis.

## Abstract

### Presence of RgpA, anti-RgpA antibodies and their association with rheumatoid arthritis

Clinical and epidemiological studies have confirmed the bidirectional association between rheumatoid arthritis (RA) and periodontitis. This association is attributed to *Porphyromonas gingivalis*, due to the presence of peptidyl arginine deiminase (PPAD) together with the action of Arg-gingipains in citrullination, linked to the alteration of immunological tolerance in RA. It has been confirmed that anti-*P. gingivalis* accompany the development of RA. Nevertheless. Few studies investigate the association of specific virulence factors of this bacterium with RA. In this study we have recombinantly produced PPAD and purified native RgpA gingipain from outer membrane vesicles of *P. gingivalis* ATCC33277, the enzymatic activity was evaluated with fluorogenic substrates. The presence of the proteins was confirmed by SDS-PAGE and Western Blot and they were used as antigens in the detection of antibodies against these virulence factors by ELISA in 143 patients with RA and 112 individuals without RA. Significant differences were found in anti-RgpA titers between the two groups and an association with RA was determined (OR 4.09; 95% CI 1.2-13.9), while anti-PPAD did not present differences. The anti-RgpA/anti-PPAD interaction was associated with RA diagnoses (OR 6.63; 95% CI 1.61-27). In addition, the two virulence factors of *P. gingivalis* were successfully purified and the ELISA was developed, allowing the detection of antibodies against these proteins. Anti-RgpA antibodies and the double positivity of anti-RgpA/anti-PPAD antibodies can be diagnostic markers of RA.

**Keywords:** *Porphyromonas gingivalis*, Gingipains, RgpA, PPAD, Rheumatoid arthritis, Periodontitis.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Asociación ente periodontitis y artritis reumatoidea</b> .....	<b>6</b>
1.1 Generalidades de la periodontitis .....	6
1.1.1 Microorganismos asociados a la periodontitis .....	7
1.2 Generalidades de la artritis reumatoidea .....	9
1.2.1 Proceso de citrulinación.....	11
1.3 Evidencia entre la asociación de periodontitis y AR.....	13
1.3.1 Evidencia confirmada en modelos animales .....	13
1.3.2 Evidencia epidemiológica entre AR y periodontitis.....	16
1.4 Conclusión .....	18
<b>2. Producción y purificación de peptidilarginina deiminasa (PPAD) recombinante de <i>Porphyromonas gingivalis</i></b> .....	<b>19</b>
2.1 Materiales y métodos .....	21
2.1.1 Amplificación de los fragmentos N-terminal y C-terminal de PPAD por PCR .....	21
2.1.2 Clonación de PPAD-NT y PPAD-CT .....	22
2.1.3 Inducción de la expresión de PPAD- NT y PPAD-CT en <i>E. coli</i> BL21 .....	24
2.1.4 Purificación de la PPAD-NT y PPAD-CT.....	24
2.2 Resultados .....	25
2.2.1 Amplificación de los fragmentos PPAD -NT y PPAD-CT por PCR .....	25
2.2.2 Confirmación de la dirección de inserto en el pET por PCR y secuenciación.....	26
2.2.3 Inducción en la expresión de PPAD-NT y PPAD-CT.....	27
2.2.4 Purificación de PPAD-NT y PPAD-CT .....	28
2.3 Discusión .....	29
2.4 Conclusión .....	32
<b>3. Purificación de RgpA a partir de vesículas de membrana externa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Castillo et al., 2022)</b> .....	<b>33</b>
3.1 Materiales y métodos .....	35
3.1.1 Obtención de anticuerpos policlonales anti-HA1 .....	35
3.1.2 Purificación de vesículas de membra externa de <i>P. gingivalis</i> y confirmación de actividad de proteasa .....	37
3.1.3 Cromatografía en fase líquida (FPLC) de intercambio iónico .....	37
3.2 Resultados .....	38
3.2.1 Caracterización de las OMV purificadas y los anticuerpos anti-H1 .....	38
3.2.2 Purificación de RgpA por FPLC .....	40
3.3 Discusión .....	42
3.4 Conclusión .....	44

---

<b>4. Interacción de los títulos de anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD: su potencial como indicador de riesgo en el diagnóstico de la artritis reumatoide</b> .....	<b>45</b>
4.1 Materiales y Métodos.....	46
4.1.1 Tipo de estudio.....	46
4.1.2 Población y muestra.....	47
4.1.2.1 Criterios de inclusión para individuos con AR y controles sanos sistémicamente .....	47
4.1.2.2 Criterios de exclusión.....	47
4.1.3 Evaluación clínica periodontal .....	49
4.1.4 Identificación y cuantificación de <i>P. gingivalis</i> en placa subgingival.....	49
4.1.5 Medición de biomarcadores de artritis reumática.....	49
4.1.6 Detección de anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD por ELISA .....	50
4.1.7 Análisis estadístico.....	51
4.2 Resultados.....	51
4.3 Discusión .....	59
4.4 Conclusión.....	62
<b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>63</b>
5.1 Conclusiones .....	63
5.2 Recomendaciones .....	64
<b>A. Anexo: Publicaciones derivadas de este estudio.....</b>	<b>65</b>
<b>B. Anexo: Aprobación comité de ética .....</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>72</b>

## Lista de figuras

Pág.

**Figura 1-1:** Esquema actualizado de complejos microbianos orales. La codificación por colores de los grupos bacterianos se basó en su asociación con complejos microbianos involucrados en patogenicidad oral..... 8

**Figura 1-2:** Modificación química del residuo de aminoácido de arginina por peptidil-arginina deiminasa de *P. gingivalis*, dando como resultado la conversión de arginina en péptido modificado a citrulina. Esta modificación postraduccional altera la conformación espacial de la estructura 3D original y la función del péptido proteico como indican las flechas (péptido de arginina y péptido de citrulina). El amoníaco liberado durante la reacción química es beneficioso para la activación de PPAD..... 12

**Figura 2-1:** Secuencias de los primers de PPAD-NT y PPAD-CT. Se indican los sitios de restricción y las secuencias para las colas de Histidinas. .... 22

**Figura 2-2:** A. Confirmación del fragmento PPAD-NT. MP: Marcador de peso molecular (50pb), líneas 1 y 2: DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277, línea 3 control negativo, línea 4 control positivo; B. Confirmación del fragmento PPAD-NT. MP: Marcador de peso molecular (50pb), líneas 1 y 2: DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277, línea 3 control positivo, línea 4 control negativo. .... 26

**Figura 2-3:** Confirmación de la dirección del fragmento clonado en el pET. En corchete se indica el set de primers. A. MP: Marcador de peso molecular 50pb; líneas: 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 17 y 19 DNA plasmídico con el inserto de PPAD-NT; líneas: 3, 8, 13 y 18 controles negativos; líneas 5, 10 y 15 pozos vacíos. B. MP: Marcador de peso molecular 50pb; líneas: 1, 2, 6, 7, 11, 12, 15 y 16 DNA plasmídico con el inserto de PPAD-NT; líneas: 3, 4, 8, 9, 13, 14, 17 y 18 controles negativos; líneas 5, 10 pozos vacíos..... 27

**Figura 2-4:** Expresión de los fragmentos de PPAD previamente clonados en diferentes tiempos de inducción en *E. coli* BL21 con IPTG 1mM A. Expresión de PPAD-NT en pellets tras la inducción. MP: Marcador de peso molecular, línea 1: 2 h de inducción, línea 2: 4 h

de inducción, línea 3: 6 h de inducción, línea 4: 16 h de inducción. B. Expresión de PPAD-CT en pellets tras la inducción. MP: Marcado de peso molecular, línea 1: sin inducción 2 h incubación; línea 2: 2 h de inducción, línea 3: 4 h de inducción, línea 4: 4 horas de inducción. Tinción con azul de Coomassie.....28

**Figura 2-5:** Purificación de PPAD-NT y PPAD-CT mediante resina Ni-NTA. MP: Marcador de peso molecular. Líneas 1, 2 y 3: eluidos de PPAD-NT; líneas 4 y 5: eluidos de PPAD-CT de la purificación por la resina Ni-Nta. Tinción con azul de Coomasie .....29

**Figura 2-6:** Western blotting para PPAD-NT y PPAD-CT. MP: Marcador de peso molecular. Líneas 1, 2 y 3: elución purificada de PPAD-NT; líneas 4 y 5: elución purificada de PPAD-CT. ....29

**Figura 3-1:** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de *P. gingivalis* en proceso de vesiculación, obtenidas durante el proceso de purificación de las OMV..... 38

**Figura 3-2:** SDS-PAGE 14% de dos lotes diferentes de vesículas de membrana de *P. gingivalis* ATCC 33277. Tinción con nitrato de plata ..... 39

**Figura 3-3:** Producción y caracterización de anticuerpos anti H1 A: Titulación de anticuerpos  $\alpha$  H1 en sueros de ratas Wistar post inoculación, detectados por ELISA usando como antígeno los péptidos. B: Titulación de anticuerpos  $\alpha$  H1 en sueros de ratas Wistar post inoculación, detectados por ELISA usando antígeno *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83. C: Wertern Blot para *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83 con suero pre-inmune, antisuero 1, 2 y 3. \*  $p \leq 0,05$  t Test..... 40

**Figura 3-4:** Purificación de RgpA a partir de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis*. **A.** Cromatografía FPLC de intercambio de aniónico. **B.** Cromatografía FPLC de intercambio catiónico. En cada pico la fluorescencia se indican las unidades detectadas con el sustrato CAAM para la actividad de la gingipaína, en la parte inferior derecha de cada imagen se indican las unidades de fluorescencia de la OMV sonicada antes de la cromatografía..... 41

**Figura 3-5:** Confirmación de la pureza de la proteína RgpA. A. SDS-PAGE al 14 %, tinción con nitrato de plata. B. Western blot para la detección de la proteína RgpA utilizando anticuerpos anti-AH1 como anticuerpo primario..... 42

**Figura 4-1:** Diagrama de flujo de la selección de la población de estudio..... 48

---

**Figura 4-2:** Box-Plot de títulos de anticuerpos anti-RgpA en RA y grupo control. B. Box-Plot de títulos de anti-PPAD en RA y grupo control. \* Significación estadística  $p < 0,05$  .. 57

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 3-1:</b> Rendimiento de la purificación de RgpA a partir de OMV de <i>P. gingivalis</i> .....	42
<b>Tabla 4-1:</b> Descripción de variables sociodemográficas, clínicas y marcadores asociados a la AR.....	53
<b>Tabla 4-2:</b> Descripción de variables clínicas y microbiológicas periodontales asociadas a la AR.....	54
<b>Tabla 4-3:</b> Comparación de la interacción de Anti-RgpA, Anti-PPAD y AntiPPAD/RgpA con marcadores de AR (A) y marcadores de periodontitis en toda la población (B). .....	55
<b>Tabla 4-4:</b> Modelo de regresión logística de marcadores asociados con AR .....	56
<b>Tabla 4-5:</b> Capacidad operativa de las pruebas diagnósticas anti-RgpA, anti-PPAD y anti-PPAD/RgpA-PPAD. ....	57
<b>Tabla 4-5:</b> Comparación de los niveles de interacción de Anti-RgpA, Anti-PPAD y AntiPPAD-RgpA con la severidad de la periodontitis y la actividad de la AR.....	71

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AAP	Academia Americana de Periodoncia
anti-CCP	Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados
anti-ENO1	Anticuerpos anti-enolasa
APRIL	Ligando inductor de proliferación
AR	Artritis Reumatoidea
ATCC	American Type Culture Collection
B10	Células B reguladoras
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Infusión cerebro corazón
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOP	Sangrado al sondaje
BSA	Albumina sérica bovina
CIA	Anticuerpo monoclonal contra el colágeno tipo II
CAAM	Sustrato fluorométrico Z-Gly-Gly-Arg 7-amido-4-metilcumarina clorhidrato
CAL	Pérdida de inserción clínica
CDC-AAP	Centre for Disease Control and Prevention/American Academy of Periodontology
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
DBA1/J	Cepa de ratones susceptibles a desarrollar artritis
DAS28	Disease Activity Score 28
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DME	Diferencia de medias estandarizada
DMARDs	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFP	Federación Europea de Periodoncia
IE-ICC	Coeficiente de correlación entre examinadores
ENSAB IV	Cuarto Estudio Nacional de Salud Bucal
EBV	Virus de Epstein-Barr
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FCB	Superphylum <i>Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes</i>
FPLC	Cromatografía en fase líquida (Fast protein liquid chromatography)
FR	Factor reumatoideo
FU	Unidades de fluorescencia

---

gMDSC	Granulocitos (Myeloid Derived Suppressor Cells)
h	Horas
HLA	Antígeno leucocitario humano
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido ortofosfórico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
IC	Intervalo de confianza
IG	Índice gingival
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1 $\beta$	Interleucina uno beta
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina diez
IL-22	Interleucina veintidós
IMC	Índice de Masa Corporal
IP	Índice de Placa
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LB-AMP	Luria Bertani con ampicilina 100 $\mu$ g/mL
LES	Lupus eritematoso sistémico
MgCl <sub>2</sub>	Dicloruro de magnesio
mM	Milimolar
mMDSC	Células monocíticas (Myeloid Derived Suppressor Cells)
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MP	Marcador de peso molecular
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni-Nta	Resina acoplada a níquel con afinidad a Histidinas
NGS	Secuenciación de próxima generación
<i>Nsil</i>	Enzima de restricción aislada de la bacteria <i>Moraxella phenylpyruvica</i>
OMV	Vesículas de membrana externa (Outer Membrane Vesicles)
OR	Odds ratio
p<	Valor de probabilidad
pb	Pares de bases
PB	Profundidad de la bolsa
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-T	Buffer fosfato salino Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG E2	Prostaglandina E 2
PCRhs	Proteína C reactiva ultrasensible
PPAD	Peptidil arginina deiminasa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PPAD-NT	Extremo amino terminal de la Peptidil arginina deiminasa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PPAD-CT	Extremo carboxilo terminal de la Peptidil arginina deiminasa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PVDF	Polyvinylidene fluoride
Q1	Cuartil 1 (Valores superiores al percentil 75)
Q2	Cuartil 2 (Valores superiores al percentil 50)
Q3-Q4	Cuartil 3-cuartil 4 (Valores inferiores al percentil 50)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

---

ROC	Acrónimo de Receiver Operating Characteristic
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS-T	Tris-buffered saline Tween
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Th17	Linfocitos T helper 17
TLR	Receptores tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VSG	Velocidad de sedimentación globular
<i>Xba</i> I	Enzima de restricción aislada de la bacteria <i>Xanthomonas badrii</i>
3D	Tres dimensiones
$\alpha$ H1	Anticuerpos anti-hemaglutinina H1

---



## Introducción

*Porphyromonas gingivalis* es una bacteria anaerobia estricta, asacarolítica, productora de enzimas proteolíticas que favorecen la adquisición de aminoácidos como fuentes de carbono y energía, promueven el crecimiento bacteriano, procesan proteínas de la membrana externa, favorecen la expresión de fimbrias, además de ser las encargadas de su autorregulación. Estas proteasas tipo tripsina son conocidas como gingipaínas, están codificadas por tres genes (*rgpA*, *rgpB* y *kgp*) y son clasificadas como Arg-gingipaína (RgpA y RgpB) y Lys-gingipaína (Kgp) según su especificidad de hidrólisis en los enlaces Arg-Xaa o Lys-Xaa, respectivamente están involucradas en el proceso de infección y desarrollo de la periodontitis (Nemoto et al., 2016; Potempa et al., 2003; Imamura 2003; Kuramitsu 1998).

Además, esta bacteria presenta una enzima con actividad de amino deiminasa conocida como peptidilarginina deiminasa de *P. gingivalis* (PPAD) similar a la comprometida en la etiología de artritis reumatoide (Krutyholowa et al., 2022; Mangat et al., 2010). Las enzimas peptidilarginina deiminasas (PAD) convierten los residuos de arginina de los polipéptidos en citrulina, modificando la carga del péptido y como consecuencia de esto la conformación tridimensional de la proteína exponiendo epítomos crípticos, los cuales favorecen la generación de anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) asociados con la Artritis Reumatoide (AR) incluso antes del inicio de la enfermedad (Quirke et al., 2014; Gully et al., 2014; Maresz et al., 2013; Mangat et al., 2010).

Además, algunos investigadores sugieren que si se evita el desarrollo de la periodontitis o se trata a tiempo la condición sistémica de los pacientes pueden evitar el desarrollo o disminuir actividad de la AR (Borgnakke 2015; Okada et al., 2013; Biyikoğlu et al., 2013).

Aunque, el link entre periodontitis y AR se ha atribuido principalmente a la acción de la PPAD, es probable que las Arg-gingipaínas tengan una participación en el proceso de citrulinación de las proteínas asociada con la patogénesis de la AR. Este proceso es debido

a que esta gingipaína cliva las proteínas en el extremo carboxilo de la arginina, dejando este residuo en el extremo terminal favoreciendo el reconocimiento por la enzima PPAD, ya que esta enzima no es capaz de hacerlo cuando la arginina se encuentra en la parte media de la proteína, de esta manera se generan péptidos citrulinados (Montgomery et al., 2015; Goulas et al., 2015; Quirke et al., 2014).

Algunos autores han evaluado títulos de anticuerpos anti-RgpB y anti-PPAD, estos antígenos proteicos de origen bacteriano pueden circular de manera sistémica inducidas por bacteriemias o diseminación de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis* (Vermilyea et al., 2021; Ambrosio et al., 2019; Castillo et al., 2011; Lockhart et al., 2008; Lafaurie et al., 2007a), es así como Quirke et al., (2014), reportan aumento en los niveles de los anticuerpos anti-PPAD en un grupo de pacientes con AR (mediana 122 U/ml) en comparación con el grupo control (mediana 70 U/ml), mientras que los niveles de anticuerpos contra la gingipaína RgpB no fue más alto en comparación con el grupo control. Del mismo modo, Johansson et al., (2016) evaluaron anti-RgpB usando la misma metodología de Quirke et al., (2014) en este estudio incluyeron además individuos presintomáticos, encontrando diferencias significativas entre el grupo control sin AR, pacientes con AR e individuos presintomáticos. Los títulos de anticuerpos fueron más altos en los individuos presintomáticos, pero no hubo diferencias significativas entre el grupo con AR y presintomáticos. Este mismo grupo en el trabajo de Kharlamova et al., (2016), reportan con una muestra de 1.974 pacientes con AR y 377 controles sin AR una alta asociación de los anti-RgpB con AR (OR 2,96 [IC 95% 2,00, 4,37) y confirman una interacción con el hábito de fumar. Los autores concluyen que *P. gingivalis* sigue siendo un candidato plausible que contribuye a desencadenar y/o impulsar la autoinmunidad y enfermedad autoinmune en un subconjunto de pacientes con AR.

Por otra parte, otros investigadores (Konig et al., 2015; Fisher et al., 2015) sugieren que la PPAD no es responsable en la pérdida de la tolerancia inmunológica, en la línea de evidencia de que *P. gingivalis* no tiene relación con el desarrollo de la AR, aunque en estos autores no se evaluaron las gingipaínas como posible coadyuvante de la citrulinación. No es claro el papel de esta bacteria en la AR y sí las gingipaínas juegan un papel importante o no este proceso.

Diferentes estudios que han detectado anticuerpos frente a estos factores de virulencia han sido meta-analizados, en el año 2018 Bae et al., sugieren que el aumento de anticuerpos anti-*P. gingivalis*, incluidos anti-RgpB tienen una relación positiva con los anticuerpos anti-CCP, sugiriendo que estos anticuerpos pueden jugar un papel clave en la patogenia de la AR (Bae et al., 2018). Del mismo modo, recientemente Li et al., (2022) concluyó que la exposición a *P. gingivalis* es un factor de riesgo potencial en la AR y que los anticuerpos anti-*P. gingivalis* y anti-gingipaínas son biomarcadores asociados con la AR, este último metaanálisis incluye un trabajo en el que se evaluaron anticuerpos anti-RgpA en el que se usa un péptido sintético de esta proteína como antígeno en el ensayo de ELISA (Jasemi et al., 2021), estos autores proponen que la respuesta humoral de los pacientes con AR frente a diferentes bacterias y virus es más alta en este grupo de pacientes frente a un grupo control, sin embargo, cabe resaltar que en dicho estudio se evaluó solo un péptido pequeño de algunas proteínas de los microorganismos.

El posible papel de la RgpA en la AR aún es un interrogante, los estudios que han evaluado anticuerpos anti-gingipaínas en su mayoría lo han hecho frente a RgpB. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito como una gingipaína muy relevante en el desarrollo de la periodontitis (Pathirana et al., 2007), la gingipaína RgpA es la que se ha asociado más fuertemente con diferentes enfermedades sistémicas (Dominy et al., 2019; Adams et al., 2019; Chen et al., 2009; Schenkein et al., 2013) pero no se ha evaluado previamente en la AR.

En Colombia la frecuencia de periodontitis es alta (61,8%) en sus diferentes grados de severidad y va aumentando con la edad Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB) IV (2014), la prevalencia de la periodontitis severa es del 10,6%, la periodontitis moderada es del 43,3%. En mayores de 65 años esta frecuencia es del 23,7% en su forma severa (Serrano et al., 2019), además de encontrar también una alta frecuencia de *P. gingivalis* tanto en pacientes con periodontitis (83,33% en estadio I y II; 93,33% en estadios III y IV) como en individuos periodontalmente sanos (73,33%) (Lafaurie et al., 2023 en proceso de publicación).

De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo, en pacientes con AR establecida la frecuencia de *P. gingivalis* en 115 pacientes con tratamiento convencional es del 46,49% y en 62 pacientes con tratamiento biológico (anti-Factor de necrosis tumoral) es del 37,93%

(Romero-Sánchez et al., 2017), lo que indica que estos pacientes aún bajo tratamiento tienen el reto antigénico por la presencia de esta bacteria.

De acuerdo con lo reportado en la literatura en este trabajo se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe alguna asociación entre la presencia de marcadores serológicos microbiológicos de infección previa o actual por *P. gingivalis* y el diagnóstico de AR comparando con un grupo de individuos con diferentes condiciones periodontales y sin AR?

Con el fin de responder esta pregunta se planteó como objetivo general:

- Determinar la asociación entre la presencia de marcadores serológicos de infección por *P. gingivalis* y la presentación de artritis reumatoide.

Y como objetivos específicos

1. Establecer los métodos y procedimientos para la producción, caracterización y cuantificación de RgpA y anticuerpos anti-gingipaínas.

Para dar cumplimiento a este objetivo a partir de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis* se logró la purificación de la gingipaína RgpA por medio de cromatografía en fase líquida (FPLC) y se produjeron anticuerpos policlonales monoespecíficos en un modelo animal. La proteína RgpA fue usada como antígeno para dar cumplimiento a los siguientes objetivos específicos.

2. Evaluar la correlación entre los criterios clínicos y de laboratorio de pacientes con artritis reumatoide y la presencia de anticuerpos anti-gingipaínas en los grupos de estudio.
3. Correlacionar los índices de severidad, los títulos de anticuerpos anti-gingipaínas con los títulos de anti-CCP y anti-PPAD en pacientes con enfermedad periodontal y con o sin artritis reumatoide.

Para dar cumplimiento a estos objetivos se evaluó la presencia de anticuerpos anti-PPAD y anti-RgpA en 143 pacientes con AR y 112 individuos sanos sistémicamente como grupo

control, con el fin de determinar estos anticuerpos en este trabajo se produjo la proteína PPAD de manera recombinante y se purificó la enzima RgpA de manera nativa a partir de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis*. Se pudo concluir que los anticuerpos anti-RgpA están asociados con la AR y el índice inflamatorio periodontal, aunque no se encontró asociación con los títulos anti-PPAD en los pacientes diagnosticados con AR. Sin embargo, los títulos altos anticuerpos anti-RgpA potencian la asociación de anti-PPAD con AR, dada por la presencia de títulos altos en el mismo paciente los anticuerpos anti-RgpA-anti-PPAD se pueden utilizar para detectar la AR asociada con la enfermedad periodontal. Estudios futuros podrían investigar estos anticuerpos como posibles candidatos a ser marcadores de la AR.

# 1. Asociación ente periodontitis y artritis reumatoide

Estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado asociación bidireccional entre la periodontitis y la AR, esta asociación es atribuida a la presencia de la bacteria *P. gingivalis* en la cavidad oral de los pacientes.

Por esto, en este capítulo se hace una revisión del tema con el fin de mostrar esta asociación.

## 1.1 Generalidades de la periodontitis

La periodontitis es una enfermedad multifactorial inflamatoria crónica, asociada con la disbiosis de los microorganismos que hacen parte del biofilm subgingival, esta disbiosis lleva a un aumento de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL6) además de prostaglandina E2 (PG E2) y metaloproteinasa de matriz (MMP) lo que desencadena en la destrucción de los tejidos de soporte del diente, incluyendo tejido conectivo gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar (Kwon et al., 2021; Usui et al., 2021; Chapple et al., 2018; Hajishengallis et al., 2015; Graves 2008).

La prevalencia de la periodontitis varía entre población y los determinantes sociales favorecen su desarrollo, ya que las poblaciones con bajos ingresos y menos años de educación presenta periodontitis avanzada (Bonfim et al., 2013), además de presentar disparidades étnicas, siendo las poblaciones asiáticas las que presentan bolsas periodontales más profundas y las poblaciones africanas mayor pérdida de inserción clínica comparada con la población blanca (Delgado-Angulo et al., 2016).

De acuerdo con datos de Eke et al., en 2018, en la Encuesta de Salud Nacional y Examen de Nutrición realizada entre 2009 y 2014, en Estados Unidos el 42% de la población mayor de 30 años tenía periodontitis y el 7,8% tenía periodontitis severa y este grupo de pacientes correspondía principalmente a individuos mayores de 65 años (Eke et al., 2018; Kwon et al., 2021). Estos mismos investigadores en 2016 en diferentes estados de este país, indican que esta frecuencia también difiere entre el 59,4% al 84,5% según la población (Eke et al., 2016).

A nivel global la frecuencia de periodontitis severa se ha reportado en el 11%, pero difiere entre poblaciones entre el 8 y el 20% como lo describe Richards et al., en 2014. En Colombia esto no es tan diferente, de acuerdo con la región del país esta frecuencia también varía, de acuerdo con reportes de Serrano et al., 2019, con los criterios clasificatorios de Centre for Disease Control and Prevention/American Academy of Periodontology (CDC-AAP) (Page et al. 2007; Eke et al., 2012) la estimación de la prevalencia de la periodontitis severa es del 10,6%, la periodontitis moderada es del 43,3%. En mayores de 65 años esta frecuencia es del 23,7% en su forma severa (Serrano et al., 2019). Según el ENSAB IV la frecuencia de periodontitis en población colombiana es del 61,8% en todas sus formas y esta frecuencia aumenta con la edad.

### 1.1.1 Microorganismos asociados a la periodontitis

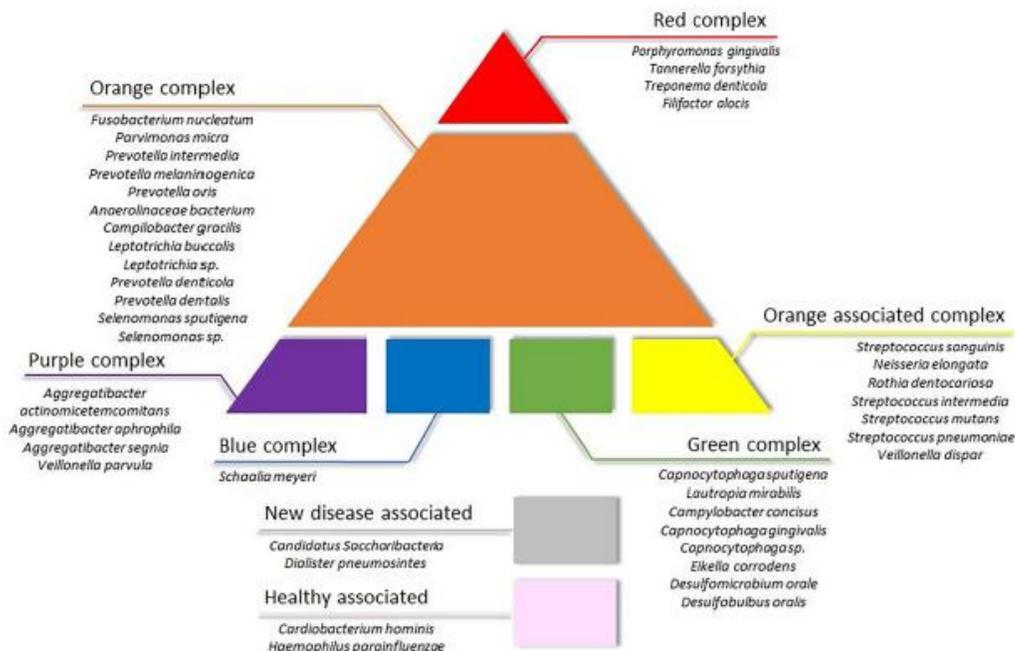
Desde los años 60 se ha atribuido el desarrollo y la progresión de la periodontitis a diferentes factores, de los cuales la presencia de bacterias a nivel subgingival se ha considerado como claves en esta enfermedad mediada por la respuesta proinflamatoria aumenta asociada con algunos de los factores de virulencia de algunas de estas bacterias (Theilade et al, 1966; Slots et al. 1986).

Posteriormente la asociación microbiológica de esta enfermedad ha sido confirmada por innumerables estudios epidemiológicos alrededor del mundo, en los cuales se reconoció que una serie de microorganismos Gram negativos anaerobios y micro-aerófilos aumentan significativamente en la placa subgingival de pacientes con periodontitis indicando que esta entidad representa un patrón polimicrobiano, que aunque variable en los individuos, muestra cierta especificidad caracterizada por el aislamiento de un grupo de microorganismos que han sido considerados periodontopágenos, entre los cuales se han identificado *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Dialister pneumosintes* (Slots et al., 1986; Socransky et al., 1998; Ghayoumi et al., 1998; Lafaurie et al, 2007a; Mayorga-Fayad et al., 2007) Siendo la *P. gingivalis* la especie más prevalente en periodontitis alrededor del mundo, con un patrón similar para la población Colombiana evaluado por métodos convencionales de cultivo y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (Lafaurie et al, 2007a; Mayorga-Fayad et al, 2007; Botero et al, 2007).

Recientemente los métodos de identificación basados en secuenciación de próxima generación (NGS) han involucrado muchos otros microorganismos que se han asociado fuertemente a la periodontitis, dentro de los que se incluyen también Gram positivos que anteriormente se consideraban microbiota oral normal o que no se reconocían como implicados en la periodontitis, estos hallazgos han cambiado paradigmas en este sentido y han permitido ampliar la fisio-patogenia de la periodontitis. Es así, que han cobrado importancia microorganismos considerados no cultivables o difícilmente cultivables de los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Candidatus Saccharibacteria* (Perez-Chaparro et al., 2014).

Resultados recientes de Wirth et al., en 2021 en un estudio metagenómico de 121 sitios con periodontitis de nueve pacientes y muestras de saliva de los mismos sujetos, han confirmado que los sitios con periodontitis presentan placa subgingival disbiótica menos diversa, en comparación con los individuos sanos, en el que el microbioma es más diverso pero considerado eubiótico, estos autores han propuesto una actualización de los complejos microbianos de Sockansky et al, 1998 y de Haffajee et al., 2008, incluyendo microorganismos identificados por metagenómica en su trabajo (Figura 1).

**Figura 1-1:** Esquema actualizado de complejos microbianos orales. La codificación por colores de los grupos bacterianos se basó en su asociación con complejos microbianos involucrados en patología oral.



Tomado de: Wirth et al., 2021.

En estos trabajos actuales los clásicos periodontopatógenos *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* siguen teniendo protagonismo en esta enfermedad.

Recientemente, nuestro grupo ha reportado la presencia de bacterias orales detectadas por NGS en muestras de pacientes colombianos y españoles con diferentes estadios de la periodontitis de acuerdo con la clasificación de la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP) de 2018 (Chapple et al., 2018), en este trabajo se incluyeron 20 pacientes cada grupo: uno con salud periodontal/gingivitis, con periodontitis en estadio I-II y con periodontitis en estadio III-IV. *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacteria HMT 369, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9]

[*Eubacterium*] *brachy*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5] [*Eubacterium*] *saphenum* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041 se encontraron en pacientes con periodontitis en estadio III-IV en ambos países. *P. gingivalis* y *T. forsythia* fueron asociados con las lesiones severas de la periodontitis en los pacientes de ambos países (Lafaurie et al., 2022).

De acuerdo con los hallazgos previos en Colombia *P. gingivalis* es un microorganismo con prevalencia alta tanto en pacientes con periodontitis (83,33% en estadio I y II; 93,33% en estadios III y IV) como en individuos periodontalmente sanos (73,33%) (Lafaurie et al., 2023 en proceso de publicación)

## 1.2 Generalidades de la artritis reumatoide

La AR es una enfermedad de carácter articular, autoinmune, inflamatoria, crónica, que puede afectar diversos órganos y sistemas y cuyo órgano blanco es la membrana sinovial, en la cual 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. Se presenta principalmente en las mujeres (3 a 1) y su prevalencia en la población latinoamericana y en Estados Unidos es aproximadamente del 0,5-1% (Jang et al., 2022; Delgado-Vega, et al., 2006). El inicio de la enfermedad es más frecuente en población ente los 20 y 45 años, aunque hay un grupo importante de comienzo tardío después de los 60-65 años (Gabriel, 2001).

En Colombia, en 2019 se reportaron 81.386 pacientes con AR, lo que corresponde a una prevalencia de 0,24%, más baja que lo reportado en otras poblaciones de la región (0,46 a 1,6%). Como es bien conocido la frecuencia es más alta en mujeres, en la población estudiada la relación mujer-hombre fue de 5,2:1. La mediana de edad fue de 59 años [RIC (rango inter-cuartil): 50-67 años]. Adicionalmente, la prevalencia fue mayor en personas de 50 a 69 años. Como dato adicional los autores indican que en el 57,57% de los departamentos colombianos se encontraron tasas de remisión de hasta el 30% en los pacientes, asociado con DAS28 menor de 3.2 (Castillo-Cañón et al., 2021).

La enfermedad articular también se ve acompañada de variedad de síntomas tales como rigidez matinal, dolor, fatiga, incapacidad funcional, depresión, nódulos articulares, artrosis secundarias entre otras. Constituyen aspectos esenciales para el tratamiento óptimo de la enfermedad, el diagnóstico diferencial precoz y el oportuno y adecuado inicio terapéutico. No se conoce causa responsable directa de la artritis reumatoide. La aparición de la enfermedad se asocia a diferentes factores de carácter genético, inmunológico y algunos autores sugieren que podrían también existir factores ambientales y hormonales, los cuales pueden variar de una población a otra (Firestein et al., 2013).

En cuanto a la predisposición genética se ha reportado varios haplotipos DRB1 combinados en los alelos de DRB1\*01, \*04 y \*10 asociados al epítipo compartido, más tarde se encontró la población estadounidense el alelo \*14:02 como un contribuyente importante en el desarrollo de la AR en esta población. En contraste, se ha sugerido que los alelos HLA-DRB1\*13 son protectores para el desarrollo de la AR (Padyukov 2022).

Este vínculo entre HLA-DR y AR se describió inicialmente en la década de 1970 con la observación de que HLA-DRB\*04 está presente en el 70% de los pacientes con AR, en comparación con aproximadamente el 30% de los controles sanos. Se identificó un factor de susceptibilidad llamado "epítipo compartido" ubicado entre los aminoácidos 70 a 74 en la tercera región hipervariable de la cadena DR $\beta$ . La secuencia asociada con la enfermedad es generalmente glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QKRAA), presente en algunos DRB\*04 y DRB\*014, además de las cadenas DR1 $\beta$ . Los epítipos de susceptibilidad con los vínculos más cercanos a AR incluyen DRB\*0401, DRB\*0404, DRB\*0101 y DRB\*1402. Más del 90% de los pacientes con AR expresan al menos una de estas variantes (Firestein et al., 2017).

Entre los factores ambientales relacionados con el desarrollo de la AR se han propuesto algunos microorganismos que presuntamente podrían estar involucrados en el desencadenamiento de la enfermedad, sin que esta llegue a considerarse una patología infecciosa. En el primer Congreso de Autoinmunidad en Latinoamérica (Ecuador 2004) se planteó la causa infecciosa como origen de la enfermedad. Agentes infecciosos entre los que se encuentran el virus de Epstein-Barr (EBV), retrovirus, parvovirus B19, virus de la hepatitis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma*, *Proteus* y *Helicobacter pylori* se propusieron como desencadenantes de artritis reumatoide (Lindsay & Fujinami, 1999).

Adicionalmente, la disbiosis de la microbiota gastrointestinal se asocia con alteraciones a nivel inmunitario local y sistémico lo que contribuye a enfermedades como la AR, las células inmunitarias intestinales de la mucosa intestinal son los intermediarios por la cual la microbiota intestinal y sus metabolitos pueden aportar a la aparición de la AR, aunque esto no está completamente estudiado han descrito diferentes microorganismos de la microbiota intestinal que se han asociado con esta enfermedad. Es así como algunas bacterias como *Prevotella copri* se ha considerado inmunológicamente relevante para la patogenia de la AR (Pianta et al., 2017). Otros microorganismos como *Lactobacillus* se han encontrado aumentados en este grupo de pacientes (Liu et al., 2013), así como el aumento de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Klebsiella*, pero disminución de *Bifidobacterium* se ha asociado con un aumento de TNF- $\alpha$  o IL-17A en pacientes con AR (Chiang et al., 2019), muchos otros microorganismos asociados con la disbiosis gastrointestinal han sido relacionados con esta enfermedad autoinmune (Xu et al., 2020).

La disbiosis de la microbiota oral también ha sido blanco de investigación, por lo que se ha indagado la asociación de algunas bacterias orales con la AR como lo se ha descrito previamente (Azzi et al., 2017) sin encontrar asociaciones fuertes con bacterias como *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum* y *Campylobacter rectus*. Sin embargo, recientemente

se ha encontrado relación con algunos productos metabólicos, principalmente la presencia de amoníaco derivado del metabolismo de *T. forsythia* relacionados con aumento en la actividad de la AR evaluada por DAS28 (Martínez-Rivera et al., 2017).

Entre otros factores de riesgo asociados a la enfermedad, se encuentra el tabaquismo, se ha establecido una fuerte relación entre este hábito y la AR. En un estudio se observó que la exposición al tabaco podría desencadenar la producción de factor reumatoide y que tienen mayor impacto en personas de sexo masculino, contribuyendo subsecuentemente al desarrollo de la enfermedad, adicionalmente la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  también se ve afectada por el tabaquismo (Chang et al., 2014; Uhlig et al., 1999).

### 1.2.1 Proceso de citrulinación

La citrulinación es una modificación postraduccional esencial en la que el grupo guanidinio de los aminoácidos argininas sufren deiminación por parte de las enzimas peptidilarginina deiminadas (PAD).

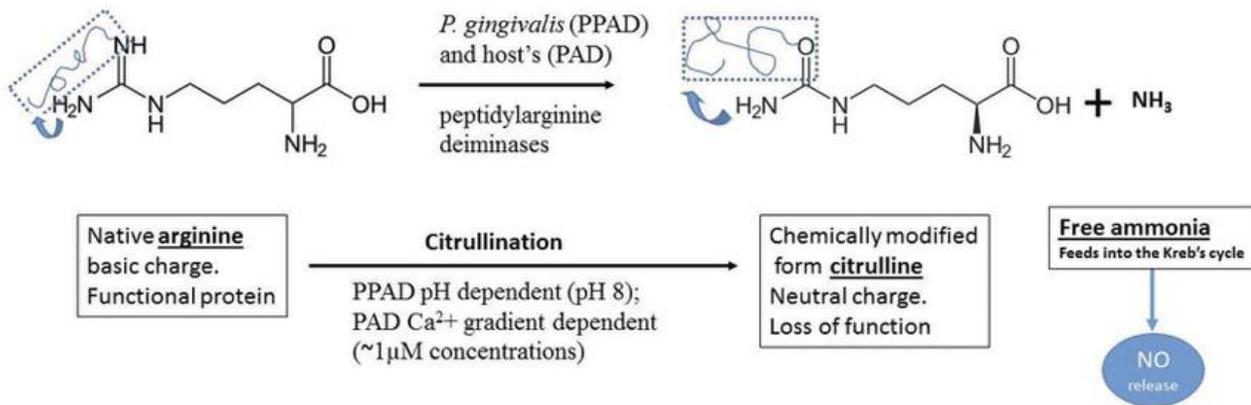
Se ha reportado que el proceso de citrulinación podría generar cambios en la estructura terciaria de las proteínas exponiendo epítomos crípticos que el sistema inmunológico no reconoce como propios y a partir de estos se generan autoanticuerpos. El proceso de citrulinación consiste en la conversión enzimática de peptidil-arginina a peptidil-citrulina en las proteínas, esta conversión hace que se pierda la carga positiva de los residuos de arginina ya que la citrulina no posee carga generando cambio en la estructura terciaria de la proteína. Este proceso se da por acción de las enzimas peptidil arginina deiminadas (PAD), en el humano se han descrito 5 isoformas de estas enzimas (PAD1, PAD2, PAD3; PAD4 y PAD6), normalmente se expresan en algunas células como linfocitos T y B, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y células NK para generar cambios postraduccionales en algunas proteínas y cumplir adecuadamente su función (Mangat et al., 2010; Anzilotti et al., 2010).

La PAD4 se ha asociado fuertemente con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Normalmente esta enzima esta inactiva, pero en caso de estrés oxidativo o durante la apoptosis, el calcio entra en las células activando esta enzima y ha causado la citrulinación de vimentina, fibrina, colágeno y  $\alpha$ -enolasa, y aumentando su antigenicidad. Estas proteínas son modificadas y dan origen a la formación de anticuerpos anti-péptidos citrulinados (Mangat et al., 2010; Suzuki et al., 2003).

Además de las PAD descritas en humanos, también se ha descrito una peptidil-arginina deiminada de *P. gingivalis* conocida como PPAD, se ha probado la capacidad de esta enzima para generar citrulinación en diferentes proteínas, aunque no lo puede hacer cuando la arginina está en la parte media de la proteína, por lo que se propone a las gingipainas como adyuvantes en este proceso (Bereta et al., 2019; Olsen et al., 2018; Montgomery et al., 2016; Leech et al., 2015; Quirke et al., 2014; Maresz et al., 2013; Mangat et al., 2010).

En la figura 1-2 se describe el proceso de citrulinación mediado por la PPAD, aunque en este diagrama no se incluyen las gingipaínas como importantes en este proceso, algunos autores las proponen como implicadas en este proceso (Quirke et al., 2014). Stobernack et al., en 2016, describen la importancia de esta enzima en la fisiología de *P. gingivalis* encontrando varias proteínas de la bacteria que sufren citrulinación y que son necesarias para la formación de biofilm y la supervivencia de la bacteria, la proteína que estos autores sugieren como la que más susceptible a la citrulinación es la RgpA (Vermilyea et al., 2019).

**Figura 1-2:** Modificación química del residuo de aminoácido de arginina por peptidil-arginina deiminasa de *P. gingivalis*, dando como resultado la conversión de arginina en péptido modificado a citrulina. Esta modificación postraducciona altera la conformación espacial de la estructura 3D original y la función del péptido proteico como indican las flechas (péptido de arginina y péptido de citrulina). El amoníaco liberado durante la reacción química es beneficioso para la activación de PPAD.



Tomado de: Olsen et al., 2018

Aún no se ha esclarecido por completo el papel de esta PPAD en la fisiopatología de AR, sin embargo, los estudios indican que este puede ser el link directo entre la periodontitis y el desarrollo de esta enfermedad auto inmune, hasta hace poco se había establecido que esta enzima únicamente se encontraba en *P. gingivalis*, pero se ha descrito esta enzima en otras especies de *Porphyromonas* con esta enzima como son *Porphyromonas gulae* y *Porphyromonas loveana*, aunque no se ha encontrado relación con la AR (Gabarrini et al., 2018).

## 1.3 Evidencia entre la asociación de periodontitis y AR

### 1.3.1 Evidencia confirmada en modelos animales

Existen diferentes estudios que han confirmado la asociación entre la AR y la periodontitis.

El primer estudio fue documentado en 2011 por Cantley et al., en 2011, los autores confirman en un grupo de ratones a la que se ha inducido periodontitis con *P. gingivalis* W50 y posteriormente se favoreció el desarrollo de la AR por la inyección de anticuerpo monoclonal contra el colágeno tipo II (CIA), en este trabajo se compararon tres grupos, uno solo con periodontitis, uno solo con AR y el grupo con las dos condiciones. Se pudo concluir que los animales con periodontitis preexistente desarrollaron AR exacerbada en comparación con el grupo con AR y sin periodontitis, por otro lado, se conoció que los animales que desarrollaban AR sin inducción de periodontitis también había afectación del tejido periodontal, por lo que se sugirió el carácter bidireccional entre las dos entidades (Cantley et al., en 2011).

Posteriormente, otro grupo de investigación desarrolló un modelo en ratones susceptibles a AR, los cuales fueron retados a inoculación por *P. gingivalis* W83 en una cámara subcutánea, posteriormente se indujo AR con CIA de la misma forma que otros investigadores. Los investigadores concluyeron que el grupo con *P. gingivalis* y CIA, desarrollaron de manera más acelerada la AR, se evidenció aumento significativo de la destrucción de huesos y cartílagos de los animales. En este estudio, se evaluó la infección por *P. gingivalis* mutante para PPAD y se evidenció que la exacerbación y el desarrollo acelerado de la AR está directamente relacionada con este factor de virulencia (Maresz et al., 2013).

En este mismo año, Marchesan et al., en ratones DBA1/J (susceptibles para desarrollar artritis) inoculados con *P. gingivalis* oralmente a los que además se les indujo AR con CIA, en este grupo de animales hubo un aumento de sinovitis, aumento de erosión ósea en las patas de los animales. Además, se pudo confirmar aumento en el número de osteoclastos y aumento de citocinas séricas, principalmente asociadas con el perfil Th17, incluyendo IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-22 acelerando el desarrollo de la AR, lo autores concluyen que la infección por *P. gingivalis* puede influir en el desarrollo de la AR principalmente a través de la activación de vías relacionadas con Th17 (Marchesan et al., 2013).

De manera similar, Gully et al., en 2014 desarrollaron una cepa de *P. gingivalis* W50 mutante para PPAD, con esta cepa mutante y la cepa nativa sin mutación se desarrolló de manera experimental la periodontitis en ratones, así como la inducción de AR por CIA. Al comparar los grupos de experimentación, se pudo evidenciar que el grupo de animales al que se le indujo periodontitis con la cepa de *P. gingivalis* deficiente para PPAD hubo menos inflamación de la pata, menos daño erosivo óseo de las articulaciones y anticuerpos anti-CCP en comparación con los animales tratados con la cepa nativa (Gully et al., 2014).

Más recientemente, Jung et al., en 2017 en un modelo en ratones similar a los reportados previamente inyectando dos cepas diferentes de *P. gingivalis* (W83 y 2561[ATCC33277]) al que le indujeron AR con CIA, en estos animales con AR se pudo confirmar sinovitis y destrucción ósea, las dos cepas lograron generar AR, aunque la cepa W83 resultó ser artritogénica antes de que se iniciara la reacción autoinmune. También se pudo detectar mayor citrulinación en el tejido sinovial superior al grupo de animales con AR, pero sin infección con *P. gingivalis*. Los efectos artritogénicos de esta bacteria dependen, de la cepa bacteriana con o sin expresión de fimbrias, la ruta y el momento de la infección. La citrulinación mediada por *P. gingivalis* puede explicar el posible vínculo entre la enfermedad periodontal y la AR (Jung et al., 2017).

En otro modelo animal, similar a los anteriores con ratones DBA/1J e inducción con AR por CIA, se pudo determinar que *P. gingivalis* administrada por vía oral cambia el microbioma intestinal, favoreciendo el deterioro intestinal. En este estudio, se evaluó la asociación de *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia* (bacteria oral sin PPAD) con la AR, la administración de *P. gingivalis*, pero no de *P. intermedia*, agravó significativamente la artritis con niveles elevados de IL-17 en sueros y sobrenadantes de cultivo, aumento de las proporciones de células Th17 entre los linfocitos mesentéricos y un cambio significativo en el microbioma intestinal. En este modelo la administración de *P. gingivalis* no aumentó los títulos de anti-CCP, estos autores sugieren un papel único de *P. gingivalis* en el vínculo entre la periodontitis y la AR al afectar el sistema inmunitario intestinal y la composición del microbiota intestinal (Sato et al., 2017).

Siguiendo con la evidencia entre la AR y la periodontitis confirmada por modelos en animales, Yamakawa et al., en 2018, desarrollaron un modelo en ratones SKG (un modelo monogénico de artritis autoinmune por transducción de señal alterada en células T), evaluaron en 6 grupos de experimentación el link entre la AR y la *P. gingivalis*, los 6 grupos de experimentación fueron inoculados intraperitonealmente con: 1). Inyección de laminarina, 2). Grupo control con PBS, 3). *P. gingivalis* + laminarina, 4). *P. gingivalis*, 5). *Escherichia coli* + laminarina y 6). *E. coli*. Los autores pudieron determinar que la AR es tres veces mayor en el grupo de *P. gingivalis* + laminarina con destrucción ósea severa del tejido articular y disminución de la densidad ósea en comparación con el grupo solo con laminarina. Los niveles de anti-CCP, metaloproteinasa de la matriz (MMP) 3, interleucinas 2, 6, CXCL1 y MIP-1 $\alpha$  también se encontraron más elevados en el grupo con *P. gingivalis* + laminarina, así como un aumento en la producción de osteoclastos en la médula ósea de los animales, además de altos títulos de anti-CCP en este mismo grupo, concluyendo que la infección por *P. gingivalis*, tiene un alto potencial para exacerbar la AR (Yamakawa et al., 2018).

Este mismo grupo con este modelo animal evaluó, la inoculación intraperitoneal de *P. gingivalis* + laminarina, con el fin de evaluar el papel del factor de complemento C5a, asociado con enfermedades inflamatorias crónicas como la AR y la periodontitis. En este trabajo se confirmó que la infección con *P. gingivalis* aumentó la AR en los animales,

además de destrucción ósea y los marcadores séricos también se aumentaron. En un ensayo in vitro se favoreció la diferenciación de osteoclastos por adición de sueros de los animales del grupo *P. gingivalis* + laminarina, en este mismo ensayo por adición de un anticuerpo que neutraliza el C5a esta diferenciación se bloqueó. En este trabajo se evaluó además los niveles de C5a en sueros de 40 pacientes, además de los títulos de anticuerpos contra bacterias periodontopatógenas. Los autores concluyen que los niveles de C5a en suero en pacientes con AR con anticuerpos contra *P. gingivalis* positivos fueron elevados en comparación con los de pacientes con AR con anticuerpos contra *P. gingivalis* negativos (Munenaga et al., 2018).

Los diferentes modelos han confirmado la asociación entre la AR y la periodontitis, por lo que es importante la evaluación de tratamientos adecuados para la AR asociada con periodontitis, en este sentido, autores como Huck et al., en 2018, evaluaron la reducción en la inflamación articular y sistémica por acción del Kava-241 (un análogo sintético que bloquea la secreción de TNF- $\alpha$ ) en un modelo murino. Se indujo la periodontitis y la AR con CIA, posteriormente fueron tratados con Kava-241. Una vez realizado el tratamiento, el score de artritis, la inflamación de las patas, los osteoclastos y células inflamatorias en las articulaciones de los animales se evaluaron, evidenciando mejoría en la condición inflamatoria, observando disminución en los niveles de TNF- $\alpha$ , células inflamatorias, osteoclastos en las articulaciones y el score de artritis en los animales. Concluyendo que Kava-241 tiene potencial para el manejo de las condiciones inflamatorias relacionadas con AR infecciosa (Huck et al., 2018).

Por esta misma vía Lübcke et al., en 2019, en un modelo de artritis en ratones evaluaron la influencia del tratamiento periodontal en estos animales en la modulación de la AR, en este modelo *P. gingivalis* fue inoculada por vía oral y la AR se indujo por CIA, se trató con clorhexidina (CHX) o metronidazol por vía oral antes y durante la inducción de la AR, la pérdida de hueso alveolar se comparó con metotrexate inyectado intraperitonealmente, se evaluó la disbiosis en heces fecales por análisis del microbioma, además se determinaron los títulos anti-*P. gingivalis*. La CHX y el metronidazol redujeron la gravedad de la AR similar al metotrexate, este estudio confirma como se puede modular la AR en pacientes con periodontitis con un tratamiento no quirúrgico (Lübcke et al., 2019).

Hamamoto et al., en 2020, evaluaron la AR mediada por disbiosis asociada a la inoculación oral de *P. gingivalis* en un modelo experimental de ratón con artritis. Como en otros modelos, se pudo observar aumento en la actividad de la AR y se encontró aumento en los títulos de anti-CCP y se pudo evidenciar además que se favoreció la disbiosis intestinal, aunque en animales inoculados con *P. gingivalis* mutante para PPAD la actividad de la AR fue menor, así como los anti-CCP (Hamamoto et al., 2020).

Es así como, Zhou et al., (2021), han confirmado la inducción de la AR en ratones a los que se les indujo periodontitis, se confirmó que *P. gingivalis* promovió la aparición y el desarrollo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones. Adicionalmente, en este

modelo se aumentó la frecuencia los linfocitos B CD19<sup>+</sup>, Th17, Treg, granulocitos gMDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells) y células monocíticas mMDSC, por el contrario, las células B reguladoras (B10) productoras de IL-10 se encontraron reguladas negativamente en estos animales con AR inducida por CIA y con periodontitis causada por *P. gingivalis*. Los autores sugieren que este importante hallazgo podría ser muy útil para futuros estudios en los que se evalué la terapia biológica con células B10 productoras de IL-10 en pacientes con AR activa, principalmente en pacientes con AR y periodontitis (Zhou et al., 2021).

### 1.3.2 Evidencia epidemiológica entre AR y periodontitis

Estudios epidemiológicos han mostrado que la periodontitis es más prevalente en pacientes con artritis reumatoide, que en la población general sin artritis (Chou et al., 2015; Lee et al., 2015).

La presencia de los anticuerpos anti-CCP son un marcador temprano de enfermedad reumática. La correlación positiva entre anti-CCP y anti- *P. gingivalis* ha permitido que se proponga a esta bacteria como un candidato medioambiental iniciador en el desarrollo de artritis reumatoide (Mikuls et al, 2014). *P. gingivalis* puede además favorecer la erosión de la articulación ya que tiene la capacidad de provocar apoptosis en un modelo celular de condrocitos humanos como lo reportan Röhner et al., (2010), lo que podría sugerir que además de generar una respuesta sistémica también podría generar alteraciones locales cuando la bacteria se encuentra en la articulación.

Hace unos años, Leech et al., (2015), confirmaron la asociación entre anti-*P. gingivalis* y anti-CCP específicos para  $\alpha$ -enolasa una de las proteínas blanco de citrulinación por parte de las PAD humanas (anti-ENO1), estos anticuerpos se encuentran más altos en pacientes con AR en comparación con un grupo de pacientes sin enfermedades sistémicas. Los títulos de anti-*P. gingivalis* se correlacionaron positivamente con los parámetros clínicos de periodontitis en los pacientes con artritis, pero no con actividad de AR, mientras que los títulos de anti-ENO1 si se correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad reumática (Leech et al., 2015).

La prevalencia de periodontitis en pacientes con AR es dos veces más alta comparada con la población general. De Pablo et al, (2008) analizando 4461 individuos mayores de 60 años de los cuales 103 estaban diagnosticados con AR, en este grupo de pacientes reportaron mayor frecuencia de edentulismo (OR: 2,27), y de periodontitis (OR: 1,82) luego de ajustar según edad, sexo y tabaquismo. Mercado et al, (2001) encontraron que la escala de severidad de periodontitis en pacientes con AR se correlaciona con velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva ultrasensible (PCRhs), recuento de articulaciones inflamadas y DAS 28. Adicionalmente la destrucción articular del carpo en artritis reumatoide se asoció positivamente con resorción alveolar, sugiriendo que los individuos con periodontitis moderada a severa se encuentran en alto riesgo de desarrollar

artritis reumatoide o viceversa. Proponiendo que dicha asociación puede ser el reflejo de una desregulación común subyacente de la respuesta inflamatoria.

Dentro del paradigma etiológico de AR, un agente ambiental puede activar una reacción autoinmune en un individuo genéticamente predispuesto. El hallazgo de autoinmunidad dirigida específicamente contra péptidos citrulinados puede ser la clave para el entendimiento de las interacciones genética y medio ambientales, por lo tanto, causa de la enfermedad (Klareskog et al, 2008; Wegner et al, 2010).

Datos incluidos en un metaanálisis de 14 estudios con un total de 3829 pacientes con AR y 1239 individuos sin AR, reportan anticuerpos anti-*P. gingivalis* significativamente más altos en el grupo de AR que en el grupo de control (diferencia de medias estandarizada [DME] = 0,630, IC del 95% =0,272-0,989, p = 0,001). El análisis de subgrupos reveló que los pacientes con AR tenían anticuerpos anti-*P. gingivalis* significativamente elevados en comparación con controles sanos. Los niveles de anticuerpos anti-*P. gingivalis* fueron significativamente más altos en el grupo con anti-CCP positivos que en el grupo anti-CCP negativo (SMD = 0,322, IC del 95 % = 0,164–0,480, p =0,000006). El metaanálisis de los coeficientes de correlación mostró una correlación positiva significativa entre los niveles de anticuerpos anti-*P. gingivalis* y anti-CCP (coeficiente de correlación = 0,147, IC del 95 % =0,033-0,258, p = 0,012) (Bae et al., 2018).

Rovas et al., en 2020, reportan en un estudio en el que se incluyeron 148 pacientes con periodontitis, 64 pacientes con AR + periodontitis y 84 pacientes con periodontitis. En este estudio encontraron diferencias estadísticamente significativas p=0009 en la profundidad al sondaje en el grupo AR + periodontitis (2,81 ± 0,59 mm) en comparación con el grupo únicamente con periodontitis ( 2,58 ± 0,49 mm), al igual que con la pérdida dental (6,27±4,79 vs. 3,93±4,08; P=0,001). La asociación entre la AR y la profundidad al sondaje fue reportada con un OR de OR, 2,22; 95% CI, 1,16–4,31; P=0,016 (Rovas et al., 2020).

Recientemente Li et al., 2022, en un metaanálisis de 28 estudios reportan un aumento significativo en el riesgo de AR en individuos con *P. gingivalis* (OR = 1,86; IC del 95 %: 1,43-2,43). El análisis de subgrupos reveló que los OR combinados de las poblaciones ubicadas en Europa (OR = 2,17; IC del 95 %: 1,46-3,22) y América del Norte (OR = 2,50; IC del 95 %: 1,23-5,08) fueron significativamente más altos que los de la población de Asia ( OR = 1,11;IC 95%: 1,03-1,20). Se observó heterogeneidad significativa, pero no influyó significativamente en el resultado general. Los autores concluyen que la exposición a *P. gingivalis* es un factor de riesgo en la AR y sugieren que el diagnóstico rápido y las decisiones de manejo sobre la terapia antimicrobiana de *P. gingivalis* evitarían el desarrollo y la progresión de la artritis reumatoide (Li et al., 2022).

## 1.4 Conclusión

La evidencia científica confirma la asociación bidireccional entre la periodontitis y la AR, siendo la *P. gingivalis* y su PPAD el link entre las dos enfermedades inflamatorias crónicas que presentan características similares en su patogénesis. Sin embargo, la evidencia en la relación de otros factores de virulencia de la bacteria como las gingipaínas aún es poca y se deben estudiar con mayor detalle.

## 2. Producción y purificación de peptidilarginina deiminasa (PPAD) recombinante de *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* es un patógeno clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal (Hajishengallis et al., 2012), esta bacteria junto con otros microorganismos orales se han responsabilizado como causantes de la disbiosis en el surco gingival, debido a su proliferación en la placa subgingival lo cual induce la exacerbación de la respuesta inmunológica, dejando como consecuencia la destrucción de los tejidos de soporte del diente y a futuro la pérdida del diente en un estadio avanzado de la periodontitis (Potempa et al., 2017).

Esta bacteria es un cocobacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado, con una variedad de factores de virulencia entre los que destacan el lipopolisacárido, fimbrias, las gingipaínas (Kgp, RgpA, RgpB), la peptidilarginina deiminasa (PPAD) (Guevara et al., 2019; Stobernack et al., 2016), además de vesículas de membrana externa (Nakao et al., 2014).

Las enzimas PAD son un grupo de enzimas que inducen la conversión de arginina a citrulina en un proceso denominado citrulinación, este es un proceso fisiológico en humanos, sin embargo, en procesos patológicos la citrulinación favorece la generación de anticuerpos anti-CCP que se correlacionan con la presencia de la AR y son detectados tempranamente incluso antes del inicio de los síntomas (Puszczewicz et al., 2011). La AR, es una poliartritis inflamatoria crónica de origen autoinmune y multifactorial caracterizada por sinovitis, depósito de fibrina y daño en el cartílago de las articulaciones, de estas las más afectadas son los dedos de las manos, las muñecas, las rodillas, los pies y los tobillos (Firestein et al., 2013).

En el género *Porphyromonas*, se ha descrito una PAD conocida como PPAD, en estas bacterias se han reportado citrulinación de proteínas del hospedero como propias favoreciendo la producción de anticuerpos contra las proteínas citrulinadas (Krutychłowa et al., 2022; Mangat et al., 2010). La PPAD de *P. gingivalis* es una enzima de 61,7 kDa, con una actividad óptima a 55°C y se diferencia de las PAD humanas en que esta no depende de calcio para su funcionamiento y únicamente tiene capacidad de citrulinar argininas en el extremo C-terminal de las proteínas tanto de la bacteria como del hospedador (McGraw et al., 1999; Quirke et al., 2014).

La función fisiológica de la PPAD en las cepas de *P. gingivalis* aún no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, algunas investigaciones han aportado a este entendimiento. Se ha podido establecer que PPAD tiene un impacto significativo en la formación del biofilm oral y que la citrulinación de dominios de adhesinas de las gingipaínas pueden afectar esta formación (Krutyholowa et al., 2022; Bereta et al., 2019; Vermilyea et al., 2019; Stobernack et al., 2016).

En este mismo sentido, Gawron et al., (2014) demostraron que la PPAD es una proteína importante en la adhesión e invasión de *P. gingivalis* en fibroblastos gingivales humanos primarios, ya que la delección del gen que codifica para esta proteína en una cepa no capsulada evita este proceso. Gully et al., en 2014 en un modelo de periodontitis experimental en ratones confirmaron que en la cepa W50 de *P. gingivalis* mutante para PPAD se reduce significativamente la inflamación gingival y la extensión de la AR en estos animales, confirmando de esta manera la relación entre las dos entidades y la participación de esta proteína en el proceso (Gawron et al., 2014; Gully et al., 2014).

Adicionalmente, se ha reportado la relación entre los títulos de anti-CCP con un aumento en la actividad de la AR, sin embargo, la relación entre estas dos patologías es controversial debido a que hay estudios que respaldan la relación entre estas dos enfermedades (Ma et al., 2021; Jennings et al., 2020; Gómez-Bañuelos et al., 2019; Quirke et al., 2014; Okada et al., 2013) sin embargo hay autores que niegan esta relación (Muñoz-Atienza et al., 2020; König et al., 2015).

Además de la asociación con la AR bien documentada, se ha encontrado implicación de la PPAD con la enfermedad de Alzheimer y la aterosclerosis. En una revisión de literatura se describe como los procesos de citrulinación medidos por PAD 2 y PAD 4 conducen la producción de autoanticuerpos que contra la proteína de mielina que se asocian con demencia, estos mismos autores proponen a la PPAD como un factor potencial de citrulinación de proteínas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, aunque hacen falta estudios al respecto. En cuanto a la asociación aterosclerosis, aunque no es clara aún se ha podido encontrar proteínas citrulinadas en placas ateroscleróticas principalmente en pacientes con AR, adicionalmente, se han encontrado proteínas que favorecen la vasodilatación como la bradiquinina citrulinada, lo que al parecer mantiene esta vasodilatación activa y prolongada (Olsen et al., 2018. Giles et al., en 2012, reportan un aumento en la citrulinación en el miocardio de pacientes con AR en comparación con el grupo control y no se descarta que esto mismo ocurra en población general sin la enfermedad autoinmune y que parte de la asociación de *P. gingivalis* con enfermedad cardiovascular sea por esta vía.

De ahí la importancia de contar con un antígeno adecuado para la detección de anticuerpos anti-PPAD, por lo cual se propuso en este estudio desarrollar una PPAD recombinante como antígeno para la evaluación de los anticuerpos contra esta proteína en pacientes con AR comparados con individuos sanos sistémicamente.

## 2.1 Materiales y métodos

### 2.1.1 Amplificación de los fragmentos N-terminal y C-terminal de PPAD por PCR

La estrategia metodológica desarrollada en este trabajo incluyó la producción de la proteína PPAD en dos fragmentos, el N-terminal (NT) y el C-terminal (CT). Esta metodología se realizó de esta manera con la finalidad de facilitar el proceso y debido a que se requiere únicamente como antígeno para la búsqueda de anticuerpos en un grupo de individuos, mas no se buscaba obtener la proteína de manera funcional.

Las secuencias de los primers para PPAD-NT y PPAD-CT fueron diseñados usando la herramienta Primer3Plus: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, con la secuencia de la PPAD de *P. gingivalis* (NC\_002950.2) reportada en el GenBank del National Library of Medicine (NIH). Se realizó verificación de los primers obtenidos con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además, de una PCR *in silico* y se confirmó que el marco abierto de lectura no se corra para los dos fragmentos haciendo la traducción a proteína mediante la herramienta ExPASy (<https://www.expasy.org/>), esta traducción fue usada para confirmar que el producto corresponde a PPAD empleando la herramienta BLAST de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/>). Durante el diseño se tuvo en cuenta incluir sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *NsiI*, con el fin de que los productos de PCR se pudieran insertar en los plásmidos para la clonación, además de un tag de Histidinas para realizar el seguimiento de las proteínas durante la purificación. Las secuencias de los primers se describen en la figura 2-1.

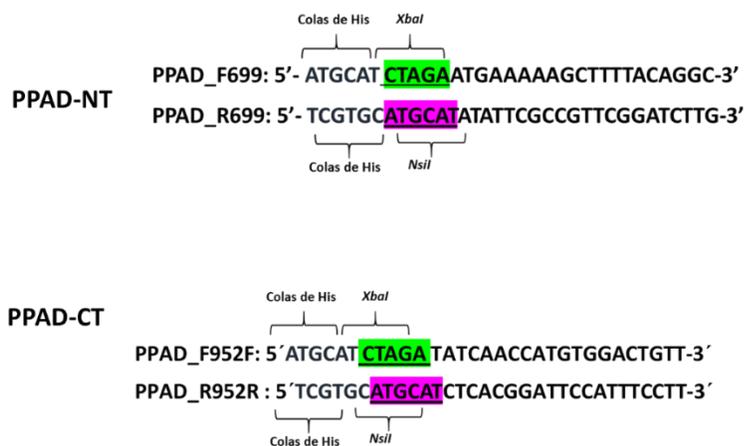
Se amplificaron los dos fragmentos por separado por PCR usando como plantilla DNA de *P. gingivalis* de la cepa de referencia ATCC 33277, la cual se cultivó en agar Brucella (BD BBL™) suplementado con 5% de hemina, 5% menadiona, 5% de sangres de cordero. Posteriormente se incubó durante 4 días en condiciones de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England), una vez confirmada la pureza del cultivo se pasaron algunas colonias a un tubo de agua grado molecular, posterior a homogenización fue almacenado a -30°C y se realizó la extracción por choque térmico, la calidad del DNA fue evaluado por cuantificación con NanoDrop 2000.

La amplificación del DNA se realizó por PCR convencional, el método fue estandarizado y con las siguientes condiciones: la mezcla de PCR consistió en MgCl<sub>2</sub> 2 mM, buffer 1X [GoTaq Polimerasa® (Promega)], dNTPs 0,4 mM, primers 1µM, DNA GoTaq G2 Polimerasa® (Promega) 0,125U y 3µL de DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277. El corrido se llevó a cabo en un termociclador T100 (Biorad®) con un ciclo inicial de 94°C durante 50

segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos, y un paso final de extensión de 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 80V durante 30min. Visualizados en un digitalizador de imágenes GelDoc (Biorad®), la fracción de PPAD-NT se evidenció a una altura de 699 pb, y la de PPAD-CT se logró evidenciar a una altura de 952pb. Se realizó la purificación de los fragmentos a partir de las bandas usando Montage DNA gel extraction kit (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante.

**Figura 2-1:** Secuencias de los primers de PPAD-NT y PPAD-CT. Se indican los sitios de restricción y las secuencias para las colas de Histidinas.



### 2.1.2 Clonación de PPAD-NT y PPAD-CT

La estrategia metodológica para la clonación de la PPAD consistió en dos clonaciones, una primera en un vector de propagación (pGEM R-T) y una segunda en un plásmido de expresión (pET).

Para la primera clonación los productos de PCR purificados fueron insertados en el vector pGEM R-T (Easy Vector System I-20 Promega®) siguiendo las proporciones de inserto, vector y T4 ligasa recomendadas por los fabricantes. La reacción de ligación se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo de la ligación el plásmido recombinante fue transformado en *E. coli* Top 10 y plaqueado en agar Luria Bertani (Difco™ LB Agar Miller) suplementado con ampicilina (Sigma) a 100µg/mL (LB-AMP), después de la incubación durante 24 horas a 37°C se observó el crecimiento que corresponde a las células que capturaron el plásmido, se repicaron las colonias en agar LB-AMP para posteriormente hacer el rastreo de las colonias por PCR usando las mismas condiciones previamente descritas.

Las colonias con el inserto confirmadas por PCR, se sembraron en 5mL de caldo LB (Luria Bertani) con 100µg/mL de ampicilina y se incubó durante 18 horas en agitación (150rppm) a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 3500rpm a temperatura ambiente y se retiraron los sobrenadantes.

Se empleó un protocolo *in house* para la extracción de plásmidos, para lo anterior se adicionaron 250µL de la solución I (Glucosa 50nM, Tris HCl 25mM pH 8, EDTA 2,5mMpH8,0, RNAsa 10µg/mL) y 250 µL de solución II (lisis) (NaOH 0,2M, SDS1%), se mezcló por inversión hasta homogenizar y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego se agregó la solución III (acetato de potasio 3M pH4,8) y se mezcló por inversión, se incubó durante 5 minutos a 4°C, se centrifugó a 14.000rpm durante 5 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a nuevo tubo estéril.

El sobrenadante se precipitó con etanol absoluto grado molecular frío y se incubó a -80°C durante una hora. Posteriormente, se centrifugó a 14.000rpm durante 15 minutos a 4°C, el precipitado se realizó un lavado con etanol absoluto grado molecular, posteriormente se realizó otro lavado con etanol al 70%, después de centrifugación el DNA plasmídico fue secado en el Savat DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific) durante 5 minutos y se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O estéril grado molecular, se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, con el fin de confirmar la presencia del ADN plasmídico y fueron cuantificados usando NanoDrop (Thermo Scientific).

Una vez purificados los plásmidos se procedió a hacer la segunda clonación en el plásmido de expresión, para esto se realizó la digestión con enzimas de restricción para el plásmido pGEM (Easy Vector System I-20 Promega®) con el fin de liberar el inserto con extremos cohesivos, para proceder a la segunda clonación en el vector de expresión pET (Champion™ expression plasmid pET302/NT-His and pET303/CT. Invitrogen).

Se realizó una primera digestión del plásmido pGEM con la enzima de restricción *Xba*I durante 16 horas a 37°C, pasado el tiempo se detuvo la reacción a 65°C durante 20 minutos. La segunda restricción se realizó con la enzima *Nsi*I durante 3 horas a 37°C.

Una vez confirmada la digestión del producto y del vector de expresión por electroforesis, el producto fue purificado a partir de gel de agarosa usando el kit Montage DNA gel extraction kit (Millipore) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El producto después de la digestión fue insertado en el vector de expresión pET (Champion™ expression plasmid pET302/NT-His and pET303/CT. Invitrogen), las proporciones inserto-vector fueron las recomendadas por el fabricante.

La ligación fue incubada a temperatura ambiente durante toda la noche y se realizó la transformación en *E. coli* BL21 como se describió previamente. El rastreo de las colonias transformantes se realizó por PCR usando las condiciones previamente descritas.

Se confirmó la dirección del inserto por PCR usando primers del promotor T7 del plásmido con diferentes combinaciones con el primer directo y reverso del inserto, además fue confirmado por secuenciación Sanger (Macrogen) una vez confirmada la dirección del inserto se procedió a realizar la inducción de la expresión de cada fragmento de la proteína.

### **2.1.3 Inducción de la expresión de PPAD- NT y PPAD-CT en *E. coli* BL21**

Se preparó un preinóculo con una de las colonias consideradas clones en caldo LB con ampicilina (100µg/mL) y fue incubado durante toda la noche a 150rpm a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación se realizó una dilución 1:50 del preinóculo en caldo LB con ampicilina y se incubo en agitación (150rpm) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 0,4 y 0,5 a una longitud de onda de 600nm. Una vez alcanzada la DO se realizó la inducción con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1mM.

La inducción se evaluó en diferentes tiempos (2, 4, 6 y 16 horas), pasado el tiempo de incubación se separaron las bacterias de los sobrenadantes. Posteriormente se realizó SDS-PAGE al 12% a 80V durante 30min y fue teñido con azul de Coomassie para confirmar la presencia de la proteína recombinante en los sobrenadantes o en los pellets celulares, se pudo determinar que la proteína se encuentra en los pellets bacterianos y no en los sobrenadantes, por lo que se procede a realizar la lisis bacteriana y posterior purificación de PPAD-NT y PPAD-CT recombinante.

### **2.1.4 Purificación de la PPAD-NT y PPAD-CT**

Por tratarse de una proteína no secretada se realizó la lisis bacteriana, para esto se adicionó lisozima (1 mg/mL) junto con cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma P8340; 1 mM AEBSF, 14 µM E64, 15 µM Pepstatin A, 40 µM Bestatin, 20 µM Leupeptin, 0,8 µM Aprotinin). Se realizaron dos ciclos de congelación a -80°C durante 10 minutos, y descongelación a 37°C durante 10 minutos. Pasado este tiempo se sometió la muestra a 5 min de sonicación sobre hielo Vibra-cell VCX 130 (Sonics), 40 % de amplitud, 30 s de pulso y 15 s de reposo, la muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 20 min a 4°C, separándose el sobrenadante (fracción soluble) y el pellet (fracción insoluble o cuerpos de inclusión). A partir de los cuerpos de inclusión se realizó purificación de la proteína recombinante en condiciones denaturantes, con el sistema de purificación Ni-NTA (HisPur™ Ni-NTA Resin Thermo) siguiendo las indicaciones del fabricante, usada para purificación de proteínas etiquetadas con residuos en tándem de histidinas.

La purificación se confirmó por SDS-PAGE al 14% de los eluidos obtenidos de la purificación con resina Ni-NTA, y posteriormente por Western blot, para lo que se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride) Thermo Scientific de 0,45µm, con buffer de transferencia 1X (Tris base 25mM, glicina 192mM,

metanol 10% v/v, pH8,3), durante 1 h a 30V en el equipo PierceFast Semi-Dry Blotter (Thermo Scientific). Se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con (Tris-buffered saline Tween) TBS-T-leche descremada al 5% durante 2 horas.

Una vez pasado el tiempo de bloqueo se incubó a temperatura ambiente la membrana con el anticuerpo primario (His-Tag Antibody Cell Signaling) en una dilución 1:1000 durante tres horas. Pasado este tiempo se realizaron tres lavados con TBS-T-leche descremada al 5% y se adicionó el anticuerpo secundario anti-Rabbit HRP (KPL) (0,2 µg/mL) en TBS-T y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron tres lavados con TBST-leche descremada al 5% y se procedió a revelar por quimioluminiscencia con luminol (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Thermo), la reacción fue evidenciada en el equipo ChemiDoc (BioRad®) y las imágenes digitalizadas con el programa Imaging System (BioRad®).

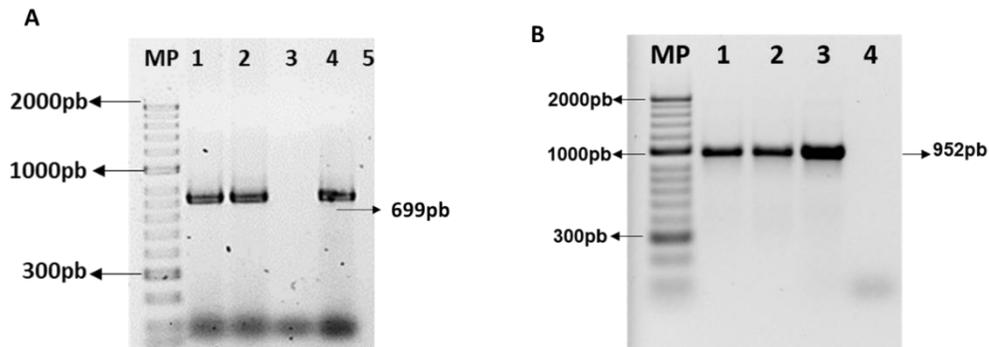
## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Amplificación de los fragmentos PPAD -NT y PPAD-CT por PCR

Se estandarizó una PCR convencional con el fin de obtener los fragmentos de PPAD-NT y PPAD-CT, para ello se empleó DNA de *P. gingivalis* ATCC33277 como plantilla, estos fragmentos se amplificaron con éxito, se evidencia la presencia de la banda a la altura deseada 655 pb para PPAD-NT y de 952 pb para PPAD CT, las bandas encontradas corresponden a los tamaños esperados a partir de los primers diseñados (figura 2-2 A y B). Con estos fragmentos se realizó la clonación.

Este método de PCR convencional estandarizado fue empleado además para la confirmación de las colonias que se consideraron transformantes en el medio LB-AMP durante la clonación con el plásmido pGEM y el con el pET.

**Figura 2-2:** Gel de agarosa para la detección de los fragmentos de PPAD-CT y PPAD-NT amplificados a partir de DNA de *P. gingivalis*. **A.** Confirmación del fragmento PPAD-NT. MP: Marcador de peso molecular (50pb), líneas 1 y 2: DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277, línea 3 control negativo, línea 4 control positivo; **B.** Confirmación del fragmento PPAD-NT. MP: Marcador de peso molecular (50pb), líneas 1 y 2: DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277, línea 3 control positivo, línea 4 control negativo.

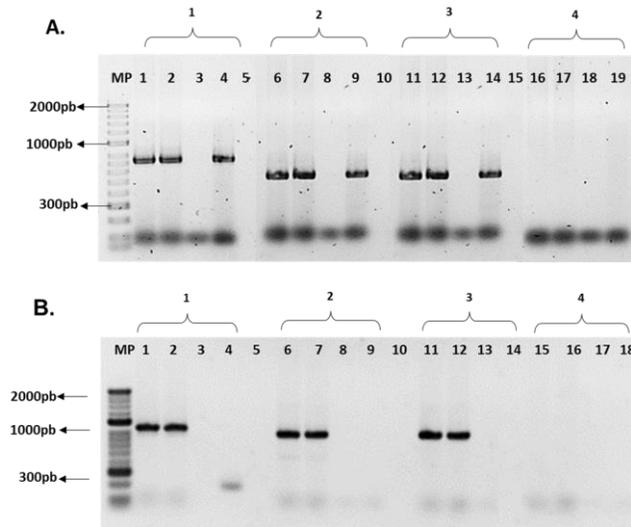


### 2.2.2 Confirmación de la dirección de inserto en el pET por PCR y secuenciación

Las colonias que fueron consideradas transformantes con el inserto para PPAD-NT y PPAD-CT, se evaluaron por PCR con diferentes combinaciones de primers para confirmar la direccionalidad adecuada del inserto, además se confirmó por secuenciación Sanger, con el fin de asegurar que la proteína expresada realmente corresponde a la PPAD.

En la figura 2-3 se puede observar las diferentes combinaciones de primers con el promotor T7 del vector y del inserto con el fin de verificar la dirección del inserto. El set de primers para los dos fragmentos muestra un tamaño superior al esperado esto debido a que se está amplificando el fragmento correspondiente a PPAD-NT de 699pb (figura 2-3 A-corchete 1) o de PPAD-CT de 952pb (figura 2-3 B-corchete 1) con una porción de la RNA polimerasa T7, aquí no se confirma la dirección del inserto únicamente la presencia de este. Posteriormente, se puede observar la amplificación a la altura esperada para cada uno de los fragmentos según corresponde con el segundo set de primers los cuales son primer directo de la T7 y el reverso del fragmento de PPAD confirmando que el fragmento se clonó en la dirección correcta (corchete 2), el tercer set de primers correspondiente al directo de PPAD y el reverso de la T7 confirma nuevamente dirección de la clonación por lo que se observa cada producto a la altura esperada (corchete 3). Finalmente, el último set de primers usando el primer directo de PPAD y el directo de la T7 no mostro amplificación confirmando la direccionalidad del inserto (corchete 4).

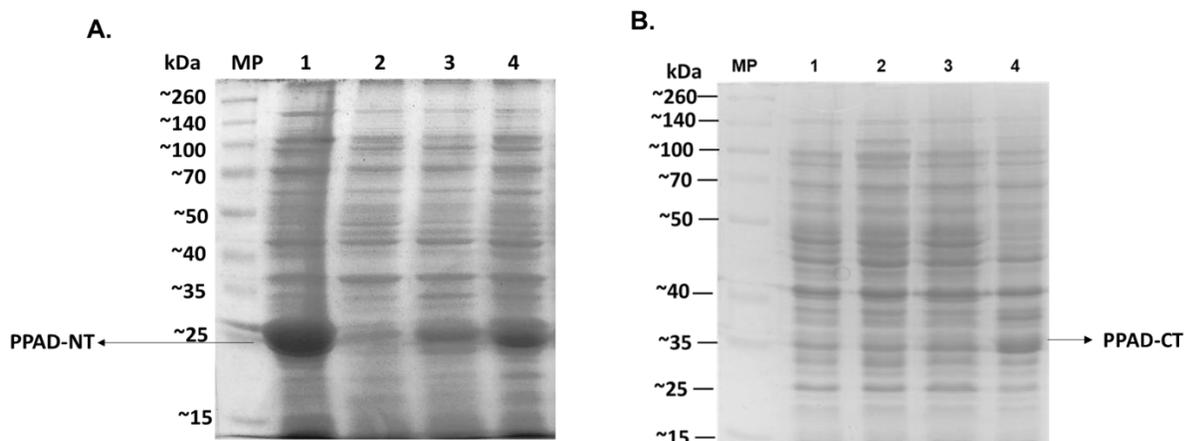
**Figura 2-3:** Confirmación de la dirección del fragmento clonado en el pET. En corchete se indica el set de primers. **A.** MP: Marcador de peso molecular 50pb; líneas: 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 17 y 19 DNA plasmídico con el inserto de PPAD-NT; líneas: 3, 8, 13 y 18 controles negativos; líneas 5, 10 y 15 pozos vacíos. **B.** MP: Marcador de peso molecular 50pb; líneas: 1, 2, 6, 7, 11, 12, 15 y 16 DNA plasmídico con el inserto de PPAD-NT; líneas: 3, 4, 8, 9, 13, 14, 17 y 18 controles negativos; líneas 5, 10 pozos vacíos.



### 2.2.3 Inducción en la expresión de PPAD-NT y PPAD-CT

Una vez se confirmó la direccionalidad se realizó la inducción de la expresión de la proteína PPAD-NT y PPAD-CT como se describió en materiales y métodos en *E. coli* BL21. Se confirmó la expresión de la proteína PPAD-NT después de la inducción después de 2 horas de inducción con IPTG 1mM, en la figura 2-4A se puede observar una banda gruesa a 25kDa aproximadamente que corresponde a la proteína PPAD-NT. Por otro lado, el fragmento de PPAD-CT se evidenció la expresión a las 4 horas de inducción como se muestra en la figura 2-4B con un tamaño de 32 kDa aproximadamente. En los sobrenadantes no se encontró la presencia de proteína PPAD, se concluye que la proteína está en cuerpos de inclusión y por ello se requirió de la extracción para lograr purificar los dos fragmentos de la proteína PPAD.

**Figura 2-4:** SDS PAGE de la expresión de los fragmentos de PPAD previamente clonados en diferentes tiempos de inducción en *E. coli* BL21 con IPTG 1mM A. Expresión de PPAD-NT en pellets tras la inducción. MP: Marcador de peso molecular, línea 1: 2 h de inducción, línea 2: 4 h de inducción, línea 3: 6 h de inducción, línea 4: 16 h de inducción. B. Expresión de PPAD-CT en pellets tras la inducción. MP: Marcado de peso molecular, línea 1: sin inducción 2 h incubación; línea 2: 2 h de inducción, línea 3: 4 h de inducción, línea 4: 4 horas de inducción. Tinción con azul de Coomassie.



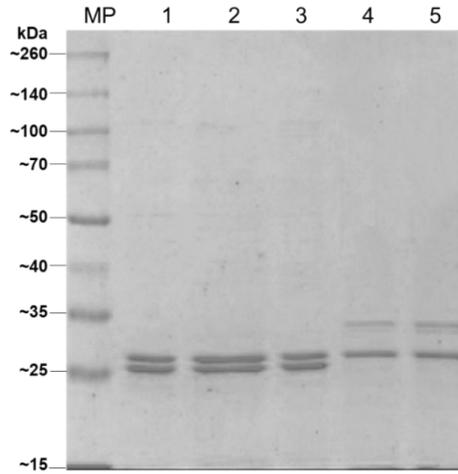
## 2.2.4 Purificación de PPAD-NT y PPAD-CT

Después de la inducción de cada uno de los fragmentos, se procedió a realizar la purificación de los fragmentos con la resina acoplada a níquel (Ni-NTA, Invitrogen), que permite la purificación de proteínas con Tag de Histidinas. En la figura 2-5 se puede evidenciar el SDS-PAGE con coloración de azul de Coomassie, en el que se muestran los eluidos obtenidos de esta purificación. Se observan dos bandas para la PPAD-NT (líneas 1, 2 y 3) a alturas entre ~25 y 27 KDa y dos bandas para PPAD-CT (líneas 4 y 5) a alturas entre ~27 y 32 KDa, este doble bandeo en el caso de la purificación de los dos fragmentos de PPAD podría ser debido a isoformas de la proteína, este fenómeno es común en estos procesos de obtención de proteínas recombinantes.

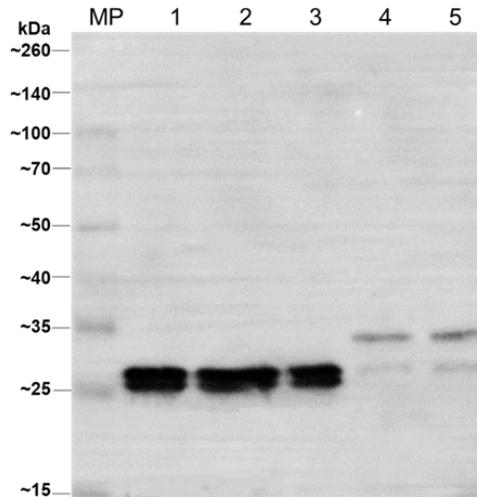
La producción y purificación de la proteína PPAD se confirmó por Western blot usando un anticuerpo anti-Histidinas, en la figura 2-6 se puede observar la confirmación de la purificación de los dos fragmentos de la proteína, además se confirmó que el doble bandeo corresponde a la proteína recombinante, confirmando así las isoformas de cada fragmento.

Estos dos fragmentos de la proteína PPAD pueden ser usados como antígeno para buscar anticuerpos anti-PPAD en suero de pacientes con enfermedades sistémicas en la que está asociada la citrulinación, como la AR y la enfermedad de Alzheimer.

**Figura 2-5:** SDS-PAGE de la purificación de PPAD-NT y PPAD-CT mediante resina Ni-NTA. MP: Marcador de peso molecular. Líneas 1, 2 y 3: eluidos de PPAD-NT; líneas 4 y 5: eluidos de PPAD-CT de la purificación por la resina Ni-Nta. Gel de poliacrilamida al 14%, 80V, 60min, tinción con azul de Coomasie.



**Figura 2-6:** Western blotting para PPAD-NT y PPAD-CT. MP: Marcador de peso molecular. Líneas 1, 2 y 3: elución purificada de PPAD-NT; líneas 4 y 5: elución purificada de PPAD-CT.



## 2.3 Discusión

En este estudio se propuso clonar por aparte la PPAD en sus extremos amino terminal y carboxilo terminal, si bien, por lo general el objetivo de la expresión de proteínas recombinantes es evaluar su actividad bioquímica o biológica, como catálisis enzimática o interacciones ligando-proteína, es decir generar una proteína activa. Con frecuencia, la actividad deseada es apoyada por un dominio discreto, y por lo tanto a menudo no es necesario expresar la proteína de longitud completa, esto dependerá de los objetivos

finales de la proteína. Al expresar un dominio de proteína, la elección de los extremos N y C-terminales representa una consideración importante porque incluso pequeñas diferencias pueden dramáticamente influir tanto en la solubilidad como en la expresión de esta (Structural Genomics Consortium et al., 2008).

En este trabajo se produjo la proteína PPAD en dos fragmentos, para favorecer la metodología y obtención de la proteína, buscando que fuese secretada espontáneamente, considerando que muchos de los polipéptidos recombinantes producidos en altos niveles en *E. coli* se localizan en el citoplasma en forma insoluble y compacta, formando cuerpos de inclusión que requieren de procesos adicionales de purificación y que finalmente alteran la actividad de la proteína (García et al., 2013). Adicionalmente, producir proteína de más de 50kDa generan complicaciones técnicas mayores a las que se pueden presentar en proteínas más pequeñas. Así mismo, se ha descrito que la proteína completa es inestable, y genera niveles bajos de expresión. Otros autores como Rodríguez et al., en 2009, han producido esta PPAD recombinante en *E. coli* y han podido evaluar su actividad enzimática, en este estudio la proteína no fue secretada por lo que requirió procesos de lisis. Sin embargo, como el fin de este trabajo no era evaluar actividad enzimática este proceso de lisis no afectó las recombinantes realizadas para ser usadas como antígeno en la búsqueda de anticuerpos en pacientes.

Las proteínas secretadas por *E. coli* de forma insoluble, es una consecuencia del plegamiento de proteínas, la agregación y la acumulación intracelular como cuerpos de inclusión; a veces puede no observarse una expresión suficiente debido a la degradación de la proteína o la traducción insuficiente (el ARNm puede permanecer en la estructura secundaria y obstaculizar la traducción) (Structural Genomics Consortium et al., 2008).

Los sistemas de secreción de proteínas son vitales para la vida procariota, agentes químicos, podrían afectar estos procesos favoreciendo la liberación de factores de virulencia, afectando la actividad de estas proteínas. En los sistemas de clonación en *E. coli*, se puede afectar la proteína a producir ya que es una bacteria cuyos sistemas de secreción están determinados por los tipos III y V únicamente (Vidal et al., 2007). Sin embargo, *P. gingivalis* presenta como sistema de secreción el tipo IX (T9SS), un tipo de secreción de proteínas recientemente descrito para unas especies del filum *Bacteroidetes* el cual transloca proteínas a través de la membrana externa, en el cual las proteínas que van a ser secretadas deben tener un dominio C-terminal conservado por lo que es eliminado por una proteasa con actividad de sortasa y un LPS aniónico se une al C-terminal recién formado. Como resultado, una proteína podría ser secretada en el medio extracelular o unida covalentemente a la superficie bacteriana (Gorasia et al., 2022; Gorasia et al., 2015), de acuerdo con esto, producir proteínas de *P. gingivalis* en *E. coli* tiene limitaciones en cuanto a la actividad real de la proteína ya que no tendría los cambios postraduccionales que son esenciales para la actividad funcional de las proteínas bacterianas, se ha propuesto generar estas proteínas usando como células huésped alguna bacteria perteneciente al filum *Bacteroidetes*, superphylum *Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes* (FCB), sin embargo, esto hace el proceso muy costoso y demorado, por

tratarse de microorganismos anaerobios exigentes nutricionalmente y de crecimiento lento (Veillard et al., 2015). En este trabajo se propuso generar dos fracciones de la proteína PPAD para ser usadas como antígenos inductores de anticuerpos en pacientes con AR, por lo que la actividad de la enzima no era objetivo primario y por ello se desarrolló en *E. coli* y en dos fracciones.

Stobernack et al., (2016) reportan diferencias entre la capacidad de citrulinación de las diferentes cepas de *P. gingivalis* a partir de algunos aislamientos clínicos, comparando las cepas de referencia W83, ATCC 33277 y aislamientos clínicos como el MDS 45 y el MDS 16, dando como resultados que la cepa W83 y el aislamiento MDS 45 son potenciales citrulinantes de 25 proteínas extracelulares de *P. gingivalis*, después de un análisis proteómico se reveló la presencia de dos péptidos del dominio C-terminal en estas cepas, lo que sugiere que el procesamiento incompleto de la proteína mediante la secreción de la misma influye en la actividad enzimática de PPAD y que probablemente los péptidos asociados al aumento de la actividad de la AR asociados con citrulinación, estén en la región carboxilo terminal de la proteína.

Por otro lado, en este trabajo la estrategia consistió en dos clonaciones en diferentes vectores, la clonación inicial en el plásmido de propagación pGEM R-T permite una fácil clonación, debido a que agregan una timidina en el extremo 3 terminal del sitio de inserción, lo cual mejora en gran medida la ligación del inserto al plásmido, evitando la recirculación de este, *E. coli* TOP10 es un hospedador ideal para la propagación del plásmido debido a que proporciona una eficiencia de transformación de  $1 \times 10^9$  UFC X  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico (ThermoFisher). Posterior a esta primera clonación de propagación, se realizó clonación del fragmento de interés en el plásmido de expresión, pET es un plásmido ideal para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 debido a que en el plásmido se encuentra el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, al inserto estar presente en la zona del operón *Lac* se asegura que con la inducción con IPTG se evidenciara una alta expresión de la proteína clonada, como se evidenció en este trabajo (Jeong et al., 2015).

El sistema de purificación de proteínas Ni-Nta es un método que permite la purificación de proteínas recombinantes que contienen un Tag de histidinas mediante la afinidad y selectividad que tienen los iones de Niquel en este caso con los residuos de histidina (Crowe et al., 1995). Por lo tanto, existe una ligera posibilidad de debilitamiento de la actividad proteica o alteración de su plegamiento adecuado, (Owczarek et al., 2019) generando variantes o isoformas de un peso molecular similar al producto esperado y que se logran ver en el análisis por SDS-PAGE. Con esta metodología se logró purificar la proteína recombinante de PPAD en sus extremos N-terminal y C-terminal. Las isoformas de proteínas ocurren comúnmente en la naturaleza y en productos producidos por tecnologías de ADN recombinante.

Las implicaciones biológicas de estas isoformas no son fáciles de determinar. Puede ser necesario realizar un trabajo adicional de caracterización biológica para evaluar las consecuencias biológicas de las isoformas (Federici et al., 2003), aunque en este estudio

no se requieren este tipo de evaluaciones. Sin embargo, la generación de isoformas de la misma proteína no interfirió en la detección por los anticuerpos contra esta proteína sérica, debido a que las secuencias de aminoácidos específicos reconocidos por los anticuerpos no fueron afectadas.

También la aparición de bandas cercanas al producto esperado puede deberse a ligeras degradaciones que sufre la proteína en los cambios abruptos de temperatura y condiciones durante el proceso de lisis y fijación a la resina, sin que se trate de otra proteína.

En conclusión, se obtuvieron con éxito los fragmentos amino y carboxilo terminal de la PPAD recombinante, con una alta pureza y un alto rendimiento, lo que permitirá su uso como antígeno para la búsqueda de anticuerpos en muestras de pacientes con artritis reumatoidea.

## **2.4 Conclusión**

Se obtuvieron con éxito los fragmentos: amino terminal y carboxilo terminal de la PPAD recombinante, con una alta pureza y un alto rendimiento, lo que permitirá su uso como antígeno para la búsqueda de anticuerpos en muestras de suero de pacientes con AR y a futuro de otras enfermedades sistémicas en que esta proteína este implicada.

### **3. Purificación de RgpA a partir de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* (Castillo et al., 2022)**

*P. gingivalis*, una bacteria anaerobia estricta, asacarolítica, produce enzimas proteolíticas que son considerados factores de virulencia y realizan diferentes funciones en la fisiología bacteriana. Estas enzimas son esenciales para adquirir aminoácidos como fuentes de carbono y energía, promover el crecimiento bacteriano, procesar proteínas de la membrana externa, expresar fimbrias y regular y expresar proteasas (Kuramitsu et al., 1998).

La capacidad proteolítica de estas gingipaínas favorece la patogénesis de *P. gingivalis*, afectando la respuesta inmune al degradar anticuerpos y citocinas, inactivando los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) y favoreciendo la escisión proteolítica de los receptores de membrana CD14 (Wilensky et al., 2013). Degradan los factores del complemento C3 y C5 lo que lleva a la infiltración leucocitaria, y ayudando a la respuesta inflamatoria y persistencia de bacterias en las bolsas periodontales (Wingrove et al., 1992; Imamura et al., 2003a; Imamura et al., 2003b). Además, activan las metaloproteinasas de matriz (MMP) e inactivan los inhibidores intrínsecos de proteasas, favoreciendo la destrucción del tejido periodontal, aumentando la permeabilidad vascular, alterando la cascada de coagulación local y favoreciendo la hemaglutinación y la formación de biofilm (Jia et al., 2019; Nemoto et al., 2016). Aunque la Lys-gingipaína se ha asociado con el desarrollo de periodontitis en un modelo murino (Pathirana et al., 2007), las Arg-gingipaínas también se han relacionado con el desarrollo y la progresión de la periodontitis y otras afecciones sistémicas, como la enfermedad de Alzheimer (Dominy et al. 2019), la enfermedad de Parkinson (Adams et al., 2019), complicaciones del embarazo (Chen et al., 2009; Schenkein et al., 2013) y AR (Johansson et al., 2016; Jasemi et al., 2021).

Aunque las gingipaínas se expresan constitutivamente en *P. gingivalis*, sus niveles de actividad varían entre los aislamientos clínicos debido a diferencias genéticas y estímulos ambientales (Seers et al., 2020). Sin embargo, se ha confirmado que, a nivel genético, la secuenciación del genoma de *P. gingivalis* mostró baja diversidad y alta conservación de *rgpA* y *rgpB*, el dominio catalítico de Kgp tiene dos variantes y el dominio de adhesina tiene tres variantes (Dashper et al., 2017).

Las vesículas de membrana externa (OMV), son mecanismos de secreción de muchas especies de bacterias y en *P. gingivalis*, se ha reportado de 3 a 5 veces mayor cantidad de gingipaínas en estas vesículas comparadas con las concentraciones detectadas en los extractos de la bacteria completa (Potempa et al, 1995a; Li et al., 2011; Nakao et al., 2014). Adicionalmente, se ha descrito que las cepas que presentan una vesiculación mayor son aquellas con fimbrias mayores como la cepa ATCC 33277 (alelo fimbrial tipo I) y la cepa ATCC 49417 (alelo fimbrial tipo III), el proceso de vesiculación es dependiente de fimbrias, cepas capsuladas como la W83 presenta fimbrias tipo IV y la capacidad de vesiculación es inferior (Xie et al., 2015). Se ha descrito que la cepa HG66 no retiene gingipaínas debido a una mutación espontánea por lo que las secreta al medio de cultivo en altas concentraciones (Potempa et al, 2007).

El análisis de espectrometría de masas de OMV obtenido de las cepas de *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83 reveló que las gingipaínas (RgpA, RgpB y Kgp) comprenden una alta proporción de las proteínas vesiculares (Mantri et al., 2015). Por ser factores de virulencia importantes de este microorganismo, es necesaria la purificación de estas proteasas con el fin de estudiar más a fondo su implicación en periodontitis y alteraciones sistémicas (Dominy et al., 2019; Adams et al., 2019; Chen et al., 2009; Schenkein et al., 2013; Johansson et al., 2016), se ha reportado previamente la obtención con éxito de la RgpB de manera nativa (Potempa et al., 2007), así como la producción de RgpB de manera recombinante (Veillard et al., 2015). Sin embargo, las gingipaínas *in vivo* requieren de una serie de modificaciones postraduccionales antes de ser secretadas, lo que hace que estas enzimas tengan actividad y no sufran degradación por procesos auto-proteolíticos, para que esto ocurra la bacteria secreta estas proteasas a través del sistema de secreción tipo IX (T9SS) (Gorasia et al., 2022; Gorasia et al., 2015) descrito en el superphylum Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes (FCB), estudiando principalmente en *P. gingivalis*. Veillard et al., (2015), reportan que para que la RgpB sea producida de manera recombinante debe ser producida en *P. gingivalis*, lo que lo hace un proceso largo y costoso, debido a la dificultad para purificar las proteasas de manera nativa se sugiere esta como la mejor alternativa. Únicamente se describe la purificación de manera nativa de RgpB y la producción recombinante de esta misma.

Por lo anterior, en este capítulo se propone purificar de manera nativa la proteasa RgpA, con el fin de evaluar mecanismos patogénicos asociados con esta proteasa, además del desarrollo de métodos diagnósticos.

## 3.1 Materiales y métodos

### 3.1.1 Obtención de anticuerpos policlonales anti-HA1

Múltiples secuencias de RgpA reportadas (Imamura et al., 2003; Curtis et al., 1999), fueron analizadas para homología usando las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y las herramientas BLAST del NCBI.

Según reportes de la literatura (Potempa et al., 2003; Fitzpatrick et al., 2009; Li et al., 2011) la región 719 a 865 del dominio hemaglutinina adhesina de la RgpA presenta una homología del 45% con el mismo dominio de Kgp, por lo cual esta región puede ser usada para producir anticuerpos específicos anti-RgpA. Se realizó la predicción de los epítomos de las células B y T para esta región de RgpA, introduciendo la información existente sobre los alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) más frecuentemente reportados en pacientes susceptibles a *P. gingivalis* y descritos en enfermedad periodontal (Repeke et al., 2012; Sippert et al., 2015). La selección de epítomos de células B se realizó con las herramientas Bcepred, BepiPred 1.0, ABCpred y para la selección de epítomos de células T se usaron las herramientas ProPred y MHCpred versión 2.0.

Se seleccionaron dos péptidos que tuvieron el score más alto para epítomos de células B y T: HA1(a): YHFLMKKMGs y HA1 (b): PFEYTVPENADPSCSP. A los dos péptidos escogidos se les realizó un BLAST con la herramienta de la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/blast/>) se confirmó la especificidad para RgpA de *P. gingivalis*, este análisis arrojó una identidad del 100% con Arginine-specific cysteine proteinase Rgp Hemagglutinin/protease de *P. gingivalis*, una vez confirmado esto se solicitó la síntesis de los péptidos sintéticos a Genscript Biotech Corp (Piscataway, New Jersey, United States).

Adicionalmente, se produjeron anticuerpos policlonales monoespecíficos dirigidos contra péptidos de la región 719 a 865 del dominio hemaglutinina adhesina de RgpA, los péptidos fueron inoculados en 4 ratas macho Wistar de 250 gr de peso de acuerdo con las recomendaciones de Morales et al. (2017). La experimentación con animales fue aprobada por el comité de ética institucional de la Universidad El Bosque, mediante el acta 012-2016.

El esquema de inmunización comprendió de una dosis de sensibilización con Imject Alum Adjuvant® (ThermoScientific), ocho días después se inoculó una primera dosis (100 µg de los péptidos HA1a y HA1b en proporción 1:1 con adyuvante), y un refuerzo de 100 µg por 100 µL, 15 días después de la primera dosis. La eutanasia de los animales siguiendo los principios éticos, se realizó ocho días después de la última inoculación y los sueros fueron separados, alicuotados y almacenados en -20°C para confirmar su especificidad y posterior caracterización. Uno de los animales no fue inoculado con los péptidos para ser mantenido como control negativo.

Inicialmente se confirmó la presencia de anticuerpos anti-H1 en los sueros de los 4 animales, por ELISA indirecto *in-house* (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), este ensayo se estandarizó usando como antígeno dos concentraciones de la mezcla de los péptidos HA1a y HA1b. Se realizó un ELISA de control utilizando el lisado bacteriano como antígeno (10 µg/mL de mezcla de *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83). Los péptidos y lisados se diluyeron en buffer fosfato salino estéril (PBS; pH 7,6), se agregaron a 100 µL/pozo para la sensibilización de las placas y fueron incubadas durante 16 h a 4°C y luego se lavaron con PBS-Tween20 al 0,1% (PBS-T; pH 7,6) en un lavador de ELISA, Wellwash (Thermo Scientific).

Posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con PBS 1X Tween 0,1%, leche descremada 3%, BSA (Bovine serum albumin) (Amresco) 1,5% durante una hora a 37°C, seguido de 3 ciclos de lavado. El anticuerpo primario fue evaluado en diferentes diluciones (1:100, 1:200 y 1:400) y se incubó a 37°C durante una hora, pasado el tiempo de incubación se realizaron nuevamente 3 lavados.

El anticuerpo secundario anti-Rat-IgG acoplado a peroxidasa HRP (KPL) fue adicionado a 0,2µg/mL, se incubó durante una hora a 37°C, pasado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados como se describieron previamente y se reveló con 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) Microwell Peroxidase Substrate System (KPL) incubando durante 10 minutos y se detuvo la reacción con ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1M (Emsure® 1000, Merck-Sigma Aldrich). La lectura fue realizada en un lector de ELISA Infinite® 200 PRO Tecan a una longitud de onda de 450nm y 620nm como referencia los ensayos se realizaron por duplicado. Se realizó una prueba t- Student para comparar las unidades de absorbancia de los títulos de anticuerpos anti-H1 de cada uno de los animales inoculados.

La presencia de anticuerpos anti-H1 en los sueros de los animales se confirmó utilizando un ensayo de Western Blot. Se realizó SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) al 14% de sonificados de *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83 (75µg/pozo) y fue transferido a una membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride) Thermo Scientific de 0,45µm, con buffer de transferencia 1X (Tris base 25mM, glicina 192mM, metanol 10% v/v, pH8.3), durante 1 h a 30V usando el equipo PierceFast Semi-Dry Blotter (Thermo Scientific). Posteriormente se lavó con TBS-T (Tris-buffered saline Tween) [Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; 0,1% Tween 20] y se procedió a realizar el bloqueo de sitios inespecíficos con TBS-T con 5% de leche descremada durante 2 horas. La membrana se incubó con dos diluciones diferentes de suero de rata (1:100 y 1:200) durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se lavó tres veces con leche descremada al 5% en TBS-T.

La membrana se incubó con anticuerpo secundario anti-rata conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (0,2 µg/mL; KPL) en TBS-T durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó y se reveló usando un sistema de quimioluminiscencia (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Fisher Scientific). La reacción se visualizó usando

un analizador ChemiDoc (Bio-Rad) y las imágenes se digitalizaron usando el programa BioRad Imaging System.

### **3.1.2 Purificación de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis* y confirmación de actividad de proteasa**

Las vesículas de membrana externa (OMV) se obtuvieron a partir de sobrenadantes de cultivos de *P. gingivalis* ATCC 33277 en caldo BHI (Brain Heart Infusion) (BD BBL™) suplementado con 5% de hemina y 5% menadiona e incubados en condiciones anaeróbicas y en agitación a 90 rpm durante 48 horas. Se realizó la ultracentrifugación a 100,000×g durante 1 h (Optima™ MAX-TL ultracentrifuge, Beckman Coulter) a 4°C, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Castillo Y et al., 2022). La confirmación de la obtención de las OMV se realizó mediante SDS-PAGE al 14% con tinción con nitrato de plata, a ciclo de purificación se le confirmó la concentración de proteínas con ácido bicinconínico (BCA).

La sonicación de las OMV se realizó durante 5 minutos en un Vibra-cell VCX 130, Sonics a una amplitud de 40, 7 ciclos (30 segundos ON, 15 segundos OFF) sobre hielo, en el buffer de re-suspensión de las vesículas de membrana externa (Tris HCl 20mM pH8.0) con un cocktail inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma P8340). Los extractos fueron conservados a -80°C hasta su uso.

### **3.1.3 Cromatografía en fase líquida (FPLC) de intercambio iónico**

Inicialmente se realizó la cromatografía de intercambio aniónico, a partir de las OMVs previamente obtenidas y sonicadas, se tomaron 1000µL por cromatografía, se ajustaron las condiciones de corrido para obtener fracciones de 250 µL empleando una columna UNO Q1 Column #7200001 (BioRad) en el equipo BioLogic DuoFlow™ (BioRad).

Se utilizó un protocolo estandarizado con un flujo isocrático de 3 mL de buffer A (20 mM Tris HCl, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 mL/min, seguido de la inyección de la muestra a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Seguido de un flujo isocrático de otros 3 mL de buffer A, seguido de un gradiente de 100 % de buffer A al 100 % de buffer B (20 mM Tris HCl, pH 7.5 + 1 M NaCl) con un volumen de 20 mL a una velocidad de 1 mL/min.

Las fracciones recolectadas se concentraron usando filtros Pall Nanosep™ 3 kDa siguiendo las recomendaciones del fabricante. La actividad proteasa en las fracciones concentradas se detectó utilizando el sustrato fluorométrico Z-Gly-Gly-Arg 7-amido-4-metilcumarina clorhidrato (CAAM; Sigma) según reportes de Slots et al., 1987, con algunas modificaciones (Castillo Y et al., 2022).

Las fracciones positivas para CAAM de la cromatografía de intercambio aniónico se mezclaron y se realizó una segunda cromatografía de intercambio catiónico usando acetato de sodio 20 mM (buffer A) y NaCl 1 M (buffer B). Las condiciones de corrido se ajustaron para obtener fracciones de 200  $\mu$ L utilizando una columna ENrich™ S 5x50 (Ref 780-0021; BioRad).

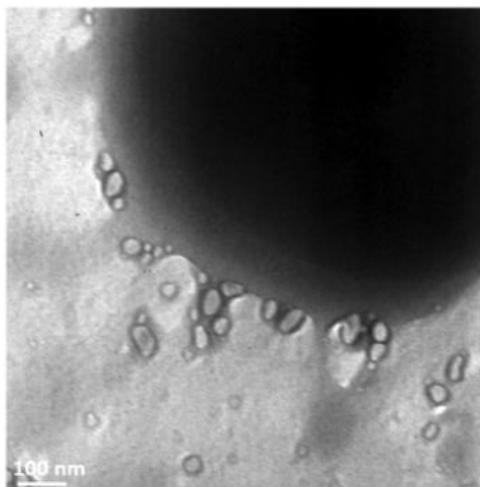
El protocolo de corrido se inició con un flujo isocrático de 3mL de Buffer A al 100%, seguido de la inyección de los concentrados positivos para CAAM 1mL/minuto, posteriormente se realizó otro flujo isocrático de 3mL del buffer A y se inició el gradiente iniciando con 100% de buffer A hasta 0% y de 0% a 100% de buffer B con un volumen de 20mL a una velocidad de 1mL/minuto. Se repitió la concentración de las fracciones con los filtros Pall Nanosep™ 3kDa y el seguimiento de la actividad de las gingipaínas R con CAAM.

## 3.2 Resultados

### 3.2.1 Caracterización de las OMV purificadas y los anticuerpos anti-H1

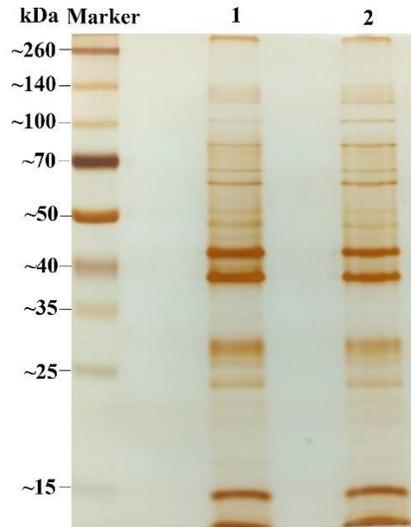
Las OMV purificadas se confirmaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), como se describió anteriormente (Castillo Y et al., 2022) (Figura 3-1), y sus perfiles de proteínas se evaluaron mediante SDS-PAGE al 14 % (Figura 3-2), que mostró un patrón de bandas consistente.

**Figura 3-1:** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de *P. gingivalis* en proceso de vesiculación, obtenidas durante el proceso de purificación de las OMV.



Tomado de Castillo Y et al., 2022.

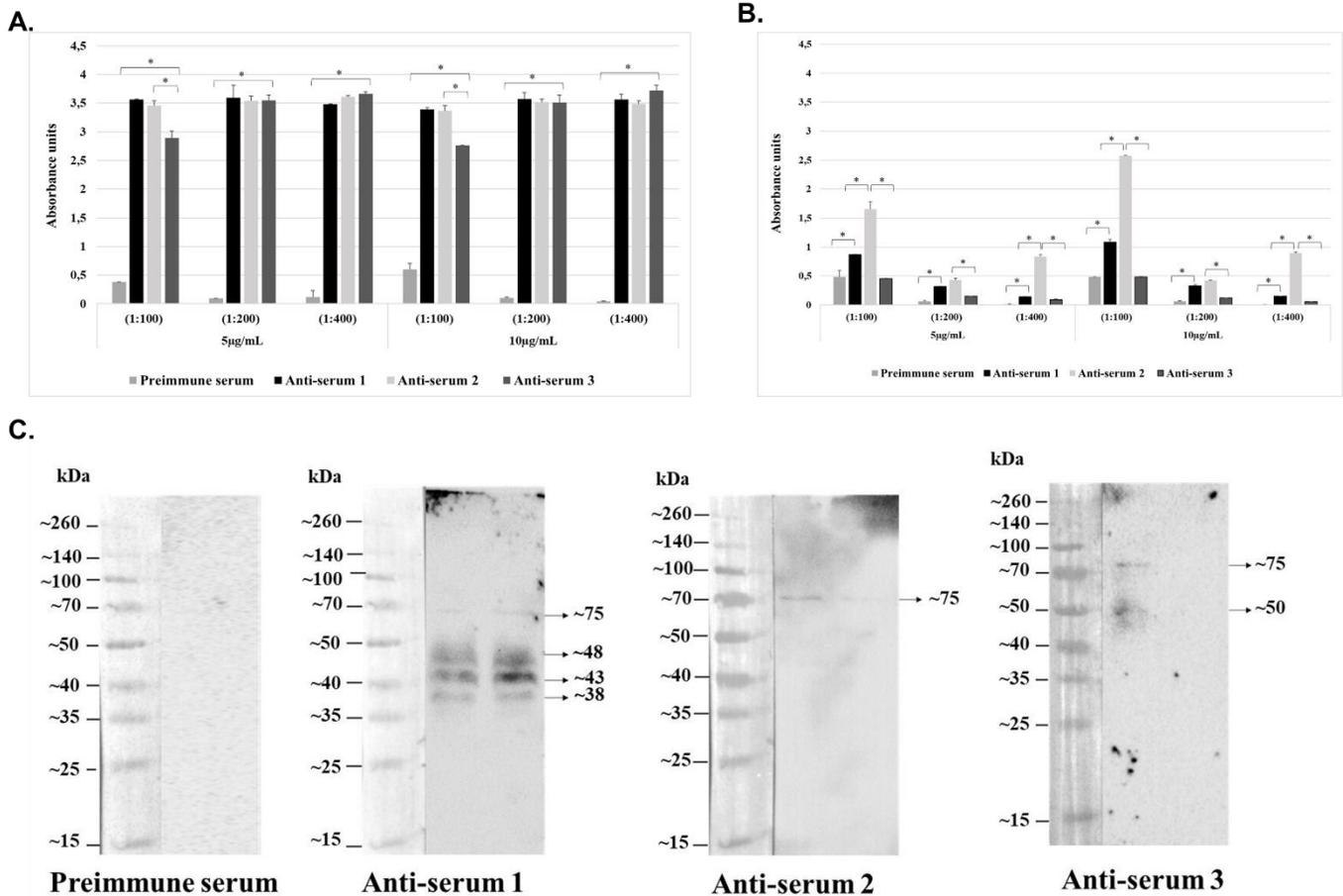
**Figura 3-2:** SDS-PAGE 14% de dos lotes diferentes de vesículas de membrana de *P. gingivalis* ATCC 33277. Marker: Marcador de peso molecular, línea 1 y 2: lotes diferentes de producción de vesículas de membrana externa. Tinción con nitrato de plata



La figura 3-3A muestra la detección de anticuerpos anti-H1 por ELISA en placas sensibilizadas con los péptidos sintéticos. La absorbancia de los sueros de los animales inmunizados fue significativamente mayor que la de los sueros preinmunes. Los sueros de la rata #3 mostraron una reactividad significativamente menor que los sueros de las ratas #1 y #2. La dilución del suero de la rata #3 (1:200 y 1:400) aumentó la absorbancia, lo que indica un efecto prozona. Una placa ELISA sensibilizada con los dos lisados de *P. gingivalis* produjo una absorbancia menor que la obtenida utilizando el ELISA mencionado anteriormente. Los títulos de anticuerpos más altos se observaron en el suero del animal #2, el cual fue seleccionado para el seguimiento de la proteína RgpA (Figura 3-3B).

La figura 3-3C muestra el Western blot de las proteínas de *P. gingivalis* utilizando los cuatro sueros de rata. Los sueros positivos detectaron una banda de 75 kDa, que es del tamaño esperado de la proteína RgpA. Se observaron bandas adicionales con los antisueros 1 y 3, que pueden ser RgpA que está parcialmente digerida o tiene modificaciones postraduccionales debido a que esta proteína sufre degradación autocatalítica. Basándose en estos resultados, se utilizó el antisuero 2 para realizar el seguimiento de la RgpA durante los procesos de purificación.

**Figura 3-3:** Producción y caracterización de anticuerpos anti H1 A: Titulación de anticuerpos  $\alpha$  H1 en sueros de ratas Wistar post inoculación, detectados por ELISA usando como antígeno los péptidos. B: Titulación de anticuerpos  $\alpha$  H1 en sueros de ratas Wistar post inoculación, detectados por ELISA usando antígeno *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83. C: Wertern Blot para *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83 con suero pre-inmune, antisuero 1, 2 y 3. \*  $p \leq 0,05$  t Test

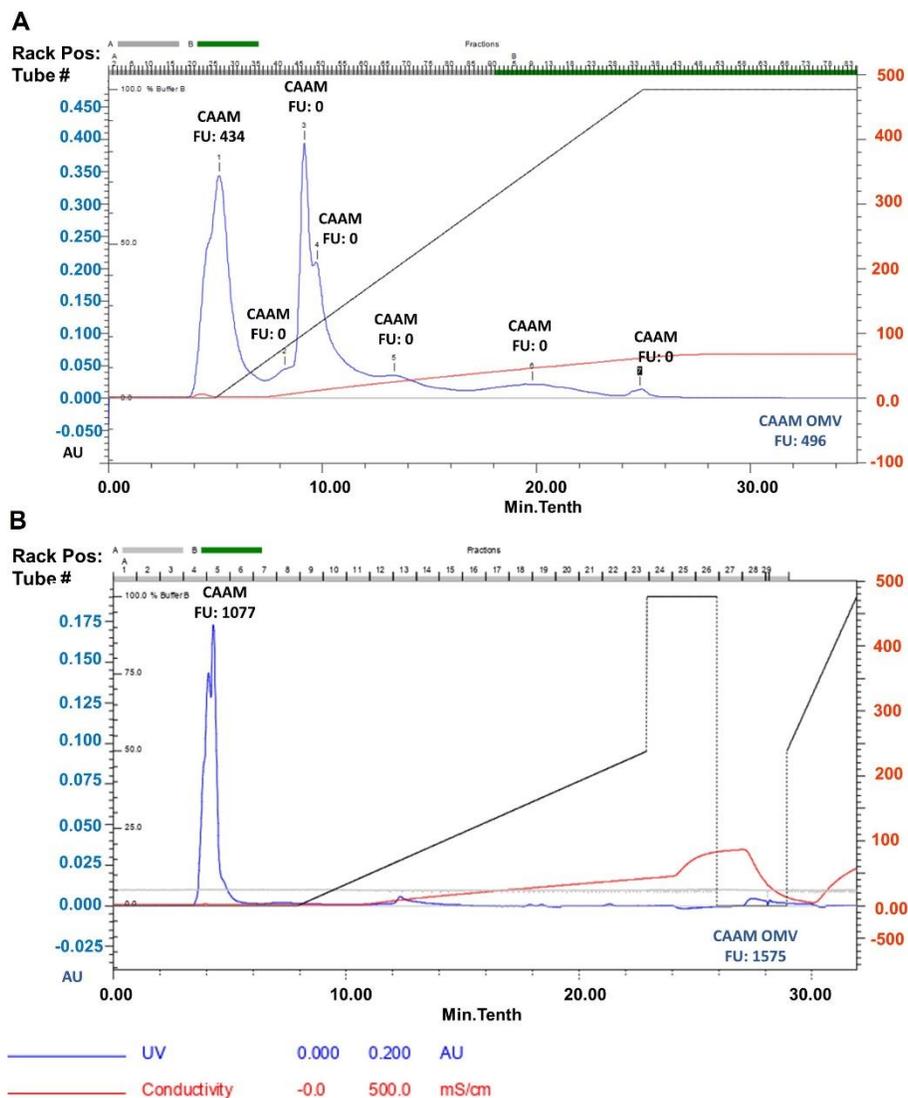


### 3.2.2 Purificación de RgpA por FPLC

La Figura 3-4A muestra el primer paso de cromatografía de intercambio aniónico, de las vesículas sonicadas. Se observaron ocho picos en el cromatograma, que se evaluó mediante CAAM para evaluar la actividad de la gingipaína. Las OMV sonicadas contenían 1575 unidades de fluorescencia (FU) y se usaron como control positivo para la actividad de la proteasa. Solo un pico mostró actividad amidolítica (334 FU), y las fracciones reunidas y concentradas en este pico produjeron 496 FU de actividad. A continuación, el concentrado de proteína se sometió a una segunda FPLC de intercambio catiónico. Se observó un solo pico con actividad de proteasa (1077 FU) correspondiente a RgpA. El rendimiento final de RgpA a partir de 1L con (Log<sub>10</sub>)  $7,4 \pm 0,08$ /mL unidades formadoras

de colonias (UFC) de cultivo bacteriano fue del 12,6% (2 mg/mL), con 3,2 FU/μg de actividad amidolítica (Tabla 3-1). El producto purificado se confirmó mediante SDS-PAGE en presencia de una única banda de 75 kDa con actividad amidolítica, correspondiente a la gingipaína RgpA, que se confirmó mediante transferencia de Western usando el anticuerpo αHA1 generado contra el dominio único de hemaglutinina RgpA, lo que demuestra que hemos desarrollado un protocolo de purificación exitoso que evita la actividad de la proteasa autolítica (Figura 3-5).

**Figura 3-4:** Purificación de RgpA a partir de un pool de varios lotes de producción de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis*. **A.** Cromatografía FPLC de intercambio de aniónico. **B.** Cromatografía FPLC de intercambio catiónico. En cada pico la fluorescencia se indican las unidades detectadas con el sustrato CAAM para la actividad de la gingipaína, en la parte inferior derecha de cada imagen se indican las unidades de fluorescencia de la OMV sonicada antes de la cromatografía.

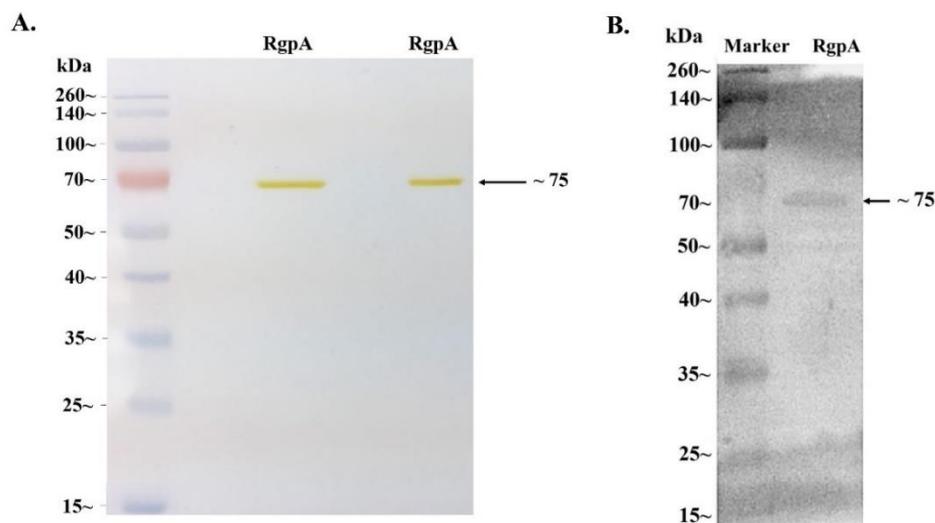


**Tabla 3-1:** Rendimiento de la purificación de RgpA a partir de OMV de *P. gingivalis*.

Paso	Volumen (L)	Proteína mg/mL	Actividad FU/ $\mu$ g*	Rendimiento (%)	Veces de purificación
Primary culture [CFU (Log <sub>10</sub> ) 7.4 $\pm$ 0.08/mL]	1	40	210.8	100	1
Purificación de OMV	8.3 mL	16.6	50	23.7	3
Cromatografía de intercambio aniónico	4.1 mL	2.6	44.4	21.1	200
Cromatografía de intercambio catiónico	1.6 mL	2	26.6	12.6	400

\*Actividad amidolítica usando CAAM

**Figura 3-5:** Confirmación de la pureza de la proteína RgpA. A. SDS-PAGE al 14 %, tinción con nitrato de plata. B. Western blot para la detección de la proteína RgpA utilizando anticuerpos anti-AH1 como anticuerpo primario.



### 3.3 Discusión

En este tercer capítulo se describe como se logró purificar con éxito la gingipaína RgpA a partir de vesículas de membrana externa de *P. gingivalis* (ATCC 33277), se logró un rendimiento final del 12,64%, superior a lo reportado por otros investigadores (Veillard et al., 2015; Kadowaki et al., 1994; Chen et al., 1992), a pesar de la alta capacidad proteolítica de esta proteasa en este trabajo se purificó la RgpA activa con un tamaño de 75kDa.

Diferentes autores han purificado proteasas de *P. gingivalis*, con resultados disímiles, Chen et al. (1992) reportan la purificación de una gingipaína de 50kDa, Kadowaki et al. (1994) y Pathirana et al., (2006) purifican gingipaína R de 45kDa, Nakayama et al., (1995) Arg-gingipaina de 44kDa. Otros autores han purificado estas gingipaínas de manera recombinante en *Escherichia coli* reportando un tamaño de aproximado de 58kDa

(Margetts et al., 2000). Más recientemente Veillard et al., (2015) purifican gingipaína RgpB altamente glicosiladas con un tamaño de 70-90kDa y otra más pequeña o que han perdido parte del extremo carboxiterminal por la actividad proteasa de las gingipaínas, debido a que estas tienen capacidad auto-catalítica para su maduración (Potempa et al., 2003). En este estudio se logró la purificación de la RgpA nativa con un peso de 75kDa, por la estrategia metodológica que se ha desarrollado se sugiere que esta proteína nativa incluye el dominio hemaglutinina-adhesina y por ser una proteína nativa es considerada madura.

La variabilidad en la purificación de estas proteínas por parte de los diferentes autores podría deberse a la metodología empleada, pero también a las diferentes isoformas que se han reportado de estas enzimas gingipaínas (Imamura et al., 2003; Potempa et al., 2003; Potempa et al., 1995b).

En diferentes estudios usando métodos de western blot se ha evidenciado gingipaínas Rgp de tamaños similares al reportado en este trabajo (Potempa et al., 1995b; Zhou et al., 2013).

Por otro lado, Hirai et al, (2020) en su estudio proponen que la detección de anticuerpos anti-*P. gingivalis* puede ser inespecífica debido a la gran cantidad de antígenos presentes, por lo que identificaron antígenos específicos de *P. gingivalis* reconocidos por anticuerpos presentes en pacientes con periodontitis, de los 29 antígenos detectados la gingipaína RgpA fue la que presentó niveles de IgG más altos, por lo que proponen a este antígeno como potencial para el desarrollo de un sistema preciso y rápido para el diagnóstico de periodontitis y como un biomarcador en enfermedades sistémicas.

Otros autores han detectado anticuerpos anti-Rgp asociados con enfermedades sistémicas como infarto al miocardio, lupus eritematoso sistémico (LES) (de Vries et al., 2022) y AR (Johansson et al., 2016; de Vries et al., 2022; Kharlamova et al., 2016).

También se ha identificado una fuerte implicación de las Rgp con diferentes enfermedades sistémicas como alteraciones en la estructura y mecánica de los coágulos y por consiguiente la salud cardiovascular (Nunes et al., 2020), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, alteraciones en el embarazo, artritis reumatoidea (Dominy et al., 2019; Adams et al., 2019; Johansson et al., 2016; Schenkein et al., 2013; Chen et al., 2009).

Debido a la importancia de la gingipaína RgpA, el proceso de purificación descrito en este trabajo permitirá evaluar la asociación con enfermedades sistémicas y la presencia de anticuerpos anti-RgpA, que podrían ser útiles como un biomarcador en enfermedades sistémicas. Adicionalmente, con esta proteína se podrá conocer más afondo la patogenia de enfermedades como el Alzheimer, por las asociaciones importantes que se han encontrado con esta proteasa.

### **3.4 Conclusión**

La estrategia de purificación de RgpA planteada en este trabajo fue exitosa, se logró obtener una proteína activa, aunque el rendimiento de purificación no fue muy alto, si es superior a lo reportado previamente.

## 4. Interacción de los títulos de anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD: su potencial como biomarcador en el diagnóstico de la artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno inflamatorio crónico y progresivo que se presenta como poliartritis asimétrica de pequeñas y grandes articulaciones debido a inflamación sistémica (Cush et al., 2021). Una característica específica de la AR es la presencia de títulos altos de autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas en fluidos sinoviales (Darrach et al., 2018). La citrulinación, que desempeña un papel esencial en la promoción de la autoinmunidad en la AR, es una modificación postraducciona de las proteínas, incluidas modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos arginina cargados positivamente, que conducen a la conversión de peptidil-arginina en peptidil-citrulina perdiendo la carga positiva, favoreciendo el plegamiento modificado de diferentes proteínas en la AR (Ciesielski et al., 2022). La citrulinación de proteínas es catalizada por la familia de enzimas peptidil arginina deiminasa (PAD), vinculada con la aparición de inflamación mediada por autoinmunidad por su capacidad para provocar respuestas inflamatorias como la diferenciación de células inmunológicas y la respuesta inmunitaria (Yuzhalin et al., 2019; Witalison et al., 2015). PAD2 y PAD4 son los isotipos de PAD candidatos más probables para la citrulinación de proteínas sinoviales en la AR. Adicionalmente, la vimentina citrulinada es un autoantígeno candidato en la AR (Vossenaar et al., 2004). Los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) estimulan la producción de citocinas proinflamatorias, la osteoclastogénesis y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (Derksen et al., 2017).

*P. gingivalis* es un patógeno clave asociado con la progresión de la periodontitis crónica por la secreción de factores de virulencia, incluidas las gingipaínas, que están codificadas por tres genes (*rgpA*, *rgpB* y *kgp*). Estos se conocen como gingipaínas-R (RgpA y RgpB) y gingipaína-K (Kgp) según su especificidad de hidrólisis en los enlaces Arg-Xaa o Lys-Xaa, respectivamente (Potempa et al., 2003). Además de estas proteasas, la peptidil arginina deiminasa de *P. gingivalis* conocida como PPAD se ha detectado en las bolsas periodontales (Smalley et al., 2017). La PPAD requiere un pH más alto para su actividad en los residuos de arginina libres y carboxilo terminal escindidos por las gingipaínas para generar autoantígenos derivados del fibrinógeno y la  $\alpha$ -enolasa, que se difunden a tejidos distantes a través de vesículas de membrana externa (OMV) o como una enzima soluble (Laugisch et al., 2016; Olsen et al., 2018; Wegner et al., 2010).

La periodontitis ha sido reconocida como un factor independiente asociado con la AR, particularmente en individuos con más de 5 años de evolución de la enfermedad (Qiao et al., 2020), en múltiples estudios se ha reportado la asociación significativa de los anticuerpos contra *P. gingivalis* con la AR (Bender et al., 2017). Sin embargo, también se ha encontrado que los títulos altos de anticuerpos anti-*P. gingivalis* están significativamente asociados con los familiares de primer grado de consanguineidad de pacientes con AR (Unriza-Puin et al., 2017; Johansson et al., 2016) y la AR temprana (Bello-Gualtero et al., 2016) en individuos con periodontitis.

Actualmente, todavía existe controversia sobre la importancia de PPAD en el proceso de citrulinación en la AR. Aunque se ha planteado la hipótesis de que PPAD podría contribuir a romper la tolerancia inmunológica y puede generar anticuerpos (Johansson et al., 2016; Quirke et al., 2014; Montgomery et al., 2016), otros autores no encontraron que la autocitrulinación de PPAD sea el mecanismo que vincula la periodontitis y la AR (Muñoz-Atienza et al., 2020; König et al., 2015; Fisher et al., 2015). Los títulos de anticuerpos anti-RgpB en AR establecida ha sido controvertida (Johansson et al., 2016; Quirke et al., 2014).

Sin embargo, la gingipaína RgpA no ha sido evaluada y ha mostrado virulencia aumentada y más significativa porque se puede encontrar en diferentes isoformas, por ejemplo, pueden encontrarse como un dominio hemaglutinina adhesina soluble junto con el dominio catalítico (HRgpA) o incompleto (RgpA<sub>cat</sub>), este dominio catalítico es altamente homólogo a RgpB<sub>cat</sub> (Potempa et al., 2003). Adicionalmente, también se han detectado dos formas no solubles asociadas a la membrana de la bacteria, presentes en OMV mt-RgpA<sub>cat</sub> y mt-HRgpA (Wilensky et al., 2013). Como se ha descrito previamente la actividad de PPAD está directamente relacionada con la actividad de la gingipaínas Rgp (Quirke et al., 2014; Goulas et al., 2015), es fundamental evaluar su asociación y el impacto de la interacción PPAD/RgpA con la AR. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la asociación de anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD y la doble positividad de los anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD en individuos con AR y analizar la sensibilidad y especificidad para detectar individuos con AR.

## **4.1 Materiales y Métodos**

### **4.1.1 Tipo de estudio**

Este es un estudio observacional de corte transversal fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad El Bosque (012-2016) y el Hospital Militar (HMC-2016-018) y siguió los principios de la Declaración de Helsinki sobre Experimentación Humana.

## **4.1.2 Población y muestra**

Se evaluaron 255 individuos: 143 diagnosticados con AR, según los criterios de clasificación del American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2010 (Aletaha et al., 2010), y 112 individuos sin AR ni otra enfermedad sistémica. El tamaño de la muestra se estableció para detectar una diferencia entre los títulos más altos de anti-RgpA (cuartil 1; mayor que al percentil 75) en pacientes con AR (32%) y el grupo control (12%) con un odds ratio (OR)  $\geq 3,45$ , según un estudio piloto que evaluó el 50% de la muestra final para una muestra mínima de 102 individuos por grupo.

Los individuos con AR fueron seleccionados del Hospital Militar Central y la Fundación Instituto Fernando Chalem, y el grupo control se seleccionó en el Hospital Militar Central. Todos los pacientes incluidos en este estudio firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética institucional de la Universidad El Bosque y del Hospital Militar Central. En todos los individuos incluidos en este estudio, un reumatólogo aplicó un cuestionario que incluía información como: edad, sexo, talla, peso, índice de masa corporal (IMC), hábito de fumar, diagnóstico de AR o individuo sano, tipo de tratamiento para los pacientes con AR, comorbilidades, inflamación y dolor articular, DAS 28 para los pacientes con AR, entre otros.

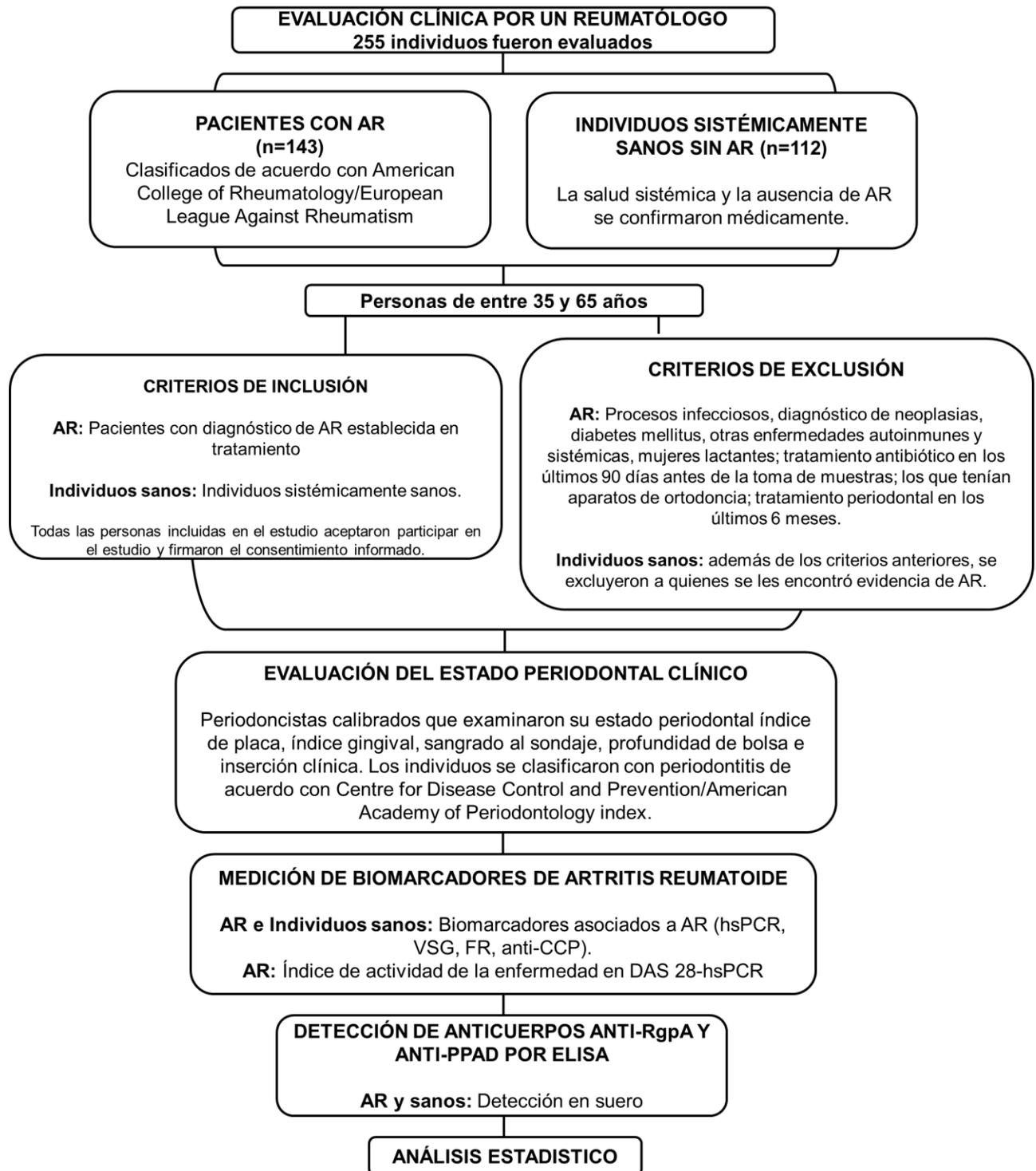
### **4.1.2.1 Criterios de inclusión para individuos con AR y controles sanos sistémicamente**

En la figura 4-1 se describe la selección de la población incluida en este estudio. Para el grupo de AR se seleccionaron individuos de entre 35 y 65 años con diagnóstico de AR establecida con más de dos años de diagnóstico de la enfermedad y para el grupo control aquellos sin signos clínicos de AR.

### **4.1.2.2 Criterios de exclusión**

Fueron excluidos aquellos pacientes con procesos infecciosos en curso o con diagnóstico de neoplasias, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes y sistémicas, mujeres lactantes; los que habían recibido tratamiento antibiótico en los últimos 90 días antes de la toma de muestra; los que tenían aparatología ortodóntica; y aquellos que se habían sometido a terapia periodontal en los últimos 6 meses.

Figura 4-1: Diagrama de flujo de la selección de la población de estudio



### 4.1.3 Evaluación clínica periodontal

Todos los individuos fueron evaluados por dos periodoncistas calibrados que examinaron su estado periodontal, el cual se evaluó en boca completa utilizando una sonda periodontal (Hu-Friedy Mfg Inc-Qulix™) para determinar los siguientes índices: índice de placa (IP), índice gingival (IG), sangrado al sondaje (BOP), profundidad de la bolsa (PB) y pérdida de inserción clínica (CAL) en milímetros. La calibración de los índices periodontales incluyó BOP (con un coeficiente de correlación entre examinadores [IE-ICC] de 0,88 a 0,90), IP ([IE-ICC] de 0,94 a 0,98), IG ([IE-ICC] de 0,88 a 0,90), profundidad de sondaje ([IE-ICC] 0,96–0,98) y CAL ([IE-ICC] 0,90–0,96). Los individuos se clasificaron con periodontitis si tenían al menos dos o más dientes con CAL proximal de al menos 2 mm con una profundidad de bolsa de al menos 4 mm y clasificados como leve, moderada o severa según el Centre for Disease Control and Prevention/American Academy of Periodontology index (Page et al., 2007; Eke et al., 2012).

Los individuos sin periodontitis se clasificaron como sanos o con gingivitis. Además, recolectamos muestras de placa subgingival de los sitios más profundos del surco gingival en pacientes con periodontitis y un sitio por sextante en pacientes clasificados como sanos periodontalmente. La placa supragingival se eliminó con una cureta estéril y el sitio de la muestra se aisló con rollos de algodón. Se tomaron muestras de seis sitios seleccionados, uno en cada cuadrante. Sin embargo, en pacientes sin periodontitis, las muestras se tomaron de los sitios mesiovestibulares de los primeros molares y, cuando estaban ausentes, de los segundos molares adyacentes. Las muestras se obtuvieron de dos puntas de papel estériles insertadas consecutivamente por sitio, que se dejaron en el fondo del surco/bolsa en su lugar durante 10 segundos con puntas de papel calibre 40 (NewStetic®) para detectar *P. gingivalis* usando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

### 4.1.4 Identificación y cuantificación de *P. gingivalis* en placa subgingival

La qPCR se realizó siguiendo las recomendaciones de Boutaga et al., 2003. Se utilizaron cebadores y sondas para el gen que codifica el 16SrRNA, tal y como se ha estandarizado previamente en nuestro laboratorio (Bello-Gualtero et al., 2016; Boutaga et al., 2003).

### 4.1.5 Medición de biomarcadores de artritis reumatoide

Se realizó prueba de proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRhs) por quimioluminiscencia (Immulate 1000-Siemmens®) y se consideró positivo un valor de 3 mg/L. La velocidad de sedimentación globular (VSG) se midió por el método fotométrico

(Ali-Fax-Test 1 THL Ali-FAX®Polverara (PD)-Italia), valores superiores a 20 mm se consideraron elevados. Se utilizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich para medir los anticuerpos anti-CCP-IgG/IgA (Quanta lite®CCP3.1 IgG/IgA, INNOVA-Diagnosis) en suero. Los resultados se expresaron en unidades ELISA/mL, donde los resultados superiores a 20UI se consideraron positivos. El factor reumatoideo (FR) se cuantificó mediante nefelometría (Beckman Coulter, Immage800®) y se consideraron positivos valores superiores a 20U. Con la PCR ultrasensible y los datos de la evaluación clínica reumatológica se extrajo el puntaje DAS-28 para determinar la actividad de la enfermedad solo para el grupo con diagnóstico de AR debido a que la actividad de la enfermedad no se mide en individuos sanos (Fransen et al., 2003).

#### 4.1.6 Detección de anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD por ELISA

Se estandarizó un ELISA indirecto en una placa de polietileno de fondo plano de 96 pozos (Greiner Bio-One), la cual fue sensibilizada con 20µg/mL de RgpA purificada como se describe en el capítulo 3, para la determinación de anticuerpos contra esta proteína en los sueros de los pacientes.

Se sensibilizó otra placa de 96 pozos con 20µg/mL de una mezcla de los fragmentos de PPAD-CT y PPAD-NT producidas y purificadas como se describe en el capítulo 2 para determinar los anticuerpos anti-PPAD en los sueros de los pacientes.

Ambas proteínas (RgpA y PPAD) se diluyeron en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4°C, seguido de tres lavados (Thermo-Scientific™Wellwash™) con solución buffer fosfato salino (PBS)-Tween (0,1 %, pH 7,5). Los sitios inespecíficos se bloquearon (StabilGuard®, SurModics) durante 1 h a 18-20°C y posteriormente se lavó como se indicó antes. El suero de cada paciente e individuos del grupo control fue añadido en diluciones 1:100, 1:200 y 1:400 preparadas en PBS-Tween (0,1%, pH 7,4)-leche desnatada al 3% y se incubaron durante 2h a 37°C. Después del lavado, se añadió el anticuerpo anti-IgG humano biotinilado (anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humano HRP-Dako) en dilución 1:10.000 y se incubó durante 30 min a 37°C. La reacción antígeno-anticuerpo se desarrolló utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sustrato de tetrametilbencidina peroxidasa (TMB) (SERA CARE-KPL50-76-03), por 10 min, pasado el tiempo la reacción se detuvo con ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Emsure®1000. Merck-Sigma- Aldrich) 1M. La densidad óptica (DO) se determinó a 450 nm en un lector de ELISA (Infinite® 200PRO-Tecan), como control positivo de los ensayos de ELISA se utilizó una muestra de suero de un paciente con periodontitis al que se le pudo detectar la presencia de *P. gingivalis* en sangre periférica por hemocultivo luego de un tratamiento periodontal, adicionalmente este paciente tenía *P. gingivalis* en placa subgingival y anticuerpos anti-*P. gingivalis* en suero (DO > 0.1). Se obtuvo un suero control negativo de un voluntario sin periodontitis, sin AR, negativo para *P. gingivalis* en placa subgingival y que no presentaba anticuerpos anti-*P. gingivalis* en esta muestra (DO <0,005). Las lecturas de DO de

anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD se agruparon en cuartiles en función de la mediana, definiendo los grupos según los títulos en la dilución más alta evaluada 1:400: Q1 (valores superiores al percentil 75), Q2 (valores superiores al percentil 50) y Q3-Q4 (valores por debajo del percentil 50). Las interacciones estadísticas entre los títulos anti-RgpA y anti-PPAD (Q1/Q1, Q1/Q2) se calcularon utilizando el software STATA v11.

#### 4.1.7 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la distribución de datos continuos, expresada como mediana y rangos intercuartílicos. Se utilizaron frecuencias absolutas y relativas para estimar las variables categóricas. Los datos clínicos y sociodemográficos se calcularon en función del diagnóstico de AR y se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney, la prueba de Chi-cuadrado o la prueba de Fisher. Todas las variables que mostraron asociaciones significativas con la AR ( $p < 0,10$ ) en el análisis bivariado se incluyeron en un análisis multivariado de regresión logística para establecer el OR (odds ratio) e intervalos de confianza (IC) del 95%. El desenlace primario fue el diagnóstico de AR, y las variables independientes fueron las interacciones combinadas anti-RgpA, anti-PPAD y anti-RgpA-anti-PPAD y los marcadores de AR (RF, anti-CCP, VSG y PCR ultrasensible). Se utilizaron tres modelos para establecer la asociación entre anti-RgpA, interacción anti- y marcadores sistémicos de AR. El Modelo 1, el Modelo 2 y el Modelo 3 incluyeron interacciones anti-RgpA (Q1 y Q2), anti-PPAD (Q1 y Q2) y anti-RgpA, anti-PPAD y anti-RgpA-anti-PPAD (Q1/Q1, Q1/Q2), respectivamente. Todos los modelos fueron ajustados por edad, sexo, IMC, hábito de fumar y severidad de la periodontitis. Los modelos ajustados y no ajustados se verificaron mediante la prueba de bondad de ajuste y se compararon mediante la prueba de Chi cuadrado de razón de verosimilitud (G2) y el criterio de información bayesiano (Moses et al., 2010). Todo el análisis de datos se realizó con STATA-v11.

Para establecer la capacidad operativa de la prueba diagnósticas anti-RgpA, anti-PPAD y anti-RgpA-PPAD, se obtuvo para cada cuartil sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (PNV) y el área bajo la curva de la curva ROC y sus combinaciones. Además, se realizó un análisis bivariado para establecer asociaciones entre las interacciones anti-RgpA, anti-PPAD y anti-RgpA-anti-PPAD y los marcadores sistémicos de AR (VSG, FR, anti-CCP, PCRhs). Se compararon anti-RgpA y anti-PPAD entre AR y controles con índices periodontales, incluidos IP, IG, BOP, PB y CAL.

## 4.2 Resultados

Aunque los datos de edad y sexo fueron significativamente diferentes entre el grupo con AR y el grupo control, no se encontraron diferencias en el IMC ni en el hábito de fumar (tabla 4-1). Los valores de los marcadores de AR, como anti-CCP, VSG, PCR ultrasensible y FR, fueron más altos en el grupo de pacientes ( $p < 0,05$ ), como era de esperarse. La mayoría de los pacientes tenían AR de más de 5 años de evolución y estaban en tratamiento con DMARDs (Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad)

convencionales y solo un pequeño porcentaje de pacientes (4,19%) se consideraban con alta actividad de la enfermedad (tabla 4-1). Las variables periodontales y microbiológicas, incluidos los anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD, se muestran en la tabla 4-2. La frecuencia de periodontitis fue similar entre los grupos; sin embargo, la severidad fue mayor para las formas moderadas en el grupo de AR ( $p < 0,001$ ).

Aunque la presencia y la cantidad de *P. gingivalis* no difirieron entre los pacientes con AR y el grupo control, los títulos de los anticuerpos anti-RgpA fueron significativamente mayores en los pacientes con AR agrupados en Q2 y Q1 (mayor que los percentiles 50 y 75, respectivamente) (Tabla 4-2). Hubo una asociación altamente significativa entre los anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD (utilizando los datos cuantitativos de dilución 1:400) y el diagnóstico de AR ( $p < 0,001$ ) (Figura 4-1). Sin embargo, los títulos de anti-PPAD ajustados a cuartiles no diferenciaron entre los grupos AR y control (tabla 4-2). Se evaluó en los pacientes y controles la presencia simultánea de anticuerpos anti-RgpAQ1/anti-PPADQ2 (títulos por encima del percentil 75 para anti-RgpA y títulos de anticuerpos anti-PPAD por encima del percentil 50) igualmente se analizó la doble positividad de anti-RgpAQ1/anti-PPADQ1 entre los grupos encontrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (tabla 4-2). Por el contrario, los índices clínicos como el número de dientes, índice de placa, profundidad de la bolsa, nivel de inserción clínica y extensión de la enfermedad (porcentaje de CAL  $\geq 5$  mm) fueron significativamente mayores en el grupo de AR ( $p < 0,001$ ). El IG y BOP no difirieron entre los grupos (Tabla 4-2). Se observó una asociación significativa en el análisis bivariado entre anti-RgpA-Q1, sangrado al sondaje, nivel de inserción clínica y marcadores sistémicos de AR como anti-CCP ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4-3A y 4-3B). Curiosamente, también se observó una asociación entre la combinación de anti-RgpAQ2/anti-PPADQ1 con anti-CCP ( $p < 0,05$ ) (tabla 4-3). Sin embargo, solo RgpAQ1 o RgpA Q2 pero no anti-PPAD o su interacción mostraron una asociación con índices inflamatorios de periodontitis en individuos con AR (tabla suplementaria S1 Anexo C). Los títulos más altos de anticuerpos anti-PPAD se asociaron con la periodontitis y la severidad de la periodontitis en individuos con AR, pero no con la actividad de la AR (tabla suplementaria S2 Anexo C).

**Tabla 4-1:** Descripción de variables sociodemográficas, clínicas y marcadores asociados a la AR

<b>Variable</b>		<b>AR n=143</b>	<b>Control n=112</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Edad</b>				
Mediana (RIQ)		57 (51-61)	46 (39-53)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Genero</b>				
Femenino	F (%)	125 (87,4)	87 (77,7)	<b>0,039</b>
Masculino		18 (12,6)	25 (22,3)	
<b>IMC</b>				
Normal	F (%)	73 (51,0)	66 (58,9)	0,230
Sobrepeso		53 (37,5)	39 (34,8)	
Obesidad		17 (11,9)	7 (6,3)	
<b>Hábito de fumar</b>				
Si	F (%)	5 (3,5)	7 (6,3)	0,330
No		138 (96,5)	105 (93,7)	
<b>Anti-CCP</b>				
<20U	F (%)	25 (17,5)	106 (95,5)	<b>&lt;0,0001</b>
20-40U		5 (3,5)	5 (4,5)	
>40U		113(79)	0 (0)	
<b>VSG</b>				
<20IU/ml	F (%)	80 (55,9)	82 (73,2)	<b>0,004</b>
≥20IU/ml		63 (44,1)	30 (26,8)	
<b>PCRhs</b>				
Normal	F (%)	23 (31,1)	44 (59,5)	<b>&lt;0,0001</b>
>3 mg/L		17 (23)	20 (27,0)	
>10mg/L		34 (46)	10 (13,5)	
<b>FR</b>				
<20IU/mL	F (%)	19 (25,7)	68 (91,9)	<b>&lt;0,0001</b>
20-59IU/ml		19 (25,7)	6 (8,1)	
>59IU/mL		36 (48,6)	0 (0)	
<b>DAS28-PCRhs</b>				
Mediana RIQ		2,65 (2,2-3,4)	NA	
<b>Actividad de AR F (%)</b>				
Sin actividad		71 (46,65)	NA	
Actividad baja		25 (17,48)		
Actividad moderada		41 (28,67)		
Actividad alta		6 (4,19)		
<b>Medicación F (%)</b>				
Ninguna		2 (1,4)	112 (100)	<b>&lt;0,0001</b>
Convencional		110 (76,9)		
Biológicos		31 (21,6)		
<b>Tiempo de diagnóstico de AR F %</b>				
2-5 años		10 (7)	NA	
5-10 años		64 (45)		
>10 años		69 (48)		

IMC= Índice de masa corporal; Anti-CCP= IgA anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados; VSG=Velocidad de sedimentación globular; PCRhs=Proteína C Reactiva de alta sensibilidad; FR= Factor reumatoideo, Diferencia significativa p<0,05, en negrillas resultados significativos, Score de actividad de la AR: DAS 28: sin actividad: menor 2,6; Actividad baja: 2,6 -3,2; Actividad moderada: 3,3-5,1; Actividad alta: mayor a 5,1.

**Tabla 4-2:** Descripción de variables clínicas y microbiológicas periodontales asociadas a la AR

Variable	AR n=143	Control n=112	Valor de-p
<b>Periodontitis</b> F (%)			
Presencia	119(83,2)	84(75)	0,106
Ausencia	24(16,8)	28(25)	
<b>Severidad</b> F (%)			
Ninguna	24(16,8)	28(25)	<b>0,001</b>
Baja	1(0,7)	18(16,1)	
Moderada	105(73,4)	54(48,2)	
Severa	13(9,1)	12(10,7)	
<b>Numero de dientes</b>			
Mediana	20	25	<b>&lt; 0,0001</b>
(RIQ)	(13-25)	(21-28)	
<b>Plaque índice%</b>			
Median	68	52,5	0,023
(IQR)	(35-85)	(35-69)	
<b>Índice gingival %</b>			
Mediana	50	32	0,117
(RIQ)	(10-73)	(17,5-63)	
<b>Sangrado al sondaje %</b>			
Mediana	47	40	0,381
(RIQ)	(27-63)	(27-54)	
<b>Profundidad de la bolsa mm</b>			
Mediana	4	4	<b>&lt; 0,0001</b>
(RIQ)	(0-4,2)	(4-4,3)	
<b>Profundidad de la bolsa (%)</b>			
Mediana	25,3	24,54	0,342
(RIQ)	(23-40)	(10-39,7)	
<b>CAL mm</b>			
Mediana	2,74	2,38	<b>0,0002</b>
(RIQ)	(2,26-3,39)	(1,94-2,95)	
<b>CAL &gt;5 mm (%)</b>			
Mediana	87	51,6	<b>&lt; 0,0001</b>
(RIQ)	(60,7-97,7)	(34,6 -77,1)	
<b><i>P. gingivalis</i></b> F (%)			
Presencia	67 (46,9)	60(53,6)	0,287
Ausencia	76 (53,1)	52(46,4)	
<b><i>P. gingivalis</i> Log<sub>10</sub></b>			
Mediana	0	4,14	0,491
(RIQ)	(0-6,3)	(0-6,3)	
<b>Anti-RgpA Q1</b> F (%)			
Positivo +	88(61,5)	39(34,8)	<b>&lt; 0,0001</b>
Negativo -	55(38,4)	73(65,2)	
<b>Anti-RgpA Q2</b> F (%)			
Positivo +	45 (31,5)	15(13,4)	<b>&lt; 0,0001</b>
Negativo -	98 (68,5)	97(86,4)	
<b>Anti-PPAD Q1</b> F (%)			
Positivo +	84 (59)	53 (42)	0,059
Negativo -	59 (41)	59 (58)	
<b>Anti-PPAD Q2</b> F (%)			
Positivo +	54 (37,7)	35 (32,3)	0,236
Negativo -	89 (62,3)	77 (77,7)	
<b>Anti-RgpAQ1-PPADQ1</b>			
Positivo +	33 (23,1)	8 (7,2)	<b>0,026</b>
Negativo -	110 (76,9)	104 (92,8)	
<b>Anti-RgpAQ1-PPADQ2</b>			
Positivo +	18 (12,5)	6 (5)	<b>&lt; 0,0001</b>
Negativo -	125 (87,4)	106 (95)	

Anti-RgpA= Anticuerpos contra RgpA; PPAD= Anticuerpos contra la Peptidil arginina deiminasa de *P. gingivalis*; CAL=perdida de inserción clínica, %= expresado en porcentaje; mm=expresado en milímetros; significancia estadística  $p < 0,05$ , En negrilla los resultados significativos.

**Tabla 4-3:** Comparación entre los títulos de anti-RgpA, anti-PPAD y la doble positividad de anti-PPAD/anti-RgpA con marcadores de AR (A) y marcadores de periodontitis en toda la población (B).

**A. Marcadores de la AR**

Variable	Anti-RgpA Q2		Anti-RgpA Q1		Anti-PPAD Q2		Anti-PPAD Q1		Anti-PPADQ2/RgpA Q1	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<b>Anti-CCP F (%)</b>										
<20 U	51 (39)	80 (61)	23 (18)	108(82)	64(49)	67 (51)	39(30)	92(70)	14(35)	117 (55)
20-40 U	4 (40)	6 (60)	2 (20)	8 (80)	4 (40)	6 (60)	2 (20)	8(80)	1(2.5)	9(4)
>40 U	71 (63) †	42 (37)	35 (31)	78 (69)	68 (69)	45 (31)	47(42)	66(58)	25(62.5) **	88(41)
<b>FR F (%)</b>										
<20 IU/mL	46 (35)	84(65)	21(16)	109 (84)	63 (48)	67 (52)	39(30)	91 (70)	14(35)	116(54)
20-59 IU/ml	28 (68)	13 (32)	16 (39)	25 (61)	26 (53)	15 (37)	15(37)	26 (63)	10(25)	31(15)
>59 IU/mL	52 (63) **	31 (37)	23 (28)	60 (72)	48 (58)	36 (42)	34(41)	49 (59)	16(40)	67(31)

† p<0.001; \*\* p<0.05. RgpA=Arg-gingipaína A; PPAD= Peptidyl arginina deiminasa de *P. gingivalis*; anti-CCP= IgG /IgA Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados; FR= Factor reumatoideo.

**B. Marcadores periodontales**

Variable	Anti-RgpA Q2		Anti-RgpAQ1		Anti-PPADQ2		Anti-PPADQ1		Anti-PPADQ2/RgpAQ1	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<b>Índice gingival</b>										
Mediana	47	35	46	36	38	37	37	38	35	38
RIQ	(13-68)	(18-63)	(8-65)	(18-64)	(14-66)	(15-66)	(14-64)	(15-64)	(6-64)	(17-65)
<b>BOP</b>										
Mediana	47 **	40	52	40	43	41	44	41	41	47
RIQ	(27-64)	(23-55)	(23-67)	( 26-56)	(22-60)	(27-59)	(21-59)	(26-59)	(26-58)	(20-63)
<b>Profundidad de bolsa</b>										
Mediana	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
RIQ	(2-4.25)	(2-4.25)	(2-4.24)	(2-4.25)	(2-4.25)	(2-4.25)	(2-4.25)	(2-4.25)	(2-4.19)	(2-4.25)
<b>CAL</b>										
Mediana	2.75**	2.48	2.79**	2.52	2.7	2.6	2.6	2.7	2.6	2.8
RIQ	(2.3-3.3)	(2-2.9)	(2.1-3.6)	(2-3)	(2.1-3.2)	(2.1-3.2)	(2.1-3.2)	(2.2-3.2)	(2.1-3.1)	(2.3-3.4)

\*\* p<0.05. RgpA= Arg-gingipaína A; PPAD= Peptidyl arginina deiminasa de *P. gingivalis*; BOP= Sangrado al sondaje; CAL= Nivel de inserción clínica

La Tabla 4-4 muestra los diferentes modelos de regresión logística para los marcadores de AR, incluyendo PCR ultrasensible, VSG, FR, anti-CCP, anti-RgpA (Modelo 1), anti-RgpA, anti-PPAD y su interacción (Modelo 3), ajustados por edad, sexo, IMC, hábito de fumar y presencia de periodontitis. No se utilizó el modelo 2 porque los anticuerpos anti-PPAD no mostraron diferencias entre los grupos. Los OR calculados para estas variables fueron los siguientes: en el Modelo 1, FR [odds ratio (OR) 10; intervalo de confianza (IC) del 95 %: 4,10–23], anti-CCP (OR 13,7; IC del 95 %: 5,1–36,2). Los niveles más altos de anti-RgpA (Q1) se asociaron con AR (OR 4,09; IC del 95 %: 1,20–13,9). Los valores calculados en el Modelo 3, FR (OR 9,9; IC 4,4- 25,4), anti-CCP (OR 13,7; 95% IC 5,1- 36,2), y una combinación de interacciones anti-RgpA/anti-PPAD (OR 6,63; 95% IC 1,61 -27) se asociaron con AR. A continuación, los cálculos de OR se modificaron para el Modelo 1 a la interacción anti-RgpA/anti-PPAD, y se observó una interacción aditiva entre estas variables (tabla 4-6).

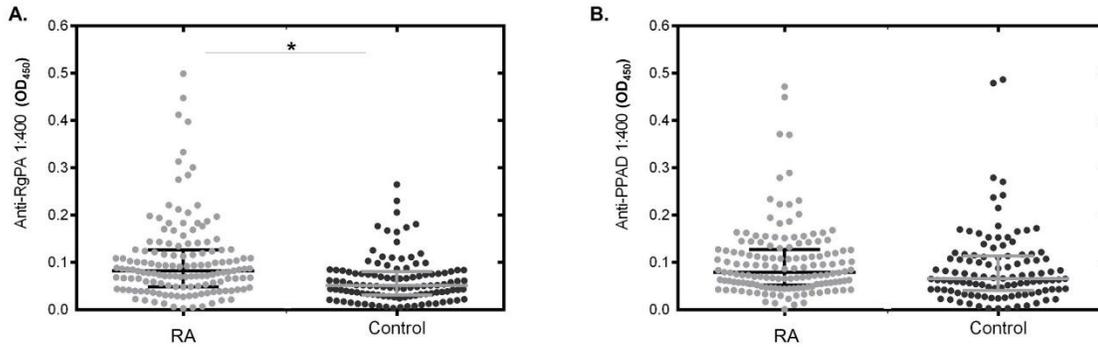
**Tabla 4-4:** Modelo de regresión logística de marcadores asociados con AR

	Referencia	OR No ajustado	(IC 95%)	OR Ajustado	(IC 95%)
<b>Modelo 1</b>					
<b>Variable dependiente</b>					
AR	Sin RA				
<b>Variable independiente</b>					
Anti-CCP<20U	Referencia	1,0		1,0	
Anti-CCP >20U		13,7	5,1- 36,2**	15,21	5,2-44,5**
FR <20UI/mL	Referencia	1,0		1,0	
FR >20UI/mL		10,6	4,10-23**	15,58	5,0-48,49**
Anti-RgpA<Q1	Referencia	1,0		1,0	
Anti-RgpA>Q1		4,09	1,20-13,9*	8,6	1,56-47,8**
<b>Modelo 3</b>					
<b>Variable dependiente</b>					
AR	Sin RA				
<b>Variable independiente</b>					
Anti-CCP <20U	Referencia	1,0		1,0	
Anti-CCP >20U		13,7	5,1- 36,2**	14,4	5,2-39,9**
FR <20UI/mL	Referencia	1,0		1,0	
FR >20UI/mL		9,9	4,4- 25,4**	14,6	4,7-45**
Anti-RgpA<Q1Anti-PPAD<Q2	Referencia	1,0		1,0	
Anti-RgpA>Q1-Anti-PPAD>Q2		6,63	1,61-27*	9,69	1,77-52*

Anti-CCP= IgA anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados; FR=Factor reumatoideo; Anti-RgpA= Anticuerpos contra RgpA; Anti-PPAD= Anticuerpos contra la Peptidil arginina deiminasa de *P. gingivalis*; Q1=>percentil 75; Q2=>percentil 50, Modelo ajustado a edad, genero, IMC, tabaquismo y presencia de periodontitis, \*\*p<0,001: \*p<0,05, **Modelo 1**, LR:  $p=0,25$ ; BIC: no ajustado=119,15; ajustado=127,49, diferencia=-8,34; AIC: no ajustado= 101,46; ajustado=102,7, diferencia=-1,24, el **modelo no ajustado** es él se debe reportar, **Modelo 3**, LR:  $p= 0,45$ ; BIC: no ajustado= 117,2; ajustado= 126,7 diferencia=-9,5; AIC: no ajustado= 99,5; ajustado= 101,9, diferencia=- 2,4, El **modelo no ajustado** debe reportarse, la edad fue una variable de confusión.

La capacidad operativa de las combinaciones anti-RgpA, anti-PPAD y anti-RgpA/anti-PPAD utilizadas como parte de una prueba de diagnóstico se muestran en la tabla 4-7. Anti-RgpA mostró una especificidad del 87,4% y un VPP del 76,7% para el diagnóstico de AR. Sin embargo, la doble positividad de los anticuerpos anti-RgpAQ1/anti-PPADQ1 mejoró la especificidad al 93,7% y el VPP al 82,5 % para identificar individuos con AR ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4-5).

**Figura 4-2:** Box-Plot de títulos de anticuerpos anti-RgpA en RA y grupo control. B. Box-Plot de títulos de anti-PPAD en RA y grupo control. \* Significación estadística  $p < 0,05$



**Tabla 4-5:** Capacidad operativa de las pruebas diagnósticas anti-RgpA, anti-PPAD y anti-PPAD/RgpA-PPAD.

Anticuerpos	n	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Área bajo la curva ROC
Anti-RgpA	255	32%	87.4%	76.7%	50%	0.60
Anti-PPAD	255	38%	69%	61.4%	46.4%	0.53
RgpAQ1-PPADQ2	255	23.1%	93.7%	82.5%	48.6%	0.58
RgpAQ1-PPADQ1	255	12.6%	95.2%	78.3%	45.9%	0.54



### 4.3 Discusión

Diferentes estudios clínicos y epidemiológicos han corroborado la asociación bidireccional entre AR y la periodontitis (Rovas et al., 2021; Eriksson et al., 2019; Loutan et al., 2019; Schmickler et al., 2017; Mikuls et al., 2014) y se ha confirmado que el tratamiento periodontal en pacientes con AR disminuye la actividad de la enfermedad (Posada-López et al., 2022; Sun et al., 2021). Esta asociación se atribuye a que *P. gingivalis* actúa como protagonista, principalmente por la presencia de su PPAD, que se vincula con la alteración de la tolerancia inmunológica en la AR (Shimada et al., 2016; Quirke et al., 2014; Marez et al., 2013). Aunque actualmente se sabe que otras especies de *Porphyromonas* (*Porphyromonas gulae* y *Porphyromonas loveana*) tienen enzimas PAD (Gabarrini et al., 2018), no se ha descrito alguna asociación entre la presencia de estas especies con la AR.

Este estudio evaluó a 143 pacientes con AR y 112 controles sin AR, se realizó comparación entre los grupos de biomarcadores de AR como: anti-CCP, VSG, PCRhs, FR, anticuerpos anti-RgpA, anticuerpos anti-PPAD y la doble positividad de los anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD como posibles marcadores sistémicos de AR. El hábito de fumar es considerado un factor de riesgo importante para la AR (Hedström et al., 2018; Rahajoe et al., 2020), en este estudio no mostró diferencias entre los grupos, probablemente debido a la baja frecuencia de fumadores en los grupos con AR con al menos 2 años de diagnóstico. Además, el IMC, que también se ha asociado con la AR (Rodríguez et al., 2021; Chaparro-Sanabria et al., 2019; Hedström et al., 2018; Qin et al., 2015), tampoco mostró diferencias entre los grupos.

Sin embargo, la edad fue mayor en los pacientes con AR, y se observaron más hombres en los grupos control que en el grupo con AR (12% vs. 26%), como es reconocido la AR es más prevalente en mujeres. Por tanto, se utilizaron modelos ajustados por edad y sexo para establecer asociaciones entre los marcadores de AR y anti-RgpA y la interacción de anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD.

Más del 70% de los participantes (incluyendo pacientes con AR el grupo control) presentaron periodontitis, sin diferencias significativas en los índices clínicos periodontales. Esto difiere con otros reportes en los que los pacientes con AR tienen una mayor frecuencia de periodontitis que los individuos del grupo control, especialmente cuando la duración de la AR es >5 años (Qiao et al., 2020). Curiosamente, los pacientes con AR presentaron periodontitis moderada en comparación con el grupo control, pero también es el grupo con un número menor de dientes. Además, PB, CAL y extensión evaluados por el porcentaje de CAL  $\geq 5$  mm fueron mayores en el grupo de AR, de acuerdo con reportes de diferentes autores (Eriksson et al., 2019; Schmalz et al., 2020; Rahajoe et al., 2020).

Los anticuerpos anti-*P. gingivalis* acompañan el desarrollo de la AR, lo que respalda un vínculo entre la AR y la periodontitis (Bender et al., 2017; Arévalo-Caro et al., 2022). En un metaanálisis, que incluye 14 publicaciones evalúan la detección de anti-RgpB y anti-*P. gingivalis* en 3829 pacientes con AR y 1239 controles, indicando una relación positiva entre

anti-*P. gingivalis* y anti-CCP, confirmando esta asociación (Bae & Lee., 2018). Okada et al., 2011 asociaron la presencia de anticuerpos anti-*P. gingivalis* con anti-CCP y FR; sin embargo, estos anticuerpos también se asociaron con marcadores locales de periodontitis, como PB y CAL en pacientes con AR. Resultados similares se observaron en nuestro estudio; los anticuerpos anti-RgpA y la interacción de los anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD fueron mayores en los pacientes con AR. Además, las interacciones de anticuerpos anti-RgpA y anti-RgpA/anti-PPAD se correlacionaron con FR y anti-CCP. Sin embargo, los anticuerpos anti-RgpA elevados se correlacionaron con marcadores asociados con la periodontitis, como IG y IP, BOP, PB y CAL. Otros estudios de cohorte transversal no informaron diferencias entre los anticuerpos anti-*P. gingivalis* en pacientes con AR y en los controles reportaron diferencias estadísticas débiles para anti-CCP y FR (Mikuls et al., 2014; Hitchon et al., 2010). Por otro lado, de Smit et al., 2014 en un estudio de seguimiento de 289 pacientes con riesgo de desarrollar AR, informaron que, aunque los anti-*P. gingivalis* se asocian con AR, estos no son el único factor para el desarrollo de la enfermedad. En nuestro grupo, en 2016 individuos sanos y con AR temprana reportaron asociación entre anti-*P. gingivalis* IgG2 y anti-CCP apoyando la asociación epidemiológica entre periodontitis y estadios previos a la AR (Bello-Gualtero et al., 2016).

Los indicadores séricos de infección, como los anticuerpos, son los mejores indicadores para estudiar estas asociaciones; los índices clínicos y la presencia de *P. gingivalis* pueden ser modulados por tratamientos antiinflamatorios de la AR respaldados por datos previos de nuestro grupo de investigación (Bello-Gualtero et al., 2016; Romero-Sánchez et al., 2017; Heredia et al., 2019). En población colombiana, la prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes con AR y un grupo control es similar a nuestros resultados (Arévalo-Caro et al., 2022). Otros autores han reportado anti-*P. gingivalis* asociado a AR y no al diagnóstico de periodontitis. En la autoinmunidad de la AR, los anticuerpos contra las proteínas citrulinadas juegan un papel muy importante y se podría suponer que los pacientes con periodontitis y sin AR están expuestos a antígenos citrulinados de *P. gingivalis* que serían inmunógenos sistémicos, pero los títulos de anticuerpos son más altos en los pacientes con AR (Xiao et al., 2020; Jasemi et al., 2021; Moen et al., 2003). La frecuencia de *P. gingivalis* es alta incluso en individuos periodontalmente sanos (Ingalagi et al., 2022).

En pacientes con AR, los anticuerpos anti-*P. gingivalis* o contra sus factores de virulencia no necesariamente deben presentarse únicamente en pacientes con periodontitis ya que el desafío antigénico de la bacteria podría ser suficiente para generar la respuesta sistémica en estos pacientes. *P. gingivalis* tiene una capacidad aberrante de producir péptidos citrulinados a través de su PPAD y gingipaínas, favoreciendo la pérdida de tolerancia inmunológica en pacientes con factores de riesgo asociados a la AR (Smolen et al., 2016). Una revisión sistemática concluyó que la exposición a *P. gingivalis* era un factor de riesgo potencial en la AR y que los anti-*P. gingivalis*, anti-RgpA y anti-RgpB son biomarcadores asociados con la AR (Li et al., 2022).

Estudios previos evaluaron el papel de las gingipaínas en el proceso de citrulinación mediado por PPAD (Johansson et al., 2016; Quirke et al., 2014; de Smit et al., 2014) y el

impacto de los anticuerpos anti-RgpB purificada previamente (Potempa & Nguyen 2007). Quirke et al., (2014) observaron en un estudio de cohortes que los anticuerpos anti-RgpB no se asocian a pacientes con AR y que solo el PPAD podría ser el responsable de la pérdida de tolerancia inmunológica en la AR. Sin embargo, en otros estudios, los anti-RgpB aumentaron significativamente en individuos presintomáticos y son detectables años antes de la aparición de los síntomas de la AR (Johansson et al., 2016) y la AR establecida (Kharlamova et al., 2016).

Este es el primer estudio que evalúa la respuesta humoral a la RgpA nativa en pacientes con AR. Evaluamos la asociación de anticuerpos anti-RgpA y anti-PPAD, y la interacción de anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD en individuos con AR. Encontramos que los pacientes con títulos elevados de anti-RgpA se asociaron con el diagnóstico de AR, con una OR de 4,09 (IC 95% 1,20-13,9). Además, también se observó una asociación más fuerte entre la AR y los anticuerpos anti-RgpA/anti-PPAD doblemente positivos, con un OR de 6,63 (IC del 95%: 1,61-27), lo que sugiere una asociación aditiva entre estos dos marcadores. Sin embargo, los valores de anticuerpos anti-PPAD no mostraron una asociación con la AR durante el análisis de regresión logística. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la presencia de anticuerpos anti-RgpA puede potenciar los anticuerpos anti-PPAD en la AR. El vínculo entre la AR y la periodontitis está asociado a la capacidad citrulinante de las PAD exógenas como la PPAD presente en *P. gingivalis*, generando neoepítomos citrulinados reconocidos por el sistema inmunitario, lo que podría influir en el nivel o inducción de los anti-CCP en el hospedador adicional a los generados por PAD endógenos. Sin embargo, PPAD solo puede citrulinar la arginina en el extremo C-terminal, y allí las gingipaínas RgpA juegan un papel fundamental, exponiendo esta arginina que luego es el blanco de la citrulinación (Quirke et al., 2014). Otros autores (Konig et al., 2015; Fisher et al., 2015; Muñoz-Atienza et al., 2020) han encontrado resultados similares, y no han encontrado diferencias significativas en la detección de estos anticuerpos anti-PPAD entre pacientes con AR y controles o pre-RA y controles. Sin embargo, los autores no evaluaron la interacción con anticuerpos contra otros antígenos como las gingipaínas. Los resultados de este estudio proporcionan evidencia indirecta que respalda este concepto, en el que estas proteínas bacterianas (RgpA y PPAD) circulan en los pacientes que presentan la bacteria en su boca y trabajan en colaboración, las Arg-gingipaínas mejoran la patogenicidad de la PPAD.

Kharlamova et al., 2016 sugirieron que la producción de anti-RgpB no es una causa sino una consecuencia de la AR y que *P. gingivalis* es un candidato para desencadenar o impulsar la autoinmunidad en pacientes con AR. La evidencia presentada aquí que titula estos anticuerpos y su interacción podrían ser marcadores de asociación importantes para definir o confirmar la AR. El título de anti-RgpA mostró alta especificidad, pero baja sensibilidad en la identificación de pacientes con AR. Sin embargo, la evaluación de los anticuerpos presentes de manera simultánea (doble positividad) anti-RgpA y anti-PPAD mejoró la capacidad diagnóstica, aumentando la especificidad al 93,7% y, por tanto, el VPP. En consecuencia, estos marcadores podrían evaluarse para identificar individuos con diagnóstico la AR.

Este estudio incluyó individuos con AR establecida con más de 2 años de evolución. Además, tenían una alta prevalencia de periodontitis (83,2%) y colonización de *P. gingivalis* (46,9%). Por lo tanto, los títulos de anticuerpos contra este patógeno fueron elevados en la población estudiada. Es probable que cuanto mayor sea el tiempo de diagnóstico, permita mayor tiempo de exposición al antígeno bacteriano favoreciendo el aumento de los títulos de anticuerpos contra este antígeno, y los pacientes con AR estén más sensibilizados a la producción de anticuerpos.

Sudamérica ha sido considerada parte del continente americano con mayor prevalencia y severidad de enfermedad periodontal (Dye et al., 2012). En este estudio, la periodontitis en pacientes con AR y controles sin AR fue similar. En Colombia, la frecuencia de periodontitis moderada es alta (61,6%) en pacientes con la edad similar a la de los pacientes incluidos en este estudio (Serrano et al., 2019). Sin embargo, los anticuerpos contra la RgpA y la PPAD de *P. gingivalis* solo se relacionaron con el diagnóstico de AR, por lo que puede ser considerado como un marcador sistémico.

Eriksson et al., 2019 demostraron que la periodontitis y la AR aumentan la expresión de APRIL (un ligando inductor de proliferación de linfocitos B), miembro de la superfamilia de receptores TNF, en suero y saliva. Esta citocina es esencial para la proliferación, supervivencia y maduración de los linfocitos B, lo que lleva a un aumento en la producción de anticuerpos. Esto podría estar involucrado en la asociación entre la AR y la periodontitis, favoreciendo el aumento de los títulos de anticuerpos, podría ser una explicación del porque en los pacientes con AR se asocian los títulos altos de anticuerpos contra antígenos bacterianos y no en los pacientes con periodontitis sin AR. Nuestro estudio mostró que los títulos altos de anti-RgpA/anti-PPAD podrían usarse como marcadores de AR como una prueba de diagnóstico rápida para la detección de estos anticuerpos en el futuro, incluso en mejores títulos que los obtenidos para APRIL.

Incluir a los individuos en el grupo de control fue bastante complicado y desafiante para ser pareado con los individuos con AR. La periodontitis en Colombia es muy alta, y un grupo de comparación sin periodontitis fue imposible de conseguir. Sin embargo, los resultados son evaluados por diferentes análisis y son concluyentes.

## **4.4 Conclusión**

La doble positividad de los dos anticuerpos anti-PPAD y anti-RgpA incrementa la magnitud de la asociación encontrada con solo el anti RgpA por lo cual se proponen utilizar para detectar pacientes con diagnóstico de AR asociada con la enfermedad periodontal. Estudios futuros podrían investigar estos anticuerpos como marcadores de actividad de la AR.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

1. En este trabajo se produjo de manera recombinante la enzima PPAD en dos fragmentos amino y carboxilo terminal, con una alta pureza y un alto rendimiento, lo que permitió su uso como antígeno para la búsqueda de anticuerpos en muestras de pacientes con AR, este avance biotecnológico, permitirá a futuro la evaluación en pacientes con otras enfermedades sistémicas en que esta proteína este implicada.
2. La estrategia de purificación de RgpA planteada en este trabajo fue exitosa, se logró obtener una proteína activa, aunque el rendimiento de purificación no fue muy alto comparado con otros bioprocesos, si es superior a lo reportado previamente. La proteasa purificada fue útil como insumo para el desarrollo de métodos de inmunoquímica para la detección de anticuerpos contra este factor de virulencia en sueros de pacientes con enfermedad periodontal y AR, además a futuro se podrá evaluar en otras enfermedades sistémicas.
3. En este trabajo nos planteamos evaluar la asociación entre la presencia de marcadores serológicos microbiológicos de infección previa o actual por *P. gingivalis* y la AR comparando con un grupo de pacientes con diferentes condiciones periodontales y sin artritis reumatoidea. Durante el planteamiento se propuso que los dos grupos de comparación fueran pareados por género, edad e incluso condición periodontal. Sin embargo, dadas las condiciones sociodemográficas de los pacientes con AR como la edad, además de la alta frecuencia de periodontitis y otras enfermedades sistémica diferentes a la AR en la población colombiana la consecución del grupo control sano que pudiera ser pareado fue imposible de lograr. A pesar de ello, se encontró asociación entre los anticuerpos anti-RgpA y la AR, adicionalmente potencian la asociación de anti-PPAD con esta enfermedad.
4. La evaluación simultanea de anti-PPAD y anti-RgpA se pueden utilizar para detectar la AR asociada con la enfermedad periodontal.

## 5.2 Recomendaciones

Se propone la realización de una prueba rápida para la detección de anticuerpos o antígenos usando como insumos las proteínas purificadas en este estudio, así como los antisueros producidos a partir de las proteínas obtenidas. Con el fin de realizar tamizaje en los pacientes con periodontitis para identificar individuos con posible AR y posteriormente ser remitidos a reumatología.

Los avances biotecnológicos obtenidos en este trabajo serán insumos para la realización de futuros estudios en pacientes con otras enfermedades sistémicas como la enfermedad de Alzheimer, alteraciones en el embarazo y enfermedades cardiovasculares.

Los hallazgos de este trabajo permitirán el mejor entendimiento de la asociación entre la periodontitis y la AR. Sin embargo, se requiere de estudios futuros con mayor número de individuos y etapas de la enfermedad para investigar estos anticuerpos como marcadores sustitutos de la presencia y actividad de la AR. Aunque lo ideal sería realizar trabajos de seguimiento de pacientes con riesgo a desarrollar AR con diferentes estadios de periodontitis y poder determinar los títulos de anticuerpos anti-RgpA, anti-PPAD y su presencia simultánea (doble positividad), con un seguimiento a largo plazo (como mínimo 5 años). Sin embargo, este tipo de estudios en nuestra población es difícil de llevar a cabo por diferentes factores, como el reclutamiento de la población por este tiempo, se ha visto que la deserción en este tipo de estudios es muy alta. Por otro lado, el costo económico es muy alto y el riesgo de no poder conseguir y mantener el número de pacientes en un estudio de este tipo limita la posibilidad en la realización del estudio.

# A. Anexo: Publicaciones derivadas de este estudio

## Publicaciones

- **Castillo, D. M.**, Castillo, Y., Delgadillo, N. A., Neuta, Y., Lafaurie, G. I., Romero-Sánchez, C., & Castellanos, J. E. (2022). Purification of RgpA from external outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Anaerobe*, 77, 102647. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102647>

## Presentaciones en eventos nacionales e internacionales

- Primer simposio de Investigación de Posgrados en Biotecnología (2017). Universidad Nacional de Colombia. Purificación de RgpA a partir de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis*.
- Presentación en el XXIV Congreso Institucional de Investigaciones. Universidad El Bosque (2018). **Premio mejor trabajo de investigación convocatorias externas.** Purificación de RgpA a partir de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis*.
- Presentación en el XXVX Encuentro Nacional de investigación odontológica-ACFO. (2018). Obtención de RgpA a partir de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis*.
- Presentación en el XXX Encuentro Nacional de investigación odontológica-ACFO. (2019). Producción de una peptidil arginina deiminasa (PPAD) recombinante de *Porphyromonas gingivalis*.
- Presentación en el XXV Congreso institucional de investigaciones. Universidad El Bosque (2019). Se presenta la ponencia: Clonación y expresión de peptidil arginina deiminasa. (PPAD) de *Porphyromonas gingivalis*. Presentadora: Diana Marcela

Castillo Perdomo. **Premio al: Mejor proyecto de investigación en el área de ciencias de la Salud.** En el marco del XXV Congreso institucional de investigaciones.

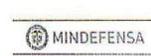
- Presentación en IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition at the Vancouver. (2019) Purification of RgpA from external membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*.
- Presentación en IADR/AADR/CADR General Session Virtual Experience (July 21-24, 2021) (2021) Recombinant *P. gingivalis* Peptidyl-Arginine-Deiminase, a tool for evaluating rheumatic patient antibodies.
- Ponencia en el Seminario Nacional de Investigación Odontológica (SENIOD). 29 de Julio de 2022. Anticuerpos contra Peptidil Arginina Deiminasa y gingipaína RgpA de *P. gingivalis* se asocia con artritis reumatoidea en pacientes con periodontitis. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. Facultad de Odontología.
- Presentación en el III Simposio Virtual de Estudiantes y Egresados de Posgrado en Biotecnología y áreas afines. Universidad Nacional de Colombia (20 al 22 de septiembre de 2022). Los anticuerpos anti-RgpA y la interacción entre anti-RgpA/anti-PPAD se asocian con el diagnóstico de artritis reumatoidea.
- Presentación en el XVIII Congreso Institucional de Investigaciones, 2022. Universidad El Bosque 22 a 24 de noviembre de 2022. Los anticuerpos anti-RgpA y la interacción entre anti-RgpA/anti-PPAD se asocian con el diagnóstico de artritis reumatoide.

## B. Anexo: Aprobación comité de ética

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
<b>MIEMBROS</b>	
NADIA YADIRA CASTAÑEDA G. Lic. Biología y Química MSc. cPhD. Biotecnología Investigadora Presidenta	Bogotá, D.C., 20 de Mayo de 2016
MARÍA CRISTINA MEJÍA G. Psicóloga Representante de la Comunidad Secretaria Ejecutiva	Doctor <b>MIGUEL OTERO CADENA</b> Vicerrector de Investigaciones <b>UNIVERSIDAD EL BOSQUE</b> Ciudad
NOHORA JOYA RAMÍREZ Psicóloga MSc. PhD. Experta en Bioética	Protocolo: "Asociación entre la proteasa RgpA y la enzima asociada a procesos de citrulinación PPAD de Porphyromonas gingivalis y su impacto en pacientes con artritis reumatoide"
NELSON HAMID HERMIDA. Médico MSc. Especialista en Epidemiología	Cód.: UB 405 -2016
LILIANA OVIEDO ALBÁN Psicóloga Representante de la Comunidad	Respetado Doctor Otero:
ABELARDO LEAL HERNÁNDEZ Abogado MSc. cPhD. Abogado	Atentamente me permito informarle que el Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque, en la sesión extra ordinaria del 20 de Mayo 2016, Acta No.012-2016, revisó y aprobó el protocolo ya que se realizaron las correcciones solicitadas.
DIANA MARCELA BUITRAGO R. Bacterióloga PhD Ciencias Farmacéuticas Experta en Metodología de la Investigación	Atentamente,
LILIAN MARITZA NÚÑEZ F. Bacterióloga Especialista en Epidemiología General Experta en Metodología de la Investigación.	 <i>Nadia Yadir Castañeda G.</i> <b>NADIA YADIRA CASTAÑEDA GARCÍA</b> Presidenta Comité Institucional de Ética en Investigaciones
EDGAR ORLANDO BELTRAN. Odontólogo Farmacólogo	Diana M.
FÉLIX GIOVANNI DELGADO MSc Bioquímica Químico Farmacéutico	



HOSPITAL  
MILITAR  
CENTRAL



"Salud - Calidad - Humanización"

Bogotá, D.C. **18 MAY 2016**  
**14829**  
No. \_\_\_\_\_ / SDIC-UNIC.

Doctores(as)

Maria Consuelo Romero Sanchez - Diana Marcela Castillo Perdomo  
Rafael Valle Oñate - Juan Manuel Bello - Wilson Bautista Molano  
Gloria Ines Lafaurie - Eliana Patricia Calvo - Yormaris Castillo  
Nathaly Delgadillo - Philippe Chalem - Cesar Francisco Pacheco Tena  
Servicio REUMATOLOGIA  
Gn.-

Asunto: Aval Institucional Proyecto de Investigación Código 2016-018

De conformidad con la Resolución 276 del 11 de abril del 2016, Capítulo II, Artículo Noveno, que trata de los requisitos para estudio y aprobación de los proyectos de investigación y teniendo en cuenta que el protocolo "ASOCIACION ENTRE LA PROTEASA RGPA Y LA ENZIMA ASOCIADA A PROCESOS DE CITRULINACION PPAD DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS Y SU IMPACTO EN PACIENTES EN ARTRITIS REUMATOIDE." Registrado en la Unidad de Investigación Científica con código 2016-018, cumplió con los requisitos necesarios y después de obtener la aprobación del Comité de Ética en Investigación que sesionó el día 13 mayo del 2016 como consta en el acta extraordinaria No. 01 el Comité de Investigación Científica después de evaluar su factibilidad y viabilidad administrativa autoriza y da Aval Institucional para la realización del protocolo dentro de la institución como consta en el acta No. 04.

El investigador principal debe presentar copia de esta autorización en las unidades o áreas donde requieran obtener información o acceso para el desarrollo del proyecto.

En caso de ser suspendido el estudio o de la realización de cualquier modificación del protocolo, deben reportar por escrito a la Subdirección de Docencia e Investigación Científica y al Comité de Ética en Investigación la información correspondiente con sus respectivos soportes.

Una vez finalizado el estudio el investigador principal, debe presentar a la Subdirección de Docencia e Investigación Científica en medio magnético (2 CD) el informe final de la ejecución del proyecto en la institución y todos los documentos que soporten la difusión del mismo (ej. artículos, memorias de congresos, etc.)

Cordialmente,

Mayor General (RA) **Luis Eduardo Rérez Arango**  
Director General Hospital Militar Central

Teniente Coronel **Luis Eduardo Pino Villareal M.D. MSc**  
Subdirección de Docencia e Investigación Científica

Doctora **Luz Mabel Avila Portillo**  
Jefe Unidad de Investigación Científica

Elabora: Leidy Mendoza

"Salud - Calidad - Humanización"

Transversal 3ª No. 49-00  
3486868 EXT.5310-5363 Bogotá - Colombia



## **C. Anexo: Material suplementario capítulo 4**

**Tabla S1:** Comparación de niveles de interacción Anti-RgpA, Anti-PPAD y Anti-PPAD/RgpA con marcadores de periodontitis estratificados por presencia o ausencia de AR.

Variable	AR		Control		AR		Control		AR		Control		AR		Control	
	RgpA		RgpA		RgpA		RgpA		PPAD		PPAD		PPAD		PPAD	
	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2	<Q2	>Q2
<b>Number of Teeth</b>																
Median	19	21	25	26	20	21	25	25	20	19	25	25	20	19	25	25
(IQR)	(12-25)	(13-25)	(21-28)	(20-28)	(12-25)	(15-25)	(21-28)	(20-28)	(13-25)	(12-25)	(20-28)	(21-28)	(13-25)	(11-25)	(21-28)	(21-28)
<b>Plaque Index%</b>																
Median	61	71	53	51	64	73	54	49	64	71	57	27	69	66	54	46
(IQR)	(18-81)	(41-87)	(36-66)	(34-75)	(33-82)	(41-89)	(38-68)	(23-77)	(33-82)	(36-88)	(42-61)	(28-66)	(40-84)	(33-88)	(4-67)	(27-71)
<b>Gingival Index%</b>																
Median	44	52	32	29	48	53	32	16	48	50	33	31	52	48	33	3
(IQR)	(7-73)	(1-74)	(23-48)	(15-57)	13-73	4-73	21-51	9-49	10-73	10-79	17-51	17-52	10-71	10-81	18-49	16-57
<b>Bleeding on probing%</b>																
Median	36	<b>49**</b>	40	37	41	<b>55**</b>	40	32	44	47	40	39	46	49	40	39
(IQR)	(16-58)	<b>(32-68)</b>	(27-50)	(26-54)	2-58	<b>31-59</b>	27-50	8-54	26-63	20-63	27-55	24-50	26-62	20-67	27-54	28-51
<b>Pocket Depth mm</b>																
Median	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
(IQR)	1-4.1	1-4.2	4-4.3	1-4.3	1-4.1	1-4.2	4-4.3	1-4.2	1-4.2	1-4.1	1-4.2	1-4.3	1-4.2	1-4.1	1-4.2	4-4.3
<b>CAL mm</b>																
Median	2.6	2.8	2.3	2.6	2.7	2.7	2.3	<b>2.7***</b>	2.8	2.7	2.4	2.3	2.8	2.7	2.4	2.3
(IQR)	2.2-3.3	2.3-3.3	2-2.8	2-3.1	2.2-3-3	2.2-3-3	1.9-2.9	<b>2.4-3</b>	2.3-3.3	2.3-3.5	2-3	1.9-2.8	2.4-3.3	2.2-3.5	2-3.0	1.9-3
<b>CAL (%)</b>																
Median	85	90	46	<b>56**</b>	87	<b>90**</b>	52	50	86	87	53	45	87	87	51	50
(IQR)	54-98	67-97	32-70	<b>39-84</b>	60-98	<b>65-99</b>	32-77	48-70	54-97	65-97	34-78	31-70	60-97	63-96	34-72	35-82

\*\* p<0.05. RIQ= Rango Intercuartil; RgpA= Arg-gingipaína A; PPAD= peptidil arginina deiminasa de *P. gingivalis*; BOP=S ngrado al sondaje; CAL=Perdida de inserción Clínic

**Tabla S2:** Comparación de los niveles de interacción de Anti-RgpA, Anti-PPAD y AntiPPAD-RgpA con la severidad de la periodontitis y la actividad de la AR.

Variable	AR Periodontitis +	AR Periodontitis -	AR Severidad +	AR Severidad -	AR Actividad +	AR Actividad -
<b>Anti-RgpA Q2</b>						
<Q2	44 (80)	11(20)	43 (78)	12(22)	16(29)	39(71)
≥Q2	75(85)	13(15)	75 (85)	13(15)	31(35)	57(65)
<b>Anti-RgpA Q1</b>						
<Q1	79(81)	18(19)	78 (80)	19 (20)	28(29)	69(72)
>Q1	40(87)	6(13)	40 (87)	6 (13)	19(9)	27(91)
<b>Anti-PPAD</b>						
<Q2	53(89)	6(11)	52(88)	7(12)	18(31)	41(69)
>Q2	66(79)	18(21)	66(79)	18 (21)	29(35)	55(65)
<b>Anti-PPAD</b>						
<Q1	<b>79(89)**</b>	10(11)	<b>78 (88) **</b>	11(12)	27(30)	62(70)
>Q1	40(74)	14 (26)	40(64)	14(36)	20(37)	34(63)
<b>Anti-PPAD/Anti-RgpAQ2</b>						
Positive	95 (85)	17 (15)	94 (84)	18 (26)	18 (30)	42(70)
Negative	24 (77)	7 (23)	24 (77)	7 (33)	29 (35)	54(65)
<b>Anti-PPAD/ Anti-RgpAQ1</b>						
Positivo	105(84)	20 (16)	104(83)	21(17)	29(30)	70(70)
Negativo	14 (78)	4 (22)	14(78)	4 (28)	18(41)	26 (59)

\*\*

Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). AR= Arg-gingipaina A; PPAD= peptidil arginina deiminasa de *P. gingivalis*.

## Bibliografía

Adams, B., Nunes, J. M., Page, M. J., Roberts, T., Carr, J., Nell, T. A., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2019). Parkinson's Disease: A Systemic Inflammatory Disease Accompanied by Bacterial Inflammagens. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 210. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00210>

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., ... Hawker, G. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*, 62(9), 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>

Ambrosio, N., Marín, M. J., Laguna, E., Herrera, D., Sanz, M., & Figuero, E. (2019). Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. *Archives of oral biology*, 98, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.025>

Arévalo-Caro, C., Romero-Sánchez, C., & Garavito-Rodríguez, E. (2022). Relation between anti-*Porphyromonas gingivalis* antibody titers and HLA-DRB1 neutral alleles in individuals with rheumatoid arthritis. *Acta odontologica Scandinavica*, 80(2), 131–139. <https://doi.org/10.1080/00016357.2021.1959053>

Azzi, L., Rania, S., Vinci, R., Spadari, F., Croveri, F., Scognamiglio, C., Farronato, D., Tettamanti, L., Tagliabue, A., Silvestre-Rangil, J., & Bellintani, C. (2017). Periodontal microbioma and rheumatoid arthritis: The role of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 31(2 Suppl 1), 97–103.

Bae, S. C., & Lee, Y. H. (2018). Association between anti-*Porphyromonas gingivalis* antibody, anti-citrullinated protein antibodies, and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 77(6), 522–532. <https://doi.org/10.1007/s00393-017-0328-y>

Bello-Gualtero, J. M., Lafaurie, G. I., Hoyos, L. X., Castillo, D. M., De-Avila, J., Munevar, J. C., Unriza, S., Londoño, J., Valle-Oñate, R., & Romero-Sánchez, C. (2016). Periodontal Disease in Individuals With a Genetic Risk of Developing

Arthritis and Early Rheumatoid Arthritis: A Cross-Sectional Study. *Journal of periodontology*, 87(4), 346–356. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150455>

Bender, P., Bürgin, W. B., Sculean, A., & Eick, S. (2017). Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* in patients with and without rheumatoid arthritis - a systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*, 21(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1938-5>

Bereta, G., Goulas, T., Madej, M., Bielecka, E., Solà, M., Potempa, J., & Xavier Gomis-Rüth, F. (2019). Structure, function, and inhibition of a genomic/clinical variant of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 28(3), 478–486. <https://doi.org/10.1002/pro.3571>

Bıyıkoğlu, B., Buduneli, N., Aksu, K., Nalbantsoy, A., Lappin, D. F., Evrenosoğlu, E., & Kinane, D. F. (2013). Periodontal therapy in chronic periodontitis lowers gingival crevicular fluid interleukin-1beta and DAS28 in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology international*, 33(10), 2607–2616. <https://doi.org/10.1007/s00296-013-2781-5>

Bonfim, M., Mattos, F. F., Ferreira e Ferreira, E., Campos, A. C., & Vargas, A. M. (2013). Social determinants of health and periodontal disease in Brazilian adults: a cross-sectional study. *BMC oral health*, 13, 22. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-13-22>

Borgnakke W. S. (2015). Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease?. *Dental clinics of North America*, 59(4), 885–917. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.06.007>

Botero, J. E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourt, M., & Arce, R. M. (2007). Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *Journal of periodontology*, 78(4), 696–704. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060129>

Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of clinical microbiology*, 41(11), 4950–4954. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.4950-4954.2003>

Cantley, M. D., Haynes, D. R., Marino, V., & Bartold, P. M. (2011). Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *Journal of clinical periodontology*, 38(6), 532–541. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01714.x>

Castillo-Cañón, J. C., Trujillo-Cáceres, S. J., Bautista-Molano, W., Valbuena-García, A. M., Fernández-Ávila, D. G., & Acuña-Merchán, L. (2021). Rheumatoid arthritis in Colombia: a clinical profile and prevalence from a national registry. *Clinical rheumatology*, 40(9), 3565–3573. <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05710-x>

Castillo, D. M., Castillo, Y., Delgadillo, N. A., Neuta, Y., Lafaurie, G. I., Romero-Sánchez, C., & Castellanos, J. E. (2022). Purification of RgpA from external outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Anaerobe*, 77, 102647. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102647>

Castillo, Y., Castellanos, J. E., Lafaurie, G. I., & Castillo, D. M. (2022). *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles modulate cytokine and chemokine production by gingipain-dependent mechanisms in human macrophages. *Archives of oral biology*, 140, 105453. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105453>

Ciesielski, O., Biesiekierska, M., Pantho, B., Soszyński, M., Pirola, L., & Balcerczyk, A. (2022). Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 79(2), 94. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04126-3>

Chang, K., Yang, S. M., Kim, S. H., Han, K. H., Park, S. J., & Shin, J. I. (2014). Smoking and rheumatoid arthritis. *International journal of molecular sciences*, 15(12), 22279–22295. <https://doi.org/10.3390/ijms15122279>

Chaparro-Sanabria, J. A., Bautista-Molano, W., Bello-Gualtero, J. M., Chila-Moreno, L., Castillo, D. M., Valle-Oñate, R., Chalem, P., & Romero-Sánchez, C. (2019). Association of adipokines with rheumatic disease activity indexes and periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis and their first-degree relatives. *International journal of rheumatic diseases*, 22(11), 1990–2000. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13724>

Chapple, I., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S.,

Plemons, J., Romito, G. A., Shapira, L., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89 Suppl 1, S74–S84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>

Chen, Y. W., Nagasawa, T., Wara-Aswapati, N., Ushida, Y., Wang, D., Takeuchi, Y., Kobayashi, H., Umeda, M., Inoue, Y., Iwai, T., Ishikawa, I., & Izumi, Y. (2009). Association between periodontitis and anti-cardiolipin antibodies in Buerger disease. *Journal of clinical periodontology*, 36(10), 830–835. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01467.x>

Chen, Z., Potempa, J., Polanowski, A., Wikstrom, M., & Travis, J. (1992). Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. *The Journal of biological chemistry*, 267(26), 18896–18901.

Chiang, H. I., Li, J. R., Liu, C. C., Liu, P. Y., Chen, H. H., Chen, Y. M., Lan, J. L., & Chen, D. Y. (2019). An Association of Gut Microbiota with Different Phenotypes in Chinese Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1770. <https://doi.org/10.3390/jcm8111770>

Chou, Y. Y., Lai, K. L., Chen, D. Y., Lin, C. H., & Chen, H. H. (2015). Rheumatoid Arthritis Risk Associated with Periodontitis Exposure: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *PloS one*, 10(10), e0139693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139693>

Crowe, J., Masone, B. S., & Ribbe, J. (1995). One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Molecular biotechnology*, 4(3), 247–258. <https://doi.org/10.1007/BF02779018>

Cush J. J. (2021). Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment. *The Medical clinics of North America*, 105(2), 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.10.006>

Curtis, M. A., Kuramitsu, H. K., Lantz, M., Macrina, F. L., Nakayama, K., Potempa, J., Reynolds, E. C., & Aduse-Opoku, J. (1999). Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontal research*, 34(8), 464–472. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1999.tb02282.x>

Darrah, E., & Andrade, F. (2018). Rheumatoid arthritis and citrullination. *Current opinion in rheumatology*, 30(1), 72–78. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000452>

Dashper, S. G., Mitchell, H. L., Seers, C. A., Gladman, S. L., Seemann, T., Bulach, D. M., Chandry, P. S., Cross, K. J., Cleal, S. M., & Reynolds, E. C. (2017). *Porphyromonas gingivalis* Uses Specific Domain Rearrangements and Allelic Exchange to Generate Diversity in Surface Virulence Factors. *Frontiers in microbiology*, 8, 48. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00048>

Delgado-Angulo, E. K., Bernabé, E., & Marcenes, W. (2016). Ethnic inequalities in periodontal disease among British adults. *Journal of clinical periodontology*, 43(11), 926–933. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12605>

Delgado-Vega, A. M., Martín, J., Granados, J., & Anaya, J. M. (2006). Epidemiología genética de la artritis reumatoide: qué esperar de América Latina? *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 26(4), 562–584.

de Pablo, P., Dietrich, T., & McAlindon, T. E. (2008). Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *The Journal of rheumatology*, 35(1), 70–76.

de Smit, M., van de Stadt, L. A., Janssen, K. M., Doornbos-van der Meer, B., Vissink, A., van Winkelhoff, A. J., Brouwer, E., Westra, J., & van Schaardenburg, D. (2014). Antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in seropositive arthralgia patients do not predict development of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(6), 1277–1279. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204594>

de Vries, C., Ruacho, G., Kindstedt, E., Potempa, B. A., Potempa, J., Klinge, B., Lundberg, P., Svenungsson, E., & Lundberg, K. (2022). Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Are Increased in Patients with Severe Periodontitis, and Associate with Presence of Specific Autoantibodies and Myocardial Infarction. *Journal of clinical medicine*, 11(4), 1008. <https://doi.org/10.3390/jcm11041008>

Derksen, V., Huizinga, T., & van der Woude, D. (2017). The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Seminars in immunopathology*, 39(4), 437–446. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0627-z>

Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., ... Potempa, J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science advances*, 5(1), eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>

Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G., & Genco, R. J. (2012). Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*, 83(12), 1449–1454. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110664>

Eke, P. I., Wei, L., Borgnakke, W. S., Thornton-Evans, G., Zhang, X., Lu, H., McGuire, L. C., & Genco, R. J. (2016). Periodontitis prevalence in adults  $\geq 65$  years of age, in the USA. *Periodontology 2000*, 72(1), 76–95. <https://doi.org/10.1111/prd.12145>

Eke, P. I., Thornton-Evans, G. O., Wei, L., Borgnakke, W. S., Dye, B. A., & Genco, R. J. (2018). Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 149(7), 576–588.e6. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.04.023>

Eriksson, K., Fei, G., Lundmark, A., Benchimol, D., Lee, L., Hu, Y., Kats, A., Saevarsdottir, S., Catrina, A. I., Klinge, B., Andersson, A. F., Klareskog, L., Lundberg, K., Jansson, L., & Yucel-Lindberg, T. (2019). Periodontal Health and Oral Microbiota in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of clinical medicine*, 8(5), 630. <https://doi.org/10.3390/jcm8050630>

Federici, M. M., Venkat, K., Bam, N., Patel, K., Dal Monte, P. R., Fernie, B., Hensley, P., Carr, S., Baldoni, J., Truneh, A., & Erickson, J. (2003). Detection and consequences of recombinant protein isoforms: implications for biological potency. *Developments in biologicals*, 113, 53–114.

Firestein, G. S., Budd, R., Gabriel, S. E., O'Dell, J. R., & McInnes, I. B. *Kelley's Textbook of Rheumatology: Expert Consult Premium Edition*. Elsevier Health Sciences; 9th Ed. Páginas 1059-1074; 2013. ISBN 978-1-4377-1738-9.

Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, 46(2), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>

Fisher, B. A., Cartwright, A. J., Quirke, A. M., de Pablo, P., Romaguera, D., Panico, S., Mattiello, A., Gavrilu, D., Navarro, C., Sacerdote, C., Vineis, P., Tumino, R., Lappin, D. F., Apatzidou, D., Culshaw, S., Potempa, J., Michaud, D. S., Riboli, E., & Venables, P. J. (2015). Smoking, *Porphyromonas gingivalis* and the immune response to citrullinated autoantigens before the clinical onset of rheumatoid arthritis in a Southern European nested case-control study. *BMC musculoskeletal disorders*, 16, 331. <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0792-y>

Fitzpatrick, R. E., Wijeyewickrema, L. C., & Pike, R. N. (2009). The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future microbiology*, 4(4), 471–487. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.18>

Fransen J., Stucki G., van Riel PLCM. (2003). Rheumatoid arthritis measures: Disease Activity Score (DAS), Disease Activity Score-28 (DAS28), Rapid Assessment of Disease Activity in Rheumatology (RADAR), and Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI). *Arthritis Rheum*, 49 (5S), S214–224. <https://doi.org/10.1002/art.11407>

Gabriel S. E. (2001). The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 27(2), 269–281. [https://doi.org/10.1016/s0889-857x\(05\)70201-5](https://doi.org/10.1016/s0889-857x(05)70201-5)

Gabarrini, G., Chlebowicz, M. A., Vega Quiroz, M. E., Veloo, A., Rossen, J., Harmsen, H., Laine, M. L., van Dijn, J. M., & van Winkelhoff, A. J. (2018). Conserved Citrullinating Exoenzymes in *Porphyromonas* Species. *Journal of dental research*, 97(5), 556–562. <https://doi.org/10.1177/0022034517747575>

García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2):30-39.

Gawron, K., Bereta, G., Nowakowska, Z., Lazarz-Bartyzel, K., Lazarz, M., Szmigielski, B., Mizgalska, D., Buda, A., Koziel, J., Oruba, Z., Chomyszyn-Gajewska, M., & Potempa, J. (2014). Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* contributes to infection of gingival fibroblasts and induction of prostaglandin E2 -signaling pathway. *Molecular oral microbiology*, 29(6), 321–332. <https://doi.org/10.1111/omi.12081>

Ghayoumi, N., Chen, C., & Slots, J. (2002). *Dialister pneumosintes*, a new putative periodontal pathogen. *Journal of periodontal research*, 37(1), 75–78. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.05019.x>

Giles, J. T., Fert-Bober, J., Park, J. K., Bingham, C. O., 3rd, Andrade, F., Fox-Talbot, K., Pappas, D., Rosen, A., van Eyk, J., Bathon, J. M., & Halushka, M. K. (2012). Myocardial citrullination in rheumatoid arthritis: a correlative histopathologic study. *Arthritis research & therapy*, 14(1), R39. <https://doi.org/10.1186/ar3752>

Gómez-Bañuelos, E., Mukherjee, A., Darrah, E., & Andrade, F. (2019). Rheumatoid Arthritis-Associated Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of clinical medicine*, 8(9), 1309. <https://doi.org/10.3390/jcm8091309>

Gorasia, D. G., Lunar Silva, I., Butler, C. A., Chabaliier, M., Doan, T., Cascales, E., Veith, P. D., & Reynolds, E. C. (2022). Protein Interactome Analysis of the Type IX Secretion System Identifies PorW as the Missing Link between the PorK/N Ring Complex and the Sov Translocon. *Microbiology spectrum*, 10(1), e0160221. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01602-21>

Gorasia, D. G., Veith, P. D., Chen, D., Seers, C. A., Mitchell, H. A., Chen, Y. Y., Glew, M. D., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. (2015). *Porphyromonas gingivalis* Type IX Secretion Substrates Are Cleaved and Modified by a Sortase-Like Mechanism. *PLoS pathogens*, 11(9), e1005152. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005152>

Goulas, T., Mizgalska, D., Garcia-Ferrer, I., Kantyka, T., Guevara, T., Szmigielski, B., Sroka, A., Millán, C., Usón, I., Veillard, F., Potempa, B., Mydel, P., Solà, M., Potempa, J., & Gomis-Rüth, F. X. (2015). Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor, *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase. *Scientific reports*, 5, 11969. <https://doi.org/10.1038/srep11969>

Graves D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*, 79(8 Suppl), 1585–1591. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080183>

Guevara, T., Rodríguez-Banqueri, A., Lasica, A. M., Ksiazek, M., Potempa, B. A., Potempa, J., & Gomis-Rüth, F. X. (2019). Structural determinants of inhibition of *Porphyromonas gingivalis* gingipain K by KYT-36, a potent, selective, and

bioavailable peptidase inhibitor. *Scientific reports*, 9(1), 4935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41354-3>

Gully, N., Bright, R., Marino, V., Marchant, C., Cantley, M., Haynes, D., Butler, C., Dashper, S., Reynolds, E., & Bartold, M. (2014). *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase, a key contributor in the pathogenesis of experimental periodontal disease and experimental arthritis. *PloS one*, 9(6), e100838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100838>

Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>

Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>

Hamamoto, Y., Ouhara, K., Munenaga, S., Shoji, M., Ozawa, T., Hisatsune, J., Kado, I., Kajiya, M., Matsuda, S., Kawai, T., Mizuno, N., Fujita, T., Hirata, S., Tanimoto, K., Nakayama, K., Kishi, H., Sugiyama, E., & Kurihara, H. (2020). Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model. *Arthritis research & therapy*, 22(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02348-z>

Hedström, A. K., Stawiarz, L., Klareskog, L., & Alfredsson, L. (2018). Smoking and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Swedish population-based case-control study. *European journal of epidemiology*, 33(4), 415–423. <https://doi.org/10.1007/s10654-018-0360-5>

Heredia-P, A. M., Lafaurie, G. I., Bautista-Molano, W., Trujillo, T. G., Chalem-Choueka, P., Bello-Gualtero, J. M., Pacheco-Tena, C., Chila-Moreno, L., & Romero-Sánchez, C. (2019). Predictive factors related to the progression of periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis: a cohort study. *BMC oral health*, 19(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0939-6>

Hirai, K., Yamaguchi-Tomikawa, T., Eguchi, T., Maeda, H., & Takashiba, S. (2020). Identification and Modification of *Porphyromonas gingivalis* Cysteine Protease, Gingipain, Ideal for Screening Periodontitis. *Frontiers in immunology*, 11, 1017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01017>

Hitchon, C. A., Chandad, F., Ferucci, E. D., Willemze, A., Ioan-Facsinay, A., van der Woude, D., Markland, J., Robinson, D., Elias, B., Newkirk, M., Toes, R. M., Huizinga, T. W., & El-Gabalawy, H. S. (2010). Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *The Journal of rheumatology*, 37(6), 1105–1112. <https://doi.org/10.3899/jrheum.091323>

Huck, O., You, J., Han, X., Cai, B., Panek, J., & Amar, S. (2018). Reduction of Articular and Systemic Inflammation by Kava-241 in a *Porphyromonas gingivalis*-Induced Arthritis Murine Model. *Infection and immunity*, 86(9), e00356-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00356-18>

Imamura T. (2003)a. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*, 74(1), 111–118. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.1.111>

Imamura, T., Travis, J., & Potempa, J. (2003)b. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Current protein & peptide science*, 4(6), 443–450. <https://doi.org/10.2174/1389203033487027>

Ingalagi, P., Bhat, K. G., Kulkarni, R. D., Kotrashetti, V. S., Kumbar, V., & Kugaji, M. (2022). Detection and comparison of prevalence of *Porphyromonas gingivalis* through culture and Real Time-polymerase chain reaction in subgingival plaque samples of chronic periodontitis and healthy individuals. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 26(2), 288. [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_163\\_21](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_163_21)

Jang, S., Kwon, E. J., & Lee, J. J. (2022). Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 905. <https://doi.org/10.3390/ijms23020905>

Jasemi, S., Erre, G. L., Cadoni, M. L., Bo, M., & Sechi, L. A. (2021). Humoral Response to Microbial Biomarkers in Rheumatoid Arthritis Patients. *Journal of clinical medicine*, 10(21), 5153. <https://doi.org/10.3390/jcm10215153>

Jenning, M., Marklein, B., Ytterberg, J., Zubarev, R. A., Joshua, V., van Schaardenburg, D., van de Stadt, L., Catrina, A. I., Nonhoff, U., Häupl, T., Konthur, Z., Burmester, G. R., & Skriner, K. (2020). Bacterial citrullinated epitopes generated by *Porphyromonas gingivalis* infection—a missing link for ACPA production. *Annals*

of the rheumatic diseases, 79(9), 1194–1202. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216919>

Jeong, H., Kim, H. J., & Lee, S. J. (2015). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome announcements*, 3(2), e00134-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00134-15>

Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>

Johansson, L., Sherina, N., Kharlamova, N., Potempa, B., Larsson, B., Israelsson, L., Potempa, J., Rantapää-Dahlqvist, S., & Lundberg, K. (2016). Concentration of antibodies against *Porphyromonas gingivalis* increased before the onset of symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 18(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1100-4>

Jung, H., Jung, S. M., Rim, Y. A., Park, N., Nam, Y., Lee, J., Park, S. H., & Ju, J. H. (2017). Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice. *PloS one*, 12(11), e0188698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188698>

Kadowaki, T., Yoneda, M., Okamoto, K., Maeda, K., & Yamamoto, K. (1994). Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *The Journal of biological chemistry*, 269(33), 21371–21378.

Kharlamova, N., Jiang, X., Sherina, N., Potempa, B., Israelsson, L., Quirke, A. M., Eriksson, K., Yucel-Lindberg, T., Venables, P. J., Potempa, J., Alfredsson, L., & Lundberg, K. (2016). Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 68(3), 604–613. <https://doi.org/10.1002/art.39491>

Klareskog, L., Widhe, M., Hermansson, M., & Rönnelid, J. (2008). Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise. *Current opinion in rheumatology*, 20(3), 300–305. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3282fbd22a>

Konig, M. F., Paracha, A. S., Moni, M., Bingham, C. O., 3rd, & 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. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205385>

Kwon, T., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International dental journal*, 71(6), 462–476. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>

Kuramitsu H. K. (1998). Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: what don't they do?. *Oral microbiology and immunology*, 13(5), 263–270. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1998.tb00706.x>

Krutyholowa, A., Strzelec, K., Dziedzic, A., Bereta, G. P., Łazarz-Bartyzel, K., Potempa, J., & Gawron, K. (2022). Host and bacterial factors linking periodontitis and rheumatoid arthritis. *Frontiers in immunology*, 13, 980805. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.980805>

Lafaurie, G. I., Neuta, Y., Ríos, R., Pacheco-Montealegre, M., Pianeta, R., Castillo, D. M., Herrera, D., Reyes, J., Diaz, L., Castillo, Y., Sanz, M., & Iniesta, M. (2022). Differences in the subgingival microbiome according to stage of periodontitis: A comparison of two geographic regions. *PloS one*, 17(8), e0273523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273523>

Lafaurie, G.I., Castillo, D.M., Iniesta, M., Sanz, M., Gómez, L. A., Castillo, Y., Pianeta, R., Delgadillo, N.A., Neuta, Y., Diaz-Báez, D., Herrera, D. (2023). Differential analysis of culturable and unculturable subgingival target microorganisms according to the stages of periodontitis. *Clinical Oral Investigations* (Aceptado para publicación).

Lafaurie, G. I., Mayorga-Fayad, I., Torres, M. F., Castillo, D. M., Aya, M. R., Barón, A., & Hurtado, P. A. (2007a). Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *Journal of clinical periodontology*, 34(10), 873–879. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01125.x>

Lafaurie, G. I., Contreras, A., Barón, A., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A., Giraldo, A., González, F., Mantilla, S., Botero, A., Archila, L. H., Díaz, A., Chacón, T., Castillo, D. M., Betancourt, M., Del Rosario Aya, M., & Arce, R. (2007b). Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis

in Colombia: a multicenter study. *Journal of periodontology*, 78(4), 629–639. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060187>

Laugisch, O., Wong, A., Sroka, A., Kantyka, T., Koziel, J., Neuhaus, K., Sculean, A., Venables, P. J., Potempa, J., Möller, B., & Eick, S. (2016). Citrullination in the periodontium--a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clinical oral investigations*, 20(4), 675–683. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1556-7>

Lee, J. Y., Choi, I. A., Kim, J. H., Kim, K. H., Lee, E. Y., Lee, E. B., Lee, Y. M., & Song, Y. W. (2015). Association between anti-*Porphyromonas gingivalis* or anti- $\alpha$ -enolase antibody and severity of periodontitis or rheumatoid arthritis (RA) disease activity in RA. *BMC musculoskeletal disorders*, 16, 190. <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0647-6>

Leech, M. T., & Bartold, P. M. (2015). The association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 29(2), 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2015.03.001>

Li, Y., Guo, R., Oduro, P. K., Sun, T., Chen, H., Yi, Y., Zeng, W., Wang, Q., Leng, L., Yang, L., & Zhang, J. (2022). The Relationship Between *Porphyromonas gingivalis* and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 956417. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.956417>

Li, N., & Collyer, C. A. (2011). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*- Complex domain structures confer diverse functions. *European journal of microbiology & immunology*, 1(1), 41–58. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.1.2011.1.7>

Liu, X., Zou, Q., Zeng, B., Fang, Y., & Wei, H. (2013). Analysis of fecal *Lactobacillus* community structure in patients with early rheumatoid arthritis. *Current microbiology*, 67(2), 170–176. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0338-1>

Loutan, L., Alpizar-Rodriguez, D., Courvoisier, D. S., Finckh, A., Mombelli, A., & Giannopoulou, C. (2019). Periodontal status correlates with anti-citrullinated protein antibodies in first-degree relatives of individuals with rheumatoid arthritis. *Journal of clinical periodontology*, 46(7), 690–698. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13117>

Lübcke, P. M., Ebbers, M., Volzke, J., Bull, J., Kneitz, S., Engelmann, R., Lang, H., Kreikemeyer, B., & Müller-Hilke, B. (2019). Periodontal treatment prevents arthritis

in mice and methotrexate ameliorates periodontal bone loss. *Scientific reports*, 9(1), 8128. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44512-9>

Ma, K. S., Chiang, C. H., Chen, Y. W., & Wang, L. T. (2021). Correspondence to 'Bacterial citrullinated epitopes generated by *Porphyromonas gingivalis* infection-a missing link for ACPA production'. *Annals of the rheumatic diseases*, annrheumdis-2020-219255. Advance online publication. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-219255>

Mangat, P., Wegner, N., Venables, P. J., & Potempa, J. (2010). Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis?. *Arthritis research & therapy*, 12(3), 209. <https://doi.org/10.1186/ar3000>

Margetts, M. B., Barr, I. G., & Webb, E. A. (2000). Overexpression, purification, and refolding of a *Porphyromonas gingivalis* cysteine protease from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 18(3), 262–268. <https://doi.org/10.1006/prev.2000.1193>

Mantri, C. K., Chen, C. H., Dong, X., Goodwin, J. S., Pratap, S., Paromov, V., & Xie, H. (2015). Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of *Porphyromonas gingivalis*. *MicrobiologyOpen*, 4(1), 53–65. <https://doi.org/10.1002/mbo3.221>

Marchesan, J. T., Gerow, E. A., Schaff, R., Taut, A. D., Shin, S. Y., Sugai, J., Brand, D., Burberry, A., Jorns, J., Lundy, S. K., Nuñez, G., Fox, D. A., & Giannobile, W. V. (2013). *Porphyromonas gingivalis* oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy*, 15(6), R186. <https://doi.org/10.1186/ar4376>

Maresz, K. J., Hellvard, A., Sroka, A., Adamowicz, K., Bielecka, E., Koziel, J., Gawron, K., Mizgalska, D., Marcinska, K. A., Benedyk, M., Pyrc, K., Quirke, A. M., Jonsson, R., Alzabin, S., Venables, P. J., Nguyen, K. A., Mydel, P., & Potempa, J. (2013). *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS pathogens*, 9(9), e1003627. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003627>

Martínez-Rivera, J. I., Xibillé-Friedmann, D. X., González-Christen, J., de la Garza-Ramos, M. A., Carrillo-Vázquez, S. M., & Montiel-Hernández, J. L. (2017). Salivary

ammonia levels and *Tannerella forsythia* are associated with rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *Clinical and experimental dental research*, 3(3), 107–114. <https://doi.org/10.1002/cre2.68>

Mayorga-Fayad, I., Lafaurie, G. I., Contreras, A., Castillo, D. M., Barón, A., & Aya, M. (2007). Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 27(1), 21–33.

McGraw, W. T., Potempa, J., Farley, D., & Travis, J. (1999). Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infection and immunity*, 67(7), 3248–3256. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.7.3248-3256.1999>

Ministerio de salud. Estudio Nacional En Salud Bucal (ENSAB IV). Bogotá, Colombia. 2014;4.Consultado en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf>

Mikuls, T. R., Payne, J. B., Yu, F., Thiele, G. M., Reynolds, R. J., Cannon, G. W., Markt, J., McGowan, D., Kerr, G. S., Redman, R. S., Reimold, A., Griffiths, G., Beatty, M., Gonzalez, S. M., Bergman, D. A., Hamilton, B. C., 3rd, Erickson, A. R., Sokolove, J., Robinson, W. H., Walker, C., ... O'Dell, J. R. (2014). Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(5), 1090–1100. <https://doi.org/10.1002/art.38348>

Montgomery, A. B., Kopec, J., Shrestha, L., Thezenas, M. L., Burgess-Brown, N. A., Fischer, R., Yue, W. W., & Venables, P. J. (2016). Crystal structure of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 75(6), 1255–1261. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207656>

Moen, K., Brun, J. G., Madland, T. M., Tynning, T., & Jonsson, R. (2003). Immunoglobulin G and A antibody responses to *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* in sera and synovial fluids of arthritis patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(6), 1043–1050. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.1043-1050.2003>

Morales, L., Velandia, M. L., Calderon, M. A., Castellanos, J. E., & Chaparro-Olaya, J. (2017). Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NS3 del virus

del dengue. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 37(1), 131–140. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249>

Moses, T., & Holland, P. W. (2010). A comparison of statistical selection strategies for univariate and bivariate log-linear models. *The British journal of mathematical and statistical psychology*, 63(Pt 3), 557–574. <https://doi.org/10.1348/000711009X478580>

Muñoz-Atienza, E., Flak, M. B., Sirr, J., Paramonov, N. A., Aduse-Opoku, J., Pitzalis, C., & Curtis, M. A. (2020). The *P. gingivalis* Autocitrullinome Is Not a Target for ACPA in Early Rheumatoid Arthritis. *Journal of dental research*, 99(4), 456–462. <https://doi.org/10.1177/0022034519898144>

Munenaga, S., Ouhara, K., Hamamoto, Y., Kajiya, M., Takeda, K., Yamasaki, S., Kawai, T., Mizuno, N., Fujita, T., Sugiyama, E., & Kurihara, H. (2018). The involvement of C5a in the progression of experimental arthritis with *Porphyromonas gingivalis* infection in SKG mice. *Arthritis research & therapy*, 20(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1744-3>

Nakao, R., Takashiba, S., Kosono, S., Yoshida, M., Watanabe, H., Ohnishi, M., & Senpuku, H. (2014). Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. *Microbes and infection*, 16(1), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.10.005>

Nakayama, K., Kadowaki, T., Okamoto, K., & Yamamoto, K. (1995). Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *The Journal of biological chemistry*, 270(40), 23619–23626. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.40.23619>

Nemoto, T. K., & Ohara-Nemoto, Y. (2016). Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism. *The Japanese dental science review*, 52(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2015.08.002>

Nunes, J. M., Fillis, T., Page, M. J., Venter, C., Lancry, O., Kell, D. B., Windberger, U., & Pretorius, E. (2020). Gingipain R1 and Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis* Have Major Effects on Blood Clot Morphology and

Mechanics. *Frontiers in immunology*, 11, 1551. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01551>

Okada, M., Kobayashi, T., Ito, S., Yokoyama, T., Abe, A., Murasawa, A., & Yoshie, H. (2013). Periodontal treatment decreases levels of antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and citrulline in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Journal of periodontology*, 84(12), e74–e84. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130079>

Okada, M., Kobayashi, T., Ito, S., Yokoyama, T., Komatsu, Y., Abe, A., Murasawa, A., & Yoshie, H. (2011). Antibody responses to periodontopathic bacteria in relation to rheumatoid arthritis in Japanese adults. *Journal of periodontology*, 82(10), 1433–1441. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110020>

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. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1487742>

Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *BioMed research international*, 2019, 4216060. <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>

Padyukov L. (2022). Genetics of rheumatoid arthritis. *Seminars in immunopathology*, 44(1), 47–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00912-0>

Page, R. C., & Eke, P. I. (2007). Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*, 78(7 Suppl), 1387–1399. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060264>

Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Riley, P. F., & Reynolds, E. C. (2006). Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 8), 2381–2394. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28787-0>

Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., Brammar, G. C., Slakeski, N., & Reynolds, E. C. (2007). Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for *Porphyromonas gingivalis* virulence in the murine periodontitis model. *Infection and immunity*, 75(3), 1436–1442. <https://doi.org/10.1128/IAI.01627-06>

Pianta, A., Arvikar, S., Strle, K., Drouin, E. E., Wang, Q., Costello, C. E., & Steere, A. C. (2017). Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 69(5), 964–975. <https://doi.org/10.1002/art.40003>

Posada-López, A., Botero, J. E., Pineda-Tamayo, R. A., & Agudelo-Suárez, A. A. (2022). The Effect of Periodontal Treatment on Clinical and Biological Indicators, Quality of Life, and Oral Health in Rheumatoid Arthritis Patients: A Quasi-Experimental Study. *International journal of environmental research and public health*, 19(3), 1789. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031789>

Potempa, J., Mydel, P., & Koziel, J. (2017). The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 13(10), 606–620. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.132>

Potempa J, Nguyen KA (2007). Purification and characterization of gingipains. *Curr Protoc Protein Sci*. Chapter 21.

Potempa, J., Sroka, A., Imamura, T., & Travis, J. (2003). Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Current protein & peptide science*, 4(6), 397–407. <https://doi.org/10.2174/1389203033487036>

Potempa, J., Pavloff, N., & Travis, J. (1995)a. *Porphyromonas gingivalis*: a proteinase/gene accounting audit. *Trends in microbiology*, 3(11), 430–434. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)88996-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)88996-9)

Potempa, J., Pike, R., & Travis, J. (1995)b. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infection and immunity*, 63(4), 1176–1182. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1176-1182.1995>

Puszczewicz, M., & Iwaszkiewicz, C. (2011). Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Archives of medical science: AMS*, 7(2), 189–194. <https://doi.org/10.5114/aoms.2011.22067>

Qiao, Y., Wang, Z., Li, Y., Han, Y., Zhou, Y., & Cao, X. (2020). Rheumatoid arthritis risk in periodontitis patients: A systematic review and meta-analysis. *Joint bone spine*, 87(6), 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2020.04.024>

Qin, B., Yang, M., Fu, H., Ma, N., Wei, T., Tang, Q., Hu, Z., Liang, Y., Yang, Z., & Zhong, R. (2015). Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis research & therapy*, 17(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0601-x>

Quirke, A. M., Lugli, E. B., Wegner, N., Hamilton, B. C., Charles, P., Chowdhury, M., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., Potempa, J., Culshaw, S., Guo, Y., Fisher, B. A., Thiele, G., Mikuls, T. R., & Venables, P. J. (2014). Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(1), 263–269. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202726>

Rahajoe, P. S., de Smit, M., Schuurmans, G., Raveling-Eelsing, E., Kertia, N., Vissink, A., & Westra, J. (2020). Increased IgA anti-citrullinated protein antibodies in the periodontal inflammatory exudate of healthy individuals compared to rheumatoid arthritis patients. *Journal of clinical periodontology*, 47(5), 552–560. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13277>

Repeke, C. E., Cardoso, C. R., Claudino, M., Silveira, E. M., Trombone, A. P., Campanelli, A. P., Silva, J. S., Martins, W., Jr, & Garlet, G. P. (2012). Non-inflammatory destructive periodontal disease: a clinical, microbiological, immunological and genetic investigation. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 20(1), 113–121. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000100020>

Richards D. (2014). Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. *Evidence-based dentistry*, 15(3), 70–71. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6401037>

Rodríguez, J., Lafaurie, G. I., Bautista-Molano, W., Chila-Moreno, L., Bello-Gualtero, J. M., & Romero-Sánchez, C. (2021). Adipokines and periodontal markers as risk indicators of early rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Clinical oral investigations*, 25(4), 1685–1695. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03469-0>

Rodríguez, S. B., Stitt, B. L., & Ash, D. E. (2009). Expression of peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* in *Escherichia coli*: enzyme purification

and characterization. *Archives of biochemistry and biophysics*, 488(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.06.010>

Röhner, E., Detert, J., Kolar, P., Hocke, A., N'Guessan, P., Matziolis, G., Kanitz, V., Bernimoulin, J. P., Kielbassa, A., Burmester, G. R., Buttgereit, F., & Pischon, N. (2010). Induced apoptosis of chondrocytes by *Porphyromonas gingivalis* as a possible pathway for cartilage loss in rheumatoid arthritis. *Calcified tissue international*, 87(4), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9389-5>

Romero-Sánchez, C., Rodríguez, C., Santos-Moreno, P., Mesa, A. M., Lafaurie, G. I., Giraldo-Q, S., De-Avila, J., Castillo, D. M., Duran, M., Chalem, P. C., Bello Gualtero, J. M., & Valle-Oñate, R. (2017). Is the Treatment with Biological or Non-biological DMARDs a Modifier of Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis?. *Current rheumatology reviews*, 13(2), 139–151. <https://doi.org/10.2174/1573397113666170407161520>

Rovas, A., Puriene, A., Puceviciene, E., Butrimiene, I., Stuopelyte, K., & Jarmalaite, S. (2021). Associations of periodontal status in periodontitis and rheumatoid arthritis patients. *Journal of periodontal & implant science*, 51(2), 124–134. <https://doi.org/10.5051/jpis.2006060303>

Sato, K., Takahashi, N., Kato, T., Matsuda, Y., Yokoji, M., Yamada, M., Nakajima, T., Kondo, N., Endo, N., Yamamoto, R., Noiri, Y., Ohno, H., & Yamazaki, K. (2017). Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Scientific reports*, 7(1), 6955. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07196-7>

Schenkein, H. A., Bradley, J. L., & Purkall, D. B. (2013). Anticardiolipin in *Porphyromonas gingivalis* antisera causes fetal loss in mice. *Journal of dental research*, 92(9), 814–818. <https://doi.org/10.1177/0022034513497959>

Schmalz, G., Noack, S., Patschan, S., Patschan, D., Müller, G. A., Rupprecht, A., Schmickler, J., Haak, R., & Ziebolz, D. (2020). Disease activity, morning stiffness and missing teeth are associated with oral health-related quality of life in individuals with rheumatoid arthritis. *Clinical oral investigations*, 24(10), 3559–3566. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03226-3>

Schmickler, J., Rupprecht, A., Patschan, S., Patschan, D., Müller, G. A., Haak, R., Mausberg, R. F., Schmalz, G., Kottmann, T., & Ziebolz, D. (2017). Cross-Sectional

Evaluation of Periodontal Status and Microbiologic and Rheumatoid Parameters in a Large Cohort of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Journal of periodontology*, 88(4), 368–379. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160355>

Seers, C. A., Mahmud, A., Huq, N. L., Cross, K. J., & Reynolds, E. C. (2020). *Porphyromonas gingivalis* laboratory strains and clinical isolates exhibit different distribution of cell surface and secreted gingipains. *Journal of oral microbiology*, 13(1), 1858001. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1858001>

Serrano, C., & Suarez, E. (2019). Prevalence of Severe Periodontitis in a Colombian Adult Population. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 21(2), 53–62.

Shimada, A., Kobayashi, T., Ito, S., Okada, M., Murasawa, A., Nakazono, K., & Yoshie, H. (2016). Expression of anti-*Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Journal of periodontal research*, 51(1), 103–111. <https://doi.org/10.1111/jre.12288>

Sippert, E. Â., de Oliveira e Silva, C., Ayo, C. M., Marques, S. B., Visentainer, J. E., & Sell, A. M. (2015). HLA Haplotypes and Genotypes Frequencies in Brazilian Chronic Periodontitis Patients. *Mediators of inflammation*, 2015, 481656. <https://doi.org/10.1155/2015/481656>

Slots J. (1987). Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescence assay for trypsin-like activity. *Oral microbiology and immunology*, 2(3), 139–141. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1987.tb00279.x>

Slots, J., Bragd, L., Wikström, M., & Dahlén, G. (1986). The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *Journal of clinical periodontology*, 13(6), 570–577. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1986.tb00849.x>

Smalley, J. W., & Olczak, T. (2017). Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. *Molecular oral microbiology*, 32(1), 1–23. <https://doi.org/10.1111/omi.12149>

Smolen, J. S., Aletaha, D., & McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet* (London, England), 388(10055), 2023–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)

Stobernack, T., Glasner, C., Junker, S., Gabarrini, G., de Smit, M., de Jong, A., Otto, A., Becher, D., van Winkelhoff, A. J., & van Dijk, J. M. (2016). Extracellular Proteome and Citrullinome of the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of proteome research*, 15(12), 4532–4543. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00634>

Structural Genomics Consortium, China Structural Genomics Consortium, Northeast Structural Genomics Consortium, Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., ... Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>

Sun, J., Zheng, Y., Bian, X., Ge, H., Wang, J., & Zhang, Z. (2021). Non-surgical periodontal treatment improves rheumatoid arthritis disease activity: a meta-analysis. *Clinical oral investigations*, 25(8), 4975–4985. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03807-w>

ThermoFisher. (2020). One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli. [online] Available at: <https://www.thermoFisher.com/order/catalog/product/C404003?SID=srch-srp-C404003#/C404003?SID=srch-srp-C404003> [Accessed 7 Mar. 2020].

Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B., & Løe, H. (1966). Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *Journal of periodontal research*, 1, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01842.x>

Unriza-Puin, S., Bautista-Molano, W., Lafaurie, G. I., Valle-Oñate, R., Chalem, P., Chila-Moreno, L., Bello-Gualtero, J. M., & Romero-Sánchez, C. (2017). Are obesity, ACPAs and periodontitis conditions that influence the risk of developing rheumatoid arthritis in first-degree relatives?. *Clinical rheumatology*, 36(4), 799–806. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3519-z>

Uhlig, T., Hagen, K. B., & Kvien, T. K. (1999). Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 26(1), 47–54.

Usui, M., Onizuka, S., Sato, T., Kokabu, S., Ariyoshi, W., & Nakashima, K. (2021). Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. *The Japanese dental science review*, 57, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.005>

Veillard, F., Potempa, B., Guo, Y., Ksiazek, M., Sztukowska, M. N., Houston, J. A., Koneru, L., Nguyen, K. A., & Potempa, J. (2015). Purification and characterisation of recombinant His-tagged RgpB gingipain from *Porphyromonas gingivalis*. *Biological chemistry*, 396(4), 377–384. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0304>

Vermilyea, D. M., Moradali, M. F., Kim, H. M., & Davey, M. E. (2021). PPAD Activity Promotes Outer Membrane Vesicle Biogenesis and Surface Translocation by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of bacteriology*, 203(4), e00343-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00343-20>

Vermilyea, D. M., Ottenberg, G. K., & Davey, M. E. (2019). Citrullination mediated by PPAD constrains biofilm formation in *P. gingivalis* strain 381. *NPJ biofilms and microbiomes*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0081-x>

Vidal, J., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., Navarro-García, F. (2007) Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*. 2007;49(5), 376-386.

Vossenaar, E. R., Radstake, T. R., van der Heijden, A., van Mansum, M. A., Dieteren, C., de Rooij, D. J., Barrera, P., Zendman, A. J., & van Venrooij, W. J. (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(4), 373–381. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.012211>

Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K. A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., & Venables, P. J. (2010). Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 62(9), 2662–2672. <https://doi.org/10.1002/art.27552>

Wilensky, A., Polak, D., Houry-Haddad, Y., & Shapira, L. (2013). The role of RgpA in the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* in the murine periodontitis model. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(10), 924–932. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12139>

Wingrove, J. A., DiScipio, R. G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J., & Hugli, T. E. (1992). Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *The Journal of biological chemistry*, 267(26), 18902–18907.

Witalison, E. E., Thompson, P. R., & Hofseth, L. J. (2015). Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation. *Current drug targets*, 16(7), 700–710. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150202160954>

Wirth, R., Pap, B., Maróti, G., Vályi, P., Komlósi, L., Barta, N., Strang, O., Minárovits, J., & Kovács, K. L. (2021). Toward Personalized Oral Diagnosis: Distinct Microbiome Clusters in Periodontitis Biofilms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 747814. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.747814>

Xiao, L., Zhang, Q., Peng, Y., Wang, D., & Liu, Y. (2020). The effect of periodontal bacteria infection on incidence and prognosis of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 99(15), e19698. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000019698>

Xie H. (2015). Biogenesis and function of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Future microbiology*, 10(9), 1517–1527. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.63>

Xu, H., Zhao, H., Fan, D., Liu, M., Cao, J., Xia, Y., Ju, D., Xiao, C., & Guan, Q. (2020). Interactions between Gut Microbiota and Immunomodulatory Cells in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of inflammation*, 2020, 1430605. <https://doi.org/10.1155/2020/1430605>

Yamakawa, M., Ouhara, K., Kajiya, M., Munenaga, S., Kittaka, M., Yamasaki, S., Takeda, K., Takeshita, K., Mizuno, N., Fujita, T., Sugiyama, E., & Kurihara, H. (2016). *Porphyromonas gingivalis* infection exacerbates the onset of rheumatoid arthritis in SKG mice. *Clinical and experimental immunology*, 186(2), 177–189. <https://doi.org/10.1111/cei.12847>

Yuzhalin A. E. (2019). Citrullination in Cancer. *Cancer research*, 79(7), 1274–1284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2797>

Zhou, N., Zou, F., Cheng, X., Huang, Y., Zou, H., Niu, Q., Qiu, Y., Shan, F., Luo, A., Teng, W., & Sun, J. (2021). *Porphyromonas gingivalis* induces periodontitis, causes immune imbalance, and promotes rheumatoid arthritis. *Journal of leukocyte biology*, 110(3), 461–473. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0121-045R>

Zhou, X. Y., Gao, J. L., Hunter, N., Potempa, J., & Nguyen, K. A. (2013). Sequence-independent processing site of the C-terminal domain (CTD) influences maturation of the RgpB protease from *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular microbiology*, 89(5), 903–917. <https://doi.org/10.1111/mmi.12319>