

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN PERIODONCIA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
“ESPECIALISTA EN PERIODONCIA”**

**“CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PRODUCTOS FINALES DE LA
GLICACIÓN AVANZADA (AGEs) EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE Y PERIODONTITIS”**

San Luis Potosí, S. L. P., a 24 de mayo del 2022.



CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PRODUCTOS
FINALES DE LA GLICACIÓN AVANZADA
(AGEs) EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE Y PERIODONTITIS by Lía
Eunice Martínez Martínez is licensed
under a [Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial-
SinObraDerivada 4.0 Internacional
License](#).

RESUMEN

Introducción: Existen reportes demostrando relación entre periodontitis (PE) y artritis reumatoide (AR). Se ha descrito una similitud en el patrón cíclico de destrucción asociado con altos niveles de citocinas proinflamatorias y, se ha apoyado la idea, de que la inflamación pudiera ser el enlace principal entre ambas enfermedades. En la AR, la inflamación crónica, representada por la acumulación de AGEs, se relaciona con el aumento de la actividad de la enfermedad y representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En la PE, se ha propuesto que los AGEs pueden promover el incremento de producción de ROS e inflamación por interacción con sus receptores, con la subsecuente inducción de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas, conduciendo a la pérdida ósea. Debido a la evidencia ya reportada de la relación que existe entre AR y PE, y a que no hay estudios que reporten los niveles séricos de AGEs en pacientes con AR/PE, sería importante conocer si la PE pudiera tener influencia en la concentración de AGEs en pacientes con AR y, por lo tanto, en el desarrollo de sus complicaciones.

Objetivo(s): Comparar por medio de la técnica de ELISA la concentración sérica de AGEs en pacientes sanos, con PE, AR y AR/PE.

Metodología: Se realizó un estudio transversal, analítico, retrolectivo, con un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se seleccionaron 80 muestras de sangre periférica, provenientes de pacientes sanos, con PE, con AR y AR/PE divididas en 4 grupos por igual, de las cuales se detectó la concentración de AGEs mediante la técnica de ELISA.

Resultados: Los niveles de AGEs se encontraron elevados en los grupos de PE, AR y AR/PE comparados con los sujetos sanos, existiendo diferencia estadísticamente significativa con el grupo de AR/PE. Existe una tendencia a aumentar la mediana en los niveles de AGEs cuando los grupos presentan tanto PE como AR.

Conclusiones: Existe una diferencia en la concentración sérica de AGEs entre los grupos de estudio, observándose niveles elevados tanto en el grupo de PE como de AR y una tendencia al aumento cuando se presentan ambas enfermedades.

ABREVIATURAS

- **AGEs** Productos finales de la glicación avanzada
- **Anti-CCP** Anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado
- **AR** Artritis reumatoide
- **CAL** Pérdida de inserción clínica
- **DAMP** Patrones moleculares asociados al daño
- **EGAs** Aductos tempranos de glicación (Early glycation adduct)
- **ELISA** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- **HbA1c** Hemoglobina glucosilada
- **IL** Interleucina
- **FR** Factor reumatoide
- **HPR** Peroxidasa de rábano picante
- **LDL** Lipoproteína de baja densidad
- **LPS** Lipopolisacárido
- **MEC** Matriz extracelular
- **MMPs** Metaloproteinasas de la matriz
- **NET** Trampas extracelulares de neutrófilos
- **NF- κ B** Factor nuclear κ B
- **OD** Densidad óptica
- ***P. gingivalis*** *Porphyromonas gingivalis*
- **PAD** Peptidil Arginina Deiminasa
- **PAMP** Patrones moleculares asociados a patógenos
- **PBS** Tampón fosfato salino/ buffer fosfato salino

- **PG** Prostaglandinas
- **PE** Periodontitis
- **RAGE** Receptor para AGE
- **RANKL** Ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$
- **ROS** Especies reactivas de oxígeno
- **sVCAM-1** Molécula de adhesión de células vasculares solubles-1
- **TM** Trombomodulina
- **TNF- α** Factor de necrosis tumoral- α
- **UAC** Unión amelo cementaria
- **VCAM-1** Molécula de adhesión de células vasculares-1
- **vWF** Factor von Willebrand

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Periodontitis	1
1.1.1 Fisiopatología de la periodontitis	2
1.1.2 Relación de la periodontitis con condiciones sistémicas	3
1.2 Artritis reumatoide	4
1.2.1 Fisiopatología	5
1.2.2 Complicaciones	6
1.3 Relación entre periodontitis y artritis reumatoide	7
1.4 Productos finales de la glicación avanzada	10
1.4.1 Efectos de los AGEs	13
1.4.2 AGEs y periodontitis	14
1.4.3 AGEs y artritis reumatoide	16
1.5 Relación de AGEs con artritis reumatoide y periodontitis	17
1.6 Justificación	18
1.7 Pregunta de investigación	19
1.8 Hipótesis	19
1.9 Objetivos	19
1.9.1 Objetivo general	19
1.9.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Lugar de realización y recolección de datos	20
2.2 Diseño del estudio	20
2.3 Muestreo	20
2.4 Tamaño de la muestra	20
2.5 Grupos de estudio	21
2.6 Criterios de selección	21
2.6.1 Criterios de selección de muestras	21
2.6.1.1 Criterios de inclusión	21
2.6.1.2 Criterios de no inclusión	21
2.6.1.3 Criterios de eliminación	21
2.6.2 Criterios de selección de sujetos	22
2.6.2.1 Criterios de inclusión	22
2.6.2.2 Criterios de no inclusión	22
2.6.2.3 Criterios de eliminación	22
2.7 Descripción conceptual y operacional de las variables	22
2.7.1 Variables independientes	22
2.7.2 Variables dependientes	23

2.8 Plan de trabajo.....	24
2.8.1 Aprobación por el Comité de Ética en Investigación	24
2.8.2 Actividades previas.....	25
2.8.3 Selección de muestras.....	26
2.8.4 Medición de la concentración de AGEs.....	27
2.9 Análisis estadístico.....	28
2.10 Consideraciones éticas.....	28
2.11 Financiamiento.....	29
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	30
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	35
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	45
ANEXOS.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	51

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Edad, sexo y tiempo de diagnóstico de AR en los grupos de estudio.	p. 31
Tabla 2.	Profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica en los grupos de estudio.	p. 32
Tabla 3.	Presencia y concentración sérica de AGEs en los grupos de estudio.	p. 33
Figura 1.	Correlación entre los niveles séricos de AGEs con la edad en el grupo de sanos.	p. 34
Figura 2.	Correlación entre los niveles séricos de AGEs con la profundidad al sondaje en el grupo de AR/PE.	p. 34
Figura 3.	Correlación entre los niveles séricos de AGEs con el nivel de inserción clínica en el grupo de AR/PE.	p. 34

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 PERIODONTITIS

La periodontitis (PE) es una enfermedad caracterizada por inflamación mediada por el hospedero asociada a microbios, la que conlleva a la pérdida de inserción periodontal, resultando en la destrucción de los tejidos de soporte del diente (encía, cemento, ligamento periodontal y hueso) (1). Es una enfermedad multifactorial y se ha asociado con un gran número de especies bacterianas Gramnegativas (2).

Se ha descrito como una de las enfermedades orales más comunes con una prevalencia del 80% - 90% (3) y se ha reportado que aproximadamente 47% de los adultos mayores de 30 años la padecen (4). Según la anterior clasificación de las enfermedades periodontales (World Workshop 1999) su forma crónica comienza alrededor de la tercera década de la vida y su forma agresiva aparece en pacientes jóvenes (5).

En cuanto a su etiología se conoce que es multifactorial, pues se han involucrado factores ambientales, genéticos, microbiológicos e inmunológicos que provocan que los cambios del microbioma disbiótico sean más probables para algunos pacientes que para otros y que esto probablemente influya en la gravedad de la enfermedad para ciertos individuos (1). Además, está bien establecido que, aunque las bacterias periodontales son necesarias para el inicio de la enfermedad, no son suficientes para causar la progresión de esta a menos que haya una respuesta inflamatoria asociada dentro de un huésped susceptible (6,7).

Como características clínicas de la PE se presentan sangrado gingival al sondaje, aumento de la profundidad al sondaje debido a la migración apical del epitelio de unión, pérdida ósea, incremento de la movilidad dental y, en última instancia, la

pérdida de dientes si la actividad de la enfermedad continúa (8). Además, los sujetos afectados pueden presentar diastemas y zonas de supuración (9).

En el World Workshop del 2017, se ha sugerido que un paciente es un caso de PE en el contexto de la atención clínica si (1):

1. La pérdida de inserción clínica (CAL) interdental es detectable en ≥ 2 dientes no adyacentes, o
2. Si la CAL vestibular o lingual ≥ 3 mm con profundidad al sondaje > 3 mm es detectable en ≥ 2 dientes

1.1.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA PERIODONTITIS

La fisiopatología de esta enfermedad se caracteriza por sus vías moleculares clave que conducen a la activación de proteinasas derivadas del hospedero ocasionando pérdida de fibras del ligamento periodontal, migración apical del epitelio de unión y la propagación apical del biofilm bacteriano a lo largo de la superficie radicular. Conforme la biopelícula madura y prolifera, los compuestos solubles, producto de las bacterias patógenas, penetran en el epitelio del surco. Estos compuestos estimulan a las células del huésped para que produzcan los mediadores químicos de la inflamación (IL-1, prostaglandinas, TNF- α y MMPs), los cuales reclutan neutrófilos por quimiotaxis ocasionando que la permeabilidad de los vasos sanguíneos gingivales aumente, y permitiendo así la migración de las proteínas del plasma. El proceso inflamatorio de la encía continúa, y las células T y monocitos son reclutados a la zona. Como respuesta al proceso inflamatorio crónico, citoquinas proinflamatorias se producen en los tejidos, lo que resulta en la descomposición del colágeno gingival y acumulación de un infiltrado inflamatorio, llevando a los signos clínicos de la gingivitis. Si el control de la biopelícula de la placa dental no es llevado a cabo para revertir la gingivitis, el proceso inflamatorio continuará y dará lugar a la descomposición del colágeno en el ligamento periodontal y reabsorción del hueso alveolar, ocasionando una progresión de gingivitis a PE (10,11).

1.1.2 RELACIÓN DE PERIODONTITIS CON CONDICIONES SISTÉMICAS

Se ha descrito que la PE puede ejercer influencia en el inicio y/o progresión de diversas enfermedades sistémicas (12), ya que los patógenos periodontales pueden mediar la inflamación en los tejidos locales a través de factores de virulencia y tanto éstos como los mediadores inflamatorios pueden entrar en la circulación sanguínea y afectar a órganos distantes (13).

Actualmente existen 2 mecanismos para apoyar el vínculo entre PE y enfermedades sistémicas:

- 1) Infección metastásica y diseminación de toxinas bacterianas: caracterizada por la propagación sistémica de bacterias y/o productos bacterianos de origen oral. El resultado de la bacteriemia puede provenir de la perturbación de tejidos periodontales ulcerados mediante actividades cotidianas como son el cepillado dental, la masticación, el examen oral, tratamientos dentales, así como por la formación de bolsas ulceradas presentes en la PE, generando con esto la diseminación de bacterias, sus productos y toxinas como LPS. Las bacterias orales tienen la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo y de adherirse a sitios no orales, resultando en un evento de enfermedad sistémica (14).
- 2) Lesiones inmunológicas e inflamación: sugiere que el daño sistémico es consecuencia de una cascada inflamatoria con inicio en cavidad oral. Cuando los leucocitos y células endoteliales reconocen los factores de virulencia bacteriana, secretan mediadores proinflamatorios como citocinas y quimiocinas. Con la exposición continua de antígenos solubles, se forman y depositan complejos inmunes con la ayuda de anticuerpos circulantes para amplificar aún más la inflamación sistémica. Las células inmunes, producen más citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF- α , IL-6 e IL-1 β , las cuales se asocian con la destrucción de tejidos y la osteoclastogénesis. Bajo esta influencia, prostaglandinas (PG) son liberadas del periodonto enfermo para estimular la reabsorción ósea local, desempeñando un papel en la

inflamación sistémica, la agregación plaquetaria y la activación de las células endoteliales (15,16).

Es así como a la PE se le ha asociado a condiciones o enfermedades sistémicas como son parto pretérmino, deterioro cognitivo, cáncer de colon, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares (ateroesclerosis o infarto agudo al miocardio), trastornos respiratorios y, recientemente, artritis reumatoide (AR) (12,16,17).

1.2 ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica y destructiva que se caracteriza por la acumulación y persistencia de infiltrado inflamatorio en la membrana sinovial, conduciendo a sinovitis y destrucción irreversible de la arquitectura articular, con el consiguiente deterioro de la función (8,18).

Se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, siendo las mujeres 2-5 veces más propensas a desarrollar la enfermedad (19) con un pico de edad de aparición en la quinta década de vida (20). Tiene una prevalencia a nivel mundial del 0.5-1%, la cual incrementa con la edad, pudiendo llegar hasta un 2% (21,22). En México, la AR afecta aproximadamente de 700,000 a 1 millón de personas (1.6% de la población en general), con una prevalencia del 0.4-2.8% (23), siendo el principal motivo de consulta en el Servicio de Reumatología (24).

Su etiología es desconocida; sin embargo, factores ambientales, genéticos e inmunológicos juegan un rol en su patogénesis. Algunos estudios han sugerido que un agente infeccioso en un huésped susceptible o con predisposición genética puede ser el factor desencadenante (2); entre estos agentes infecciosos se ha destacado a las bacterias periodontales (25). De esta forma, la PE pudiera ser un desencadenante ambiental de esta enfermedad reumatológica (26).

En términos generales el diagnóstico de la AR se basa, principalmente, en los nuevos criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología 2010 / Liga

Europea contra el Reumatismo (27), los cuales se fundamentan en hallazgos clínicos, radiológicos y de laboratorio. La aplicación de estos criterios solamente se lleva a cabo cuando la población afectada cuenta con ciertas características: 1) que presente por lo menos una articulación con sinovitis clínica (inflamación); y 2) que dicha inflamación no se explique por alguna otra enfermedad. Se debe tener un total igual o superior a 6 en el sistema de puntuación para la clasificación de un paciente de AR definida. Este sistema considera la distribución de la afectación articular, la serología del factor reumatoide (FR) y/o Anti-CCP, aumento de los reactantes de fase aguda y la duración igual o superior a 6 semanas (28).

1.2.1 FISIOPATOLOGÍA

En la AR, los factores de riesgo genéticos y ambientales interactúan causando cambios en el sistema inmunológico ocasionando que el proceso inflamatorio se desencadene (29).

La destrucción de los tejidos blandos y duros en la AR es el resultado de la presencia de un gran número de citoquinas y otras moléculas efectoras que son liberadas por las células residentes y migratorias. Estos mediadores de la inflamación inducen la degradación del colágeno y proteoglicanos. La producción de la PGE₂ (metabolito del ácido araquidónico), así como la liberación de enzimas asociadas a neutrófilos como la elastasa neutrofílica y la β -glucuronidasa, junto con la secreción de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) por los macrófagos y sinoviocitos, contribuyen a la patogénesis de la AR (25).

Los principales síntomas de la AR son el resultado de la inflamación de las articulaciones, siendo el dolor el síntoma dominante y de variación diurna generalmente. En esta enfermedad las articulaciones se encuentran inflamadas, sensibles, con dificultad de movimiento, y por lo regular tienen rigidez matutina prolongada la cual puede durar de 30 minutos hasta varias horas (29).

Dentro de las principales características clínicas se encuentran la tumefacción y la

deformación de las articulaciones. Las articulaciones más comúnmente afectadas son las de manos, muñecas y pies; sin embargo, también puede haber manifestaciones extra-articulares en los sistemas pulmonar, ocular y vascular (25) como resultado de la microvasculitis, lo cual conduce a la formación de nódulos, efusiones pleurales, fibrosis pulmonar, enfermedad cardíaca y ocular (8).

1.2.2 COMPLICACIONES

Se ha reportado que la AR está asociada con un exceso de morbilidad y mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares, siendo comparable el riesgo de desarrollarlas con el de los pacientes diabéticos (30). Así mismo, se ha informado que los pacientes con AR son 2 a 5 veces más propensos a la morbilidad y mortalidad cardiovascular en comparación con la población en general, y la enfermedad cardiovascular contribuye entre un tercio y la mitad sus muertes prematuras (31).

Según Del Rincón IC et al., uno de los factores de riesgo no tradicionales involucrados en esta asociación es la inflamación crónica (32) al acelerar la formación de la placa aterosclerótica. La inflamación resulta en activación endotelial y disfunción, que se consideran los primeros pasos en el proceso que finalmente resulta en aterosclerosis. La activación celular endotelial se caracteriza por la regulación y liberación de moléculas de adhesión como el Factor von Willebrand (vWF), la molécula de adhesión de células vasculares solubles-1 (sVCAM-1) y la trombomodulina (TM), y es seguida por una fase disfunción celular endotelial en la cual ocurre la entrada de células inflamatorias en la intimidad de la pared vascular y el movimiento de las células musculares lisas fuera de la túnica media a la íntima. Las células mononucleares absorben lipoproteínas, como lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidado, para formar células espumosas. Todo este proceso conduce a una mayor "rigidez" de la pared arterial (30).

La presencia de esta inflamación crónica mencionada puede originar la producción de moléculas llamadas Productos Finales de la Glicación Avanzada (AGEs, por sus

siglas en inglés), cuyo aumento está correlacionado con enfermedades cardiovasculares en pacientes con AR (33).

1.3 RELACIÓN ENTRE PERIODONTITIS Y ARTRITIS REUMATOIDE

Evidencia reportada en la literatura ha demostrado que la PE y la AR se asocian entre sí y comparten similitudes tanto en su fisiopatogenia como en sus características clínicas debido a factores de riesgo genéticos y ambientales que presentan en común (34).

Como se describió anteriormente, la PE y la AR son caracterizadas por una inflamación severa de sus respectivos tejidos compartiendo diversos mecanismos inflamatorios. Ambas enfermedades crónicas presentan un perfil inmunopatogénico similar, con activación de células inmunes, producción de mediadores inflamatorios como interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) y MMPs, dando como resultado el daño tisular (17). Así mismo, existe similitud en su patrón cíclico de destrucción asociado con altos niveles de citoquinas proinflamatorias, los cuales pueden persistir después de la eliminación del estímulo antigénico (35).

Estudios han demostrado que los pacientes con PE tienen una mayor prevalencia de AR que los pacientes que no padecen esta enfermedad oral (36,37). Paul Dev y cols. estudiaron la relación entre PE y AR en 1520 pacientes, y encontraron que sujetos con PE tenían una mayor prevalencia de AR (4.4%), versus la prevalencia del 1% en población con periodonto sano, sugiriendo los autores un posible vínculo entre las manifestaciones de estas dos enfermedades inflamatorias crónicas. Los autores concluyeron que los pacientes con PE moderada-severa tenían mayor riesgo de padecer esta enfermedad reumatológica (37).

Por otro lado, también se ha descrito que los pacientes con AR son más susceptibles al desarrollo de PE (38,39,40,41,42,43), y que esta enfermedad oral se relaciona con el aumento de la actividad de la AR (44). Una revisión reciente con

metaanálisis reportó que el riesgo de PE en la AR versus controles es de 1.13 ($p=0.006$), demostrando una asociación significativa entre ambas enfermedades (45).

Schmickler y cols. en el 2017, de su estudio en el que incluyeron un grupo de 336 sujetos (168 con AR y 168 sin AR), reportaron que el 98% de los pacientes con AR presentaba PE moderada-severa con valores significativos (profundidad de sondaje y pérdida de inserción de 3-6 mm y >6 mm, $p<0.01$) en comparación con los controles. Los autores concluyeron que los pacientes con AR tenían peores condiciones periodontales versus individuos sanos y sugirieron que debían ser derivados de forma rutinaria al periodoncista (41).

Äyräväinen y cols. realizaron un estudio prospectivo donde incluyeron a sujetos con AR temprana (ARt), AR crónica (ARc) y controles con seguimiento en un período comprendido desde 2005 al 2014. Los autores concluyeron que la PE moderada fue más frecuente en pacientes con AR comparados con los controles; e indicaron que una peor salud periodontal para los grupos de ARt y ARc podría deberse a una defensa inmune deficiente en el huésped debido a la propia AR y a que el aumento en la inflamación sistémica podría iniciar o incrementar la gravedad de la PE (46).

Además de esto, se han realizado también estudios de casos y controles para observar si el tratamiento periodontal tiene influencia en la AR. Khare y cols. estudiaron el efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico en 60 pacientes con diagnóstico confirmado de AR y PE crónica generalizada. Observaron una mejora significativa en el Índice de Higiene Oral Simplificado, Índice Gingival y Sangrado al sondaje ($p<0.0001$), reducción de la profundidad al sondaje ($p<0.0001$) y ganancia en nivel de inserción clínica (<0.0171) a los 3 meses en el grupo que había recibido tratamiento periodontal no quirúrgico. De acuerdo con estos autores, el tratamiento periodontal no quirúrgico contribuye a reducir los signos y síntomas de la AR (47). De igual forma, Shimada et al. concluyeron que existe una mejoría en las condiciones periodontales y en la actividad de la AR ($p<0.05$) cuando a los pacientes

se les indica instrucciones de higiene oral y se les realiza remoción de cálculo supragingival (34).

Para intentar explicar esta relación reportada entre ambas enfermedades se han descrito algunos posibles mecanismos.

Uno de ellos se relaciona con la presencia de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (un bacilo gram negativo anaerobio), y con la citrulinación de péptidos que contienen arginina. En respuesta a este periodontopatógeno, se ha sugerido que los neutrófilos son capaces de liberar trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que son estructuras caracterizadas por proteasas activas y por Peptidil Arginina Deiminasa (PAD), la cual es capaz de producir la citrulinación de proteínas y, en consecuencia, generar la aparición de anticuerpos anti-péptidos citrulinados (ACPA/anti-CCP) (característicos de la AR). La producción de estos anticuerpos se acelera también por la acción sinérgica de la enzima PAD de *P. gingivalis*, siendo el único patógeno conocido con capacidad de expresarla (34). Se ha demostrado que niveles de anticuerpos contra este periodontopatógeno se correlacionan con los niveles de anticuerpos anti-CCP, lo que genera que *P. gingivalis* sea un desencadenante ambiental en el desarrollo de AR (43). Además, se ha descrito que la inflamación sinovial puede favorecer la captura de DNA bacteriano oral generando un efecto perpetuo de los patógenos orales (49).

Más recientemente, también se ha sugerido el papel de *Aggregatibacter actinomucetemcomitans*, el cual mediante la secreción de su leucotoxina A podría inducir hipercitrulinación a nivel de neutrófilos cambiando su morfología, imitando así la formación de trampas extracelulares, y dando como resultado a liberación de autoantígenos hipercitrulinizados, desencadenando una respuesta autoinmune en pacientes con AR (50).

También se ha descrito que los neutrófilos que son atraídos a la zona del surco gingival sufren necrosis, liberando patrones moleculares asociados al daño (DAMP),

los cuales pueden acelerar tanto la inflamación local como sistémica. Otro posible mecanismo de esta reacción es debido a que los factores de virulencia expresados por *P. gingivalis* son reconocidos por los receptores tipo Toll, lo que conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias que activan el sistema de complemento, el activador del receptor para las vías de señalización del ligando del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) y la diferenciación de las células T helper, que contribuyen a la osteoclastogénesis (34).

Como se ha descrito, este vínculo entre PE y AR es el resultado de factores y procesos biológicos similares que pueden representar vínculos directos entre estas dos afecciones. Se ha apoyado la idea de que estas enfermedades están interrelacionadas y que la inflamación pudiera ser el enlace principal entre ellas (51). En relación a esto, recientemente se han estudiado en cada una de estas enfermedades las moléculas inflamatorias derivadas de la oxidación de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, llamadas AGEs. Estas moléculas han sido descritas de forma independiente en cada enfermedad teniendo evidencia de que existe una implicación tanto en su desarrollo como en su curso.

1.4 PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN AVANZADA (AGEs)

En 1912 Louis Camille Maillard describió la reacción química que ocurre entre proteínas y azúcares reductores, y que da por resultado la formación de los AGEs, los cuales alteran la estructura y función de moléculas e incrementan el estrés oxidativo en los sistemas biológicos (52).

De manera general, el término AGEs, hace referencia a productos terminales no-reactivos como CML (3,4-Ne-carboximetil-lisina), aunque también incluye a intermediarios o precursores de AGEs como 3DG (3-deoxiglucosona), o MG (metil-glioxal) y sus derivados. Entre los azúcares presentes naturalmente, la glucosa presenta la tasa de glicación más lenta, mientras que azúcares intracelulares como fructosa, treosa, glucosa-6-fosfato y gliceraldehído3-fosfato, forman AGEs de forma mucho más rápida. La glicación corresponde a una glicación no-enzimática de

proteínas, que causa cambios cuantitativos y cualitativos en los componentes de matriz extracelular lo cual puede afectar la adhesión celular, crecimiento y producción de ésta. Este proceso contribuye a la modificación post-traducciona de proteínas (53).

Su formación ocurre a través de una serie de reacciones químicas. En la primera de ellas, el grupo carbonilo de una cetona o aldehído de un azúcar reductor, se une a un aminoácido libre (principalmente lisina y arginina) de una proteína, lípido o DNA, de una manera no-enzimática para formar una base de Schiff. Los aductos tempranos de glicación (Early glycation adducts, EGAs) corresponden a estos productos iniciales (bases de Schiff y productos de Amadori, o fructosaminas). El inicio de la transformación de EGAs a AGEs depende de la concentración de glucosa y tiene lugar dentro de unas pocas horas. Si la concentración de glucosa disminuye, la reacción es aún reversible. Sin embargo, si la reacción sigue su curso, la base de Schiff sufre un reordenamiento químico y forma los llamados productos de Amadori o fructosamina, en un período de días (54). Los productos de Amadori, como la HbA1c (Hemoglobina glucosilada), son más estables que las bases de Schiff, pero aún en este punto la reacción es parcialmente reversible. Si estas reacciones se continúan desarrollando y la hiperglicemia persiste, se llegará a una acumulación de productos de Amadori, y formarán proteínas entrecruzadas. Posteriormente, se forman los dicarbonilos oxidantes glioxal y 3-deoxiglucosona. En esta fase ocurren varias reacciones de glico-oxidación proteica, todas ellas tendientes a formar productos de glicación. Este proceso se desarrolla a lo largo de semanas, e incluso meses, y es irreversible. Sin embargo, a pesar de la lentitud de la formación de estas estructuras, su formación puede ser catalizada por la presencia de estrés oxidativo, la auto-oxidación de la glucosa, la peroxidación lipídica, la presencia de iones metálicos y otros catalizadores, los cuales pueden aumentar sustancialmente la formación post-Amadori de AGEs. La fase final en la formación de AGEs comienza con la unión de la pirralina y de la N-carboximetil-lisina con una segunda proteína, formando estructuras conocidas como puentes DOLD y GOLD, los cuales alteran irreversiblemente las estructuras terciarias y

cuaternarias de las proteínas. Los AGEs son muy estables a fuerzas mecánicas y degradación proteolítica, debido a las estructuras entrecruzadas que se forman durante la glicación y a que se acumulan dentro y fuera de las células e interfieren con la función de las proteínas. Esta glicación de proteínas se acompaña de un incremento en la actividad de los radicales libres (53).

Entre los tipos de AGEs más estudiados se encuentran la pentosidina, Nε-Carboximetil-lisina (CML) y metilglioxal (MG). CML y pentosidina son los AGEs que más comúnmente se forman tanto in vitro como in vivo, particularmente CML. Ambos se describen como productos de glicoxidación, pues para su formación a partir de glucosa se requieren condiciones de glicación y de oxidación. Estos productos de glicoxidación son los únicos AGEs que se sabe se acumulan en las proteínas tisulares con la edad. CML representa el AGE in vivo más prevalente; el mecanismo para que se forme incluye la degradación oxidativa de los productos de Amadori o la adición directa de glioxal a la lisina y, parece ser, el epítipo principal de los anticuerpos anti-AGE policlonales de uso común. La pentosidina representa menos del 1% de los AGEs encontrados in vivo y es un producto de entrecruzamiento entre lisina y arginina, el cual forma enlaces cruzados proteína-proteína. Los compuestos de dicarbonilo como el 3-desoxiglucosoma, el metilglioxal y el glioxal derivan de la degradación oxidativa o la autooxidación de los productos de Amadori y otras vías. Estos compuestos de dicarbonilo son moléculas muy reactivas que conducen a enlaces cruzados de proteínas (55).

Los AGEs pueden ser medidos y detectados por el uso de anticuerpos a través de diversos métodos. Los métodos de fluorescencia se utilizan generalmente para la medición de AGEs en piel; sin embargo, estos métodos se encuentran limitados debido a que no todos los AGEs emiten fluorescencia.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica analítica que combina el poder de separación del HPLC con la selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa.

Proporciona una sensibilidad y especificidad excepcional para la detección y cuantificación de AGEs específicos; sin embargo, para este análisis altamente especializado existe una necesidad de personal altamente calificado y elevado costo operativo (de equipo), por lo que esta técnica tiene dificultad en el uso generalizado (56).

ELISA es una técnica analítica clásica utilizada para la cuantificación de péptidos. Entre sus ventajas se encuentran su amplia sensibilidad y rendimiento, el método es relativamente simple, rápido y económico, y no hay necesidad de equipos de laboratorio sofisticados, es más ampliamente utilizada y menos prohibitiva (57), por lo cual diversos estudios que requieren validación bioquímica y cuantificación de AGEs han utilizado este tipo de ensayos. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran la interferencia con los aductos libres de glicación y la falta de suficiente especificidad de anticuerpos, dependiendo del kit (56). Las técnicas ELISA se realizan normalmente con kits disponibles comercialmente validados con respecto a las instrucciones de fabricación (58).

A pesar de los métodos ya descritos, actualmente no hay un método estándar de oro disponible para la detección y cuantificación de AGEs, lo cual pudiera deberse a que no existe una unidad de medida estándar reconocida internacionalmente para expresar los niveles de AGEs, a diferencia de otras moléculas medibles. Debido a esto, no existe la posibilidad de comparar los resultados de AGEs de manera significativa entre diferentes laboratorios y por lo tanto se desconoce cómo se comparan los ensayos ELISA con LC-MS en la medición de AGEs. (56)

1.4.1 EFECTOS DE LOS AGEs

La reacción de Maillard iniciando con la glicación de proteínas y progresando a la formación de AGEs, está implicada en la patogenia de enfermedades cardiovasculares, renales y neurodegenerativas, así como de la AR y, en el desarrollo de las complicaciones de esta última y de la diabetes mellitus (59).

Los AGEs ocasionan daño tisular a través de fenómenos como el atrapamiento y el entrecruzamiento, y al reaccionar con el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE). En sitios de inflamación, la expresión de este receptor se ve aumentada, principalmente en las células inflamatorias y epiteliales, asociándose estos altos niveles de expresión de RAGE con diversos estados patológicos relacionados con la inflamación (60). Así, la interacción AGE-RAGE resulta en una señalización proinflamatoria, la generación de estrés oxidativo intracelular y la activación posterior de los factores de transcripción sensibles a redox como NF- κ B. En las células endoteliales esta interacción genera una hiper-permeabilidad y una expresión mejorada de las moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1); y en los monocitos, induce quimiotaxis y una mayor generación de citocinas (TNF, IL-1 o IL-6). Además, la participación de RAGE resulta en una disminución de la síntesis de colágeno en los fibroblastos (59). Las proteínas de larga vida, como el colágeno, son las moléculas más vulnerables al entrecruzamiento y la formación de AGEs con la consiguiente reducción de la proteólisis y la remodelación tisular. Las proteínas reticuladas irreversibles de los AGEs en el colágeno de los vasos también contribuyen a la aterosclerosis (61).

La mayoría de los reportes se han centrado en el estudio de los AGEs en relación con la diabetes mellitus (62,63,64,65,66); sin embargo, también se han reportado niveles elevados del receptor de AGEs (RAGE) en personas sin diabetes y con PE severa (67,68), así como la involucración del eje AGE-RAGE de manera estrecha en la fisiopatología y complicaciones de otras enfermedades crónicas como AR (69), confirmando que niveles elevados de AGEs y RAGE pueden estar relacionados con otros estados metabólicos e inflamatorios (67) y no necesariamente con estados de hiperglicemia.

1.4.2 AGEs y PERIODONTITIS

Recientemente se ha descrito que los AGEs tienen un papel fundamental en la PE, al influir tanto en su progresión como en su gravedad (70), y se ha informado que sus niveles se encuentran aumentados en esta condición oral (63,71).

Guo et al., en el 2015, reportaron que los pacientes con PE presentaban un aumento significativo (>2 veces) en el estrés oxidativo y niveles de AGEs tisulares, comparados con sujetos sanos (71). Altingöz y cols. en el 2021, analizaron por primera vez los niveles séricos de AGEs en pacientes con PE sistémicamente sanos y controles, encontrando niveles elevados de forma significativa ($p < 0.001$) en los pacientes con PE. Los autores consideran que este hallazgo fortalece la asociación entre AGEs sistémicos y PE (63).

Esta influencia de los AGEs en la PE se ha atribuido a sus efectos directos e indirectos que ejercen en las células del ligamento periodontal a través de la activación del eje de señalización AGE-RAGE principalmente (72,73). Pietropaoli et al. proponen que los AGEs pueden acumularse irreversiblemente en el tejido gingival con el envejecimiento, condiciones de hiperglucemia prolongadas y/o inflamación crónica, pudiendo ocasionar daño tisular afectando el estado funcional de las fibras de colágeno y promoviendo un aumento en la producción y liberación de ROS de las células del ligamento periodontal y fagocitos, así como de inflamación por interacción AGE-RAGE, con la consiguiente inducción de citocinas proinflamatorias y MMP, lo que conduce a la activación de osteoclastos y pérdida ósea, así como a la desintegración de las fibras de colágeno (59). Se ha sugerido que esta interacción es autosuficiente y autoestimulante, perdurando el estado inflamatorio (70).

Como parte de esto, se han investigado de manera in vitro los efectos de los AGEs en los fibroblastos del periodonto. Murillo et al., observaron una reducción del tamaño de los fibroblastos y disminución en su capacidad de propagación (74); así como Ren et. al, quienes encontraron que los AGEs podían suprimir la viabilidad celular de los fibroblastos y regular la baja expresión de colágeno tipo I y III por parte de las células (75). Es posible que el acúmulo de moléculas glicadas en la membrana basal y extracelular de los vasos tanto por una disminución del recambio

como por el aumento de la reticulación influya severamente en la patogenia y la cicatrización de heridas en el tejido periodontal (59).

Así mismo se ha reportado que en los fibroblastos gingivales los AGEs activan la MMP-1 por la vía RAGE-NF- κ B, mediando la producción de quimiocinas proinflamatorias con aumento de la apoptosis, y que NF- κ B es capaz de promover la síntesis de AGEs de novo (70).

Además de la generación de AGEs en la PE, cabe mencionar que también se ha implicado en la patogénesis de enfermedades como diabetes, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, insuficiencia renal y recientemente, se ha demostrado que se incrementan durante la AR (76,77).

1.4.3 AGEs y ARTRITIS REUMATOIDE

Se ha propuesto que el estrés oxidativo y producción de especies reactivas de dicarbonilo (que en última instancia forman AGEs) están implicados en la patogénesis de la AR. La AR genera AGEs, subproductos del estrés oxidativo, como resultado de la activación de neutrófilos. Los AGEs se unen a los receptores celulares (RAGE) expresados por células inflamatorias, neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y fibroblastos sinoviales, llevando a la activación de las respuestas proinflamatorias (76) e induciendo consecuencias deletéreas como la disfunción endotelial después de la activación del RAGE endotelial (78). Por lo tanto, esta interacción AGE-RAGE inicia un proceso inflamatorio-proliferativo (76).

Mediante la activación de este receptor (RAGE), se mejora la translocación de NF- κ B al núcleo. En el núcleo, NF- κ B facilita la transcripción de genes proinflamatorios, dando lugar finalmente, por ejemplo, a la regulación de las VCAM-1. De esta manera se establece un bucle positivo de alimentación de la interacción AGE-RAGE, manteniendo un estado inflamatorio en el que se pueden formar AGEs. Esta interacción AGE-RAGE se puede convertir en un proceso de mantenimiento propio, contribuyendo al desarrollo de la aterosclerosis. Por lo tanto, en pacientes con AR,

la producción de AGEs puede ser debida a la influencia del estrés oxidativo durante la inflamación crónica de esta enfermedad sistémica (30).

Se ha descrito que el aumento de incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes con AR es independiente de los factores tradicionales, sugiriendo que los mecanismos adicionales, como la producción de AGEs, son responsables de la enfermedad cardiovascular en la AR (32).

Se ha reportado acumulación de AGEs en el tejido sinovial de pacientes con AR, (79); y se ha demostrado que el bloqueo de RAGE suprime la evidencia clínica e histológica de la AR, indicando el papel de los AGEs en la patogénesis de esta enfermedad sistémica (80).

De Groot et al. reportaron una mayor acumulación de AGEs en pacientes con AR. Informaron que los AGEs estaban relacionados positivamente con el grosor de las capas íntima-media e, inversamente, con la disfunción endotelial en pacientes sin signos de aterosclerosis prematura, lo que sugiere que están involucrados en la formación de las placas ateroscleróticas. Por lo tanto, los AGEs en pacientes con AR, podrían servir como una medida de inflamación acumulativa y como marcadores tempranos de enfermedades cardiovasculares en estos pacientes (30).

De la misma forma, Najafizadeh et al. reportaron en un estudio que los AGEs aumentan significativamente en los pacientes con AR comparados con los sujetos sanos (81); al igual que Pérez García et al., quienes concluyen que los AGEs podrían tener utilidad como marcadores de daño acumulado en pacientes con AR establecida, ya que se encontraron mayores niveles de AGEs en pacientes que presentaban manifestaciones extraarticulares y de larga evolución, pudiendo convertirse estos en biomarcadores de pronóstico de la enfermedad (82).

1.5 RELACIÓN DE AGES CON ARTRITIS RUUMATOIDE Y PERIODONTITIS

Aunque no existe información hasta el momento de una relación entre AR y PE a través de los AGEs, por la literatura revisada y analizada anteriormente donde se ha reportado su influencia en ambas enfermedades, quizá este pudiera ser otro

mecanismo de relación entre ellas, con un aumento en la actividad o severidad de cada una cuando existe una mayor concentración de AGEs. Como tal, los AGEs pueden servir como una medida de inflamación acumulativa y ser posibles predictores de las complicaciones en estos pacientes.

1.6 JUSTIFICACIÓN

Existen numerosos reportes de relación entre PE y AR, en los cuales se han explorado diferentes mecanismos y biomarcadores de inflamación que pueden relacionar a ambas enfermedades (42,43,45,46,47). Los AGEs, como factores de la relación entre PE y enfermedades sistémicas, han sido descritos en su mayoría en diabetes mellitus (53,83), pero no en pacientes que presenten tanto PE como AR; pues hasta el momento solo se ha demostrado su influencia de forma independiente en cada una de estas enfermedades.

Por lo tanto, es importante explorar si los AGEs pudieran ser un factor fisiopatológico común a ambas condiciones al valorar sus niveles séricos en pacientes con AR y PE, con la posibilidad de que la PE pudiera tener influencia en la concentración de AGEs en pacientes con AR

Estos resultados podrían tener gran relevancia clínica pues permitirán determinar si los AGEs pudieran ser otro mecanismo de relación entre ambas enfermedades, lo que fortalecería la relación ya reportada, haciendo necesaria la concientización de médicos reumatólogos de que pacientes con AR deben ser referidos de manera rutinaria al periodoncista para enfatizar en la prevención de PE o para realizar el tratamiento pertinente que permita llevar a un estado de salud periodontal, y así mejorar el pronóstico de esta enfermedad reumatológica y lograr disminuir sus posibles complicaciones. Este estudio ayudará a sentar las bases para futura investigación de asociación (causa-efecto) y seguimiento entre AGEs, PE y AR.

1.7 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los pacientes con AR/PE presentan mayor concentración de AGEs en comparación con el grupo de PE, AR y sanos?

1.8 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE TRABAJO: La concentración sérica de AGEs es mayor en pacientes con AR/PE en comparación con los demás grupos de estudio.

HIPÓTESIS NULA: La concentración sérica de AGEs no es mayor en pacientes con AR/PE en comparación con los demás grupos de estudio.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar por medio de la técnica de ELISA la concentración sérica de AGEs en pacientes con AR, PE, AR/PE y sanos.

1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la presencia de AGEs séricos en los grupos de estudio.
2. Comparar la edad y el sexo en los grupos de estudio.
3. Comparar la profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica en los grupos de estudio.
4. Identificar si existe correlación entre los niveles séricos de AGEs y la profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica y la edad.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE REALIZACIÓN Y RECOLECCIÓN DE DATOS

Este estudio se llevó a cabo en:

- Laboratorio de Odontología Genómica de la Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontología Integral Avanzada de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

2.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal, analítico, retrolectivo.

2.3 MUESTREO

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia.

2.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluyeron 80 muestras de sangre periférica, provenientes de sujetos sanos, con PE, con AR y AR/PE divididas en 4 grupos de 20 muestras cada uno.

El tamaño de la muestra fue calculado en un estudio previo, donde se determinó a partir de lo siguiente considerando una población finita:

$$n = \frac{NZ^2\alpha S^2}{d^2(N-1) + Z^2\alpha S^2}$$

N = Total de la población

$Z^2\alpha$ = 1.96 (si la seguridad es del 95%)

d = Precisión (en este caso deseamos un 5%)

S^2 = Varianza

2.5 GRUPOS DE ESTUDIO

Grupo 1: 20 muestras de sujetos sanos.

Grupo 2: 20 muestras de pacientes con PE

Grupo 3: 20 muestras de pacientes con AR

Grupo 4: 20 muestras de pacientes con AR/PE

2.6 CRITERIOS DE SELECCIÓN

2.6.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas de un banco de muestras de acuerdo con los siguientes criterios de selección:

2.6.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Muestras disponibles dentro del Laboratorio de Odontología Genómica de la Maestría en Ciencias Odontológicas.
- Bases de datos disponibles con registro de las variables de interés.
- Muestras almacenadas en condiciones óptimas.

2.6.1.2 CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- Muestra insuficiente.
- Dificultad para identificación de la muestra.

2.6.1.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Imposibilidad de procesar las muestras.

La recolección de estas muestras se realizó para un estudio previo, en base a los siguientes criterios de selección establecidos para los sujetos de estudio:

2.6.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SUJETOS

2.6.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ambos sexos.
- Adultos entre 35-65 años, con diagnóstico de PE, AR, AR/PE o sistémicamente sanos.
- Aceptación por escrito del Consentimiento Informado.

2.6.2.2 CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- Presencia de alguna otra enfermedad crónica.
- Pacientes totalmente edéntulos.
- Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.
- Tabaquismo / alcoholismo.
- Síntomas de desequilibrio intestinal.
- Tratamiento periodontal previo.

2.6.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Imposibilidad de obtener o procesar las muestras.
- Muestras contaminadas.
- Imposibilidad de medir las variables de interés del estudio.

2.7 DESCRIPCIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

2.7.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

DIAGNÓSTICO DE AR

Clasificación: Cualitativa nominal.

Conceptual: Presencia de la enfermedad. Enfermedad inflamatoria crónica, que se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones y en los tejidos circundantes. También puede afectar otros órganos.

Operacional: Determinado por el reumatólogo siguiendo los Criterios de clasificación del ACR 2010 / Liga Europea contra el Reumatismo (27). Se expresará en presencia o ausencia.

Escala de medición: presencia o ausencia.

DIAGNÓSTICO DE PERIODONTITIS

Clasificación: Cualitativa nominal.

Conceptual: Presencia de la enfermedad. Enfermedad caracterizada por una inflamación mediada por el hospedero asociada a microbios, que conllevará a la destrucción de los tejidos de soporte del diente.

Operacional: Determinado cuando la profundidad de bolsa es mayor a 3 mm y la pérdida de inserción igual o mayor a 2 mm en por lo menos 30% de los sitios sondeados (80), utilizando una sonda periodontal North Carolina calibrada en milímetros introducida de manera paralela al eje longitudinal del diente en las caras vestibular, lingual o palatina en 6 puntos: mesial, medio y distal de ambas caras.

Escala de medición: presencia o ausencia.

2.7.2 VARIABLES DEPENDIENTES

PROFUNDIDAD DE SONDAJE

Clasificación: Cuantitativa de razón.

Definición conceptual: Distancia que existe desde el margen gingival al fondo del surco gingival o de la bolsa periodontal.

Definición operacional: Determinada por medio de una sonda periodontal North Carolina calibrada en milímetros introducida de manera paralela al eje longitudinal del diente. Una medición mayor a 3 mm indica presencia de bolsa periodontal.

Escala de medición: mm.

NIVEL DE INSERCIÓN CLÍNICA

Clasificación: Cuantitativa de razón.

Conceptual: Distancia que existe desde la unión amelocementaria al fondo del surco o bolsa periodontal.

Operacional: Determinada por medio de una sonda periodontal North Carolina calibrada en milímetros introducida de manera paralela al eje longitudinal del diente. Una distancia mayor a 2 mm indica pérdida de inserción.

Escala de medición: mm.

PRESENCIA DE AGEs

Clasificación: Cualitativa nominal

Definición conceptual: Presencia de AGEs en suero de acuerdo con el límite de detección del Kit comercial de ELISA utilizado en el estudio.

Definición Operacional: Se determinará mediante Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) a partir de un kit comercial, una vez que las muestras de sangre sean obtenidas por venopunción. Expresada como presencia o ausencia.

Escala de medición: Presencia/ausencia.

CONCENTRACIÓN DE AGEs

Clasificación: Cuantitativa de razón

Conceptual: Medición en ng/mL de la concentración de AGEs en suero.

Operacional: Se determinará mediante Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) a partir de un kit comercial, una vez que las muestras de sangre sean obtenidas por venopunción.

Escala de medición: ng/ml.

2.8 PLAN DE TRABAJO

2.8.1 APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

El proyecto fue presentado para su aprobación ante el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, clave: CEI-FE-034-021.

2.8.2 ACTIVIDADES PREVIAS

Debido a que este es un estudio retrolectivo, se seleccionaron las muestras de un Banco de muestras y se analizó la base de datos y cada uno de los expedientes de los sujetos de quienes provenían.

Se observó que en su momento y previo a la toma de muestras, se realizó un consentimiento informado a todos los sujetos para participar en estudios de investigación. Se dio a todos los sujetos una explicación sobre la realización de ese estudio y posibles estudios derivados, explicando objetivos, la manera en cómo se llevaría a cabo la toma de la muestra, así como los riesgos y beneficios. Los sujetos firmaron de manera voluntaria el consentimiento informado por escrito y se mantuvo la confidencialidad de los datos obtenidos.

Una vez aceptado el consentimiento informado, a los sujetos se les realizó una historia clínica. La anamnesis se llevó a cabo de forma directa e incluyó ficha de identificación, antecedentes patológicos y no patológicos, enfermedad actual, tiempo de diagnóstico, enfermedades sistémicas adicionales, medicamentos requeridos y última visita al médico. El diagnóstico de AR se llevó a cabo por un reumatólogo experto de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología 2010 / Liga Europea contra el Reumatismo (27). En cuanto a la historia dental esta incluyó: causa de pérdida dental, tratamiento odontológico previo, sangrado gingival, movilidad dental, frecuencia de cepillado dental, auxiliares de higiene oral, horario de la última higiene oral y hábitos bucales nocivos.

En su momento, también se realizó la estandarización del investigador con un experto (realizando el análisis estadístico correspondiente) para el diagnóstico de PE, el cual se determinó cuando la profundidad de sondaje fuera >3 mm y la pérdida de inserción ≥ 2 mm en por lo menos 30% de los sitios sondeados (84). Los datos fueron registrados en un periodontograma para cada sujeto, entendiendo cada parámetro de la siguiente manera:

Profundidad de sondaje

Se entiende como la distancia existente entre el margen gingival y la base del surco (1-2 mm en ausencia de inflamación clínica) o bolsa periodontal (>3 mm). Para esta medición se utilizó una sonda U. of North Carolina calibrada en milímetros, la cual se introdujo de manera paralela al eje longitudinal del diente en las caras vestibular, lingual o palatina en 6 puntos: mesial, medio y distal de ambas caras (2).

Nivel de inserción clínica

Es la distancia en milímetros de la unión amelocementaria (UAC) a la base del surco o bolsa. Para su medición se utilizó una sonda U. of North Carolina calibrada en milímetros insertada de manera paralela al eje longitudinal del diente en las caras vestibular, lingual o palatina en 6 puntos: mesial, medio y distal de ambas caras. Para determinarlo, se realizó como se indica a continuación:

- Si el margen gingival se encontró coronal a la UAC, el nivel de inserción se estableció restandole a la profundidad de sondaje la distancia del margen gingival a la UAC.
- Si el margen gingival coincidió con la UAC, la pérdida de inserción clínica fue igual a la profundidad de sondaje.
- Si el margen se encontró apical a la UAC, la pérdida de inserción clínica se determina por la suma de la profundidad de sondaje y la distancia entre la UAC y el margen gingival.

Además, se realizó la toma de muestras de sangre periférica de cada uno de los sujetos, para así poder realizar la extracción del suero (ANEXO 1) y entonces tener su almacenamiento en el Banco de muestras.

2.8.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS

De esta forma, para el presente estudio, fue posible acudir al Banco de muestras del Laboratorio de Odontología Genómica de la Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontología Integral Avanzada de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí para realizar una selección de las

muestras de suero mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia y atendiendo a los criterios de selección establecidos, para posteriormente procesarlas y realizar así la medición de la concentración de AGEs.

2.8.4 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AGEs

De las muestras de suero seleccionadas del Banco de muestras, los niveles séricos de AGEs se determinaron mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) a partir del Kit “AGEs Elisa kit MBS267540”, el cual es un tipo de ensayo de sándwich cuantitativo con un rango de detección de 200 ng/ml-3.12ng/ ml, que tiene una sensibilidad de hasta 0.6 ng/ml.

La técnica bioquímica analítica ELISA del kit MBS267540 se basa en interacciones AGE anticuerpo-AGE antígeno (inmunosorbencia) y un sistema de detección colorimétrico HRP para detectar objetivos de antígeno AGE en muestras. El kit ELISA está diseñado para detectar AGEs nativos, no recombinantes. Los tipos de muestra apropiados pueden incluir fluidos corporales no diluidos y / u homogenados de tejidos o secreciones. Cuando se utiliza la técnica de doble ELISA, el anticuerpo pre-recubierto es el anticuerpo monoclonal AGEs humano y el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal marcado con biotina. Las muestras y el anticuerpo marcador de biotina se agregan a los pocillos de la placa ELISA y se lavan con PBS o TBS. Luego se añaden conjugados Avidina-peroxidasa a los pozos ELISA en orden; se usa sustrato TMB para colorear después de que el reactivo se ha lavado completamente con PBS o TBS. TMB se convierte en azul en peroxidasa catalítica y finalmente se convierte en amarillo bajo la acción del ácido. La profundidad del color y los factores de prueba en las muestras están positivamente correlacionados.

La medición de la concentración sérica de AGEs se realizó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. (ANEXO 2)

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para este estudio de diseño retrolectivo, el investigador previamente estandarizado tomó las muestras, demostrándose a través de una consistencia interobservador en el diagnóstico de PE, obteniendo valores de Kappa $>.80$.

Se realizó la estadística descriptiva, expresando frecuencia y porcentaje para variables cualitativas (diagnóstico de PE, diagnóstico de AR, presencia de AGEs, sexo); y media, mediana, desviación estándar y rango para variables cuantitativas (profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, concentración de AGEs, edad).

Además, se realizó estadística analítica, utilizando la prueba exacta de Fisher para el análisis de las variables cualitativas; y determinando la distribución de las variables cuantitativas mediante la prueba de Shapiro Wilk.

Para la comparación entre grupos, si la distribución de las variables fue paramétrica (profundidad al sondaje) se realizó ANOVA de una vía y el análisis post-hoc mediante la prueba de Tukey; y para las variables donde la distribución fue no paramétrica (nivel de inserción clínica, concentración de AGEs y edad) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y post-hoc mediante prueba de Dunn. Al comparar entre 2 grupos con distribución no paramétrica (tiempo de diagnóstico de AR) se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Para determinar la correlación entre variables y dada su distribución no paramétrica se utilizó la prueba de Spearman. La significancia se fijó cuando $p < 0,05$. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism versión 9.0.2.

2.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto fue presentado para su aprobación ante el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, clave: CEI-FE-034-021. Se aplicó el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Seres Humanos considerándose una investigación de riesgo mínimo. En su momento, y previo a la toma de la muestra, se obtuvo el Consentimiento informado por escrito de manera voluntaria de acuerdo

con la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 en el cual se dio al participante una explicación verbal con el objetivo del estudio y la forma de cómo se llevaría a cabo. Los datos fueron manejados siguiendo las especificaciones de la NOM 004-SSA3-2012, del Expediente Clínico, respecto al manejo y confidencialidad de los datos.

En su momento, las evaluaciones de los pacientes, así como la toma de muestras sangre periférica se realizaron bajo las indicaciones de la OMS y de acuerdo con las medidas bioseguridad y control de infecciones de la NOM-013 SSA2, teniendo en cuenta que fueron tomadas previo a la pandemia por COVID-19.

Se siguió la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, para la Protección ambiental - Salud ambiental – para el manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

2.11 FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada por:

- Proyecto de Investigación Científica Básica (CONACYT) 2014, no.242939.
- Adicionalmente se contó con la infraestructura y diversos recursos de la Clínica del Posgrado en Periodoncia y del Laboratorio de Odontología Genómica de la Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontología Integral Avanzada, ambos pertenecientes a la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

En la tabla 1 se describen las características de los grupos de estudio sobre edad, sexo y tiempo de diagnóstico de AR.

En cuanto a la edad, se observa que la edad media de los pacientes para los 4 grupos de estudio fue alrededor de 50 años (sanos: 54.85 ± 13 ; PE: 47.15 ± 8.42 ; AR: 51.50 ± 9.28 ; AR/PE 53.30 ± 9.5), sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p = 0.1329$).

Con respecto a la distribución por sexo, ésta fue similar en los 4 grupos de estudio, donde existió mayor prevalencia del sexo femenino (sanos: femenino 85%, masculino 15%; PE: femenino 80%, masculino 20%; AR: femenino 85%, masculino 15%; AR/PE: femenino 90%, masculino 15%). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p = 0.8532$).

Y, en cuanto al tiempo de diagnóstico de AR para los grupos de AR y AR/PE (7.3 ± 6.806 y 5.90 ± 6.282 años respectivamente), tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0.4625$).

Con lo anterior, se puede observar que los grupos son homogéneos para las comparaciones pertinentes.

Tabla 1. Edad, sexo y tiempo de diagnóstico de AR de los grupos de estudio

	SANOS	PE	AR	AR/PE	p
	n=20	n=20	n=20	n=20	
	X±DE (rango) mediana				
EDAD (años)	54.85±13 (33-70) 59	47.15±8.42 (33-66) 44.50	51.50±9.28 (38-69) 51.5	53.30±9.5 (35-76) 55	0.1329*
SEXO	Frecuencia (%)				
Femenino	17 (85)	16 (80)	17 (85)	18 (90)	0.8532
Masculino	3 (15)	4 (20)	3 (15)	2 (15)	**
	X±DE (rango), mediana				
TIEMPO DE			7.3±6.806	5.90±6.282	
DIAGNÓSTICO	NA	NA	(1.0-30)	(1-30)	0.4625
DE AR (años)			5.0	5.0	***

AR: Artritis Reumatoide, PE: Periodontitis, X: Media, DE: Desviación estándar, M: Mediana, NA: No aplica

*Prueba de Kruskal-Wallis; **Prueba exacta de Fisher; ***Prueba U de Mann –Whitney.

En la tabla 2 se describen los parámetros periodontales de los grupos de estudio.

En cuanto a la profundidad al sondaje, como era de esperarse, esta fue mayor en los grupos de PE (3.61±0.24 mm) y AR/PE (3.6±0.35 mm), existiendo diferencia estadísticamente significativa con los sujetos periodontalmente sanos (1.64±0.19 mm) (p<0.0001); sin embargo, entre ellos fueron similares (p=0.8227). No así entre los grupos de sanos y AR, donde la profundidad fue mayor en el grupo de AR (2.21±0.53 mm) (p<0.0001).

El mismo patrón se observa para la pérdida de inserción clínica, ya que los grupos de PE (2.80±0.34 mm) y AR/PE (3.19±0.46 mm) tienen significativamente mayor pérdida

de inserción comparados con los sujetos periodontalmente sanos (1.021 ± 0.29 mm) ($p < 0.0001$); sin embargo, entre ellos fueron similares ($p = > 0.9999$).

Tabla 2. Profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica.

	SANOS	PE	AR	AR/PE	p
	n=20	n=20	n=20	n=20	
	X$\pm$DE (rango) mediana				
Profundidad de sondaje (mm)	1.64 ± 0.18 (1.2-1.99) 1.644	3.61 ± 0.24 (3.26-4.14) 3.615	2.21 ± 0.53 (1.4-3.44) 2.1	3.6 ± 0.35 (3.07-4.33) 3.585	$< 0.0001^*$
Nivel de inserción Clínica (mm)	1.021 ± 0.29 (0.55-1.35) 1.194	2.80 ± 0.34 (2.13-3.34) 2.801	1.56 ± 0.44 (0.99-2.77) 1.449	3.19 ± 0.46 (2.61-4.33) 3.065	$< 0.0001^{**}$

PE: Periodontitis, AR: Artritis Reumatoide, X= Media, DE= Desviación estándar.

*Prueba de ANOVA-Tukey; **Prueba de Kruskal-Wallis-Dunn

En la tabla 3 se muestra la presencia y cuantificación de la concentración de AGEs en suero.

El grupo que tuvo mayor porcentaje de pacientes negativos a la presencia sérica de AGEs fue el grupo de sanos, donde el 30% de los pacientes no mostraron su presencia en suero, existiendo diferencia estadísticamente significativa con el resto de los grupos de estudio ($p = 0.0245$), en donde el 95% de los pacientes presentaron una concentración detectable de AGEs en suero.

En cuanto a la cuantificación de la concentración de AGEs en suero, se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio (sanos: 11.40 ± 12.68 ; PE: 19.06 ± 15.24 ; AR: 21.37 ± 15.91 ; AR/PE: 23.97 ± 18.68 ng/mL) ($p = 0.0423$); sin embargo, en la comparación múltiple solo se observó esta diferencia

entre el grupo de sanos y AR/PE. A pesar de esto, podemos ver que existe una tendencia al aumento en los niveles séricos de AGEs, cuando los sujetos presentan AR o PE (21.37 ± 15.91 , 23.97 ± 18.68 ng/mL respectivamente) siendo similares entre ellos.

Tabla 3. Presencia y Concentración de AGEs en suero de los grupos de estudio

		SANOS n=20	PE n=20	AR n=20	AR/PE n=20	p
Frecuencia(%)						
Presen cia de AGEs	Positivo	14 (70)	19 (95)	19 (95)	19 (95)	0.0245
	Negativo	6 (30)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	*
X$\pm$DE (rango), mediana						
Concentración de AGEs (ng/ml)		11.40 $\pm$ 12.68	19.06 $\pm$ 15.24	21.37 $\pm$ 15.91	23.97 $\pm$ 18.68	0.0423
		(0-44.44)	(0-64.35)	(0.55-55.65)	(0.83-68.15)	**
		9.53	14.4	15.79	18.38	

PE: Periodontitis, AR: Artritis Reumatoide, X= Media, DE= Desviación estándar

*Prueba exacta de Fisher; **Prueba de Kruskal-Wallis-Dunn

Realizando los análisis de correlación en todos los grupos, las correlaciones obtenidas fueron las siguientes:

En la figura 1 se muestra una correlación positiva mediante la prueba de correlación de Spearman entre los niveles séricos de AGEs y la edad en el grupo de sanos ($p=0.0023$; $r=0.6410$).

De igual forma, en las figuras 2 y 3, se muestra una correlación positiva entre los niveles séricos de AGEs y la profundidad al sondaje ($p=0.0011$; $r=0.6734$); y entre los niveles séricos de AGEs y el nivel de inserción clínica ($p=0.0001$; $r=0.7263$), ambas en el grupo de AR/PE.

Figura 1. Correlación entre los niveles séricos de AGEs con la edad en el grupo de sanos.

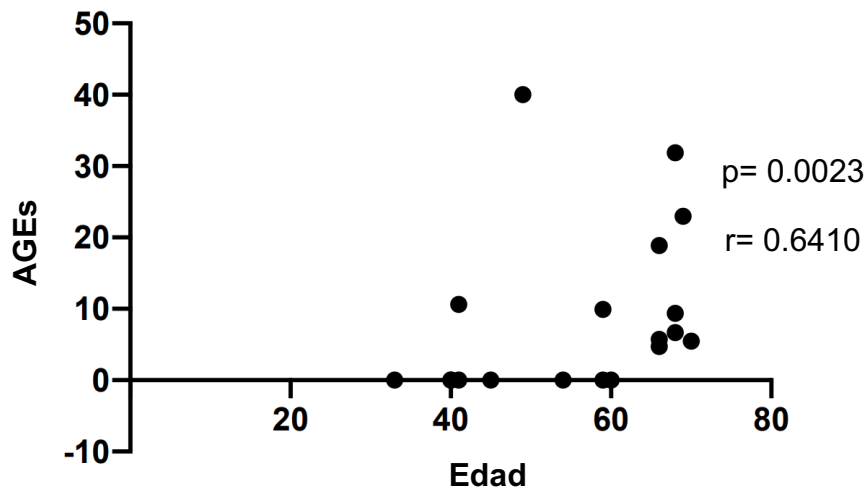


Figura 2. Correlación entre los niveles séricos de AGEs con la profundidad al sondaje en el grupo de AR/PE.

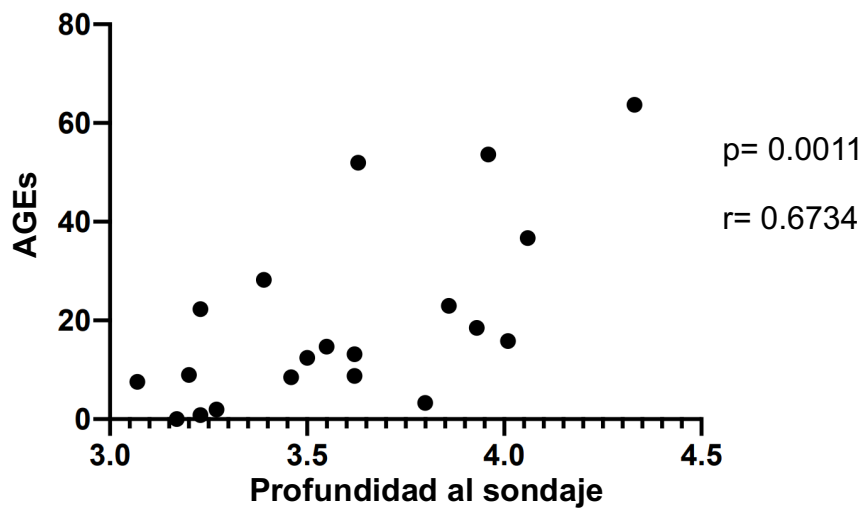
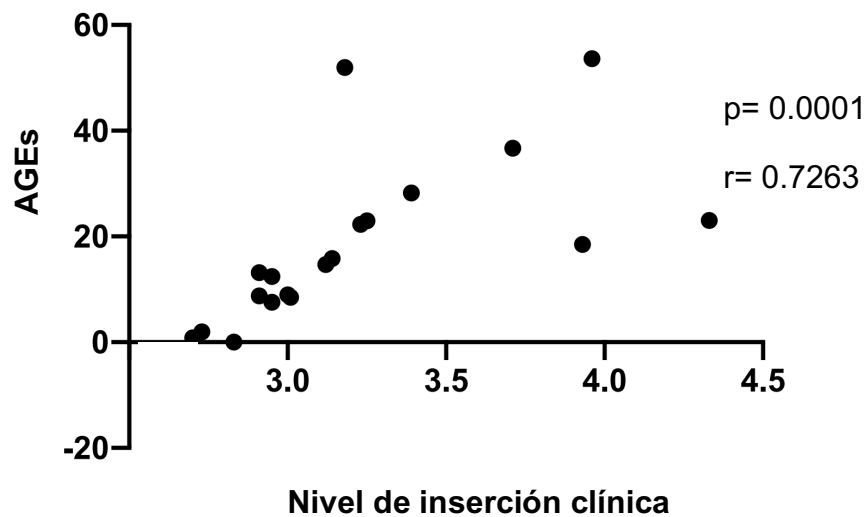


Figura 3. Correlación entre los niveles séricos de AGEs con el nivel de inserción clínica en el grupo de AR/PE.



CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se detectó que tanto la frecuencia como concentración sérica de AGEs en los grupos de PE y AR fueron similares (no existió diferencia estadísticamente significativa). Se han realizado estudios que miden los niveles séricos de AGEs en cada una de estas enfermedades (30,63,71,81,82), pero no que los comparen entre ellas. Estos resultados son de suma importancia, pues al ser la AR una enfermedad sistémica y la PE al ser reconocida como una enfermedad local, pudiera esperarse que la concentración sérica de AGEs en los pacientes con esta enfermedad reumatológica fuera considerablemente mayor al compararlos con los pacientes con PE. Estos resultados pudieran explicarse por lo descrito por Straka M et al., quienes consideran que el efecto de la PE no es solo local, pues las bacterias, sus productos, células y sustancias proinflamatorias penetran en el torrente sanguíneo infectando estructuras distantes. Lo anterior puede reflejarse en nuestro estudio con la similitud en los niveles séricos de AGEs entre el grupo de PE y el grupo con una enfermedad sistémica como es la AR (85). Es imposible comparar estos resultados debido a que no existen estudios previos para poder realizar dichas comparaciones.

El grupo de sanos presentó menor frecuencia de AGEs, alcanzando diferencia estadísticamente significativa comparado con los demás grupos de estudio, lo cual puede atribuirse a la menor inflamación existente en este grupo de pacientes. Estos resultados van en concordancia a lo reportado por Devangelio et al., quienes mencionan que la unión AGE-RAGE ocurre menos en individuos sanos (86).

También se encontró que el grupo de PE presentó mayor concentración sérica versus el grupo de sanos, similar a lo reportado por Guo et al. en el 2015, y Altingöz en el 2021, quienes observaron un aumento significativo de AGEs séricos en pacientes con PE en comparación con sujetos que presentan un periodonto sano (63,71). Se ha descrito que la PE puede generar inflamación sistémica y que pacientes con esta enfermedad presentan niveles elevados de mediadores

proinflamatorios, mayor número de neutrófilos en sangre (83) y, recientemente, de niveles séricos de AGEs (71).

De igual forma, los pacientes con AR presentaron mayor concentración de niveles séricos de AGEs que el grupo de sanos. Esto va en concordancia con lo reportado recientemente por Najafizadeh et al. en el 2021, quienes en su estudio informaron que los pacientes con AR presentaban un aumento significativo de AGEs séricos en comparación con sujetos sanos, atribuyéndolo al estrés oxidativo implicado en la patogenia de la AR, el cual puede causar inflamación y alterar diferentes sustancias intra y extra-celulares, incluyendo los nucleótidos, proteínas, lípidos y polisacáridos, dando como resultado la formación de AGEs (81).

En nuestro estudio también observamos una diferencia en la concentración sérica de AGEs entre los grupos de estudio, observándose niveles elevados tanto en el grupo de PE como de AR y una tendencia al aumento cuando se presentan ambas enfermedades. Quizá el hecho de que solo exista una tendencia a aumentar estos niveles y no una diferencia significativa esté asociado a una “n” limitada del presente estudio. La disponibilidad de sujetos con AR sin presencia de PE estuvo comprometida, debido a que pacientes con esta enfermedad reumatológica presentan con mayor frecuencia PE teniendo un riesgo elevado de padecerla (45), por lo que fue difícil aumentar el número de muestras para este grupo, tomando la decisión de no ampliar la “n” mínima indicada por el cálculo de la muestra del estudio previo. A pesar de esto, y a que desafortunadamente tampoco existe información previa para realizar comparaciones, con estos resultados podemos observar que la presencia de PE es capaz de influir en la producción de AGEs en la AR, y quizá esto sea otro mecanismo de relación entre ambas enfermedades.

Estudios recientes han asociado esta enfermedad reumatológica de manera frecuente con la presencia de PE, debido a que existen factores de riesgo genéticos y ambientales compartidos (3). Gran parte de la relación establecida entre PE y AR se basa en su patogénesis: ambas enfermedades inflamatorias crónicas utilizan

mecanismos destructivos similares, pues las células inflamatorias y citoquinas proinflamatorias impulsan la erosión ósea crónica en la AR y la destrucción crónica del periodonto en la PE (88). Se han reportado posibles mecanismos de relación entre PE y AR, de los cuales se ha descrito la presencia de *P. gingivalis* y su influencia en la producción de anticuerpos citrulinados; el papel que juega *Aggregatibacter actinomucetemcomitans* mediante la secreción de su leucotoxina; y el reconocimiento de factores de virulencia de patógenos periodontales que conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias (34,43,50).

Al considerar a los AGEs como otro posible vínculo entre ambas enfermedades se fortalece esta relación y por lo tanto la influencia que la PE puede tener en esta enfermedad reumatológica. Hipotetizamos que un posible mecanismo en el que intervienen los AGEs influyendo en la relación entre ambas enfermedades podría explicarse de la siguiente manera:

- 1) en la PE, los patógenos periodontales presentan PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) que al ser reconocidos desencadenan una amplia cascada inflamatoria que va a resultar en la destrucción de tejido conectivo y reabsorción ósea. Esta inflamación crónica favorecerá la formación de AGEs en donde mediante la interacción con su receptor perpetuará el estado inflamatorio y activación de MMP por la vía RAGE-NF- κ B, además de que esta vía favorecerá la formación de AGEs de novo.
- 2) en cuanto a la AR, los factores de riesgo interactúan causando cambios en el sistema inmunológico ocasionando que el proceso inflamatorio se desencadene, liberándose un gran número de citoquinas y otras moléculas que van a inducir a la degradación de tejido conectivo y destrucción articular. Se generan AGEs como un subproducto del estrés oxidativo, y mediante la activación de su receptor, se mejorará la traslocación de NF- κ B al núcleo, facilitando la transcripción de genes proinflamatorios.
- 3) De esta forma, con inflamación crónica presente en ambas enfermedades, se establece un bucle positivo de alimentación de interacción AGE-RAGE, manteniendo un estado inflamatorio formando AGEs de novo. Consideramos

entonces que un mecanismo de relación puede ser la formación de AGEs debido a la inflamación, lo que genera una sobreestimulación amplificando la cascada proinflamatoria y perpetuando la inflamación como un círculo vicioso y de mantenimiento propio entre ambas enfermedades.

Actuando en sinergia, la PE y la AR inducen una alta concentración de AGEs, deteriorando el estado de pacientes con ambas enfermedades. De esta forma, al ser los AGEs un posible vínculo entre PE y AR y al influir en la severidad entre ambas enfermedades, pudieran utilizarse como nuevos biomarcadores para la evaluación y seguimiento del estado periodontal. Se ha descrito que esfuerzos de investigación en la actualidad se dirigen hacia el impacto beneficioso de bloqueadores o inhibidores de AGEs a través de la administración oral o pasiva de pastas dentales o irrigadores, siendo esto una nueva área de investigación y desarrollo de fármacos para la PE (72). Esto, como adyuvante en el tratamiento mecánico de la PE y la regulación de la AR, podría ser beneficioso para estos pacientes, pues se ha demostrado que los AGEs pueden acumularse en el tejido periodontal y producir ROS endógenos excesivos, lo cual dañará directamente los tejidos periodontales y además exacerbará indirectamente la lesión periodontal existente al promover liberación y agregación de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, etc.) e inflamasomas (NLRP3 / NALP3, etc.) y / o al activar vías de señalización aguas abajo; además ocasionará apoptosis de células presentes en el LP (89).

En cuanto a los resultados de edad y sexo, para la AR, se ha reportado un pico de edad de aparición en mujeres en la quinta década de vida (20); lo que va de acuerdo con nuestro estudio, en el que la edad promedio de los pacientes con AR fue alrededor de 50 años. En el grupo de pacientes con PE se encontró que el promedio de edad fue menor (47 años), esto debido a que la PE aparece en sujetos entre la 3ª y 4ª década de la vida; sin embargo, no se alcanzó diferencia estadísticamente significativa con el resto de los grupos. De igual forma, cerca del 80-90% de los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron de sexo femenino, esto de acuerdo a

lo reportado previamente en la literatura, donde la AR se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres en una proporción 3:1 (22,90,91); sin embargo, la relación encontrada en el presente estudio fue desde 4:1 hasta 9:1. La posible explicación de este aumento en la proporción es que pacientes de sexo femenino asisten con mayor regularidad a sus citas de control reumatológico, observándose en nuestro estudio en el que la cantidad de muestras disponibles de mujeres fue mayor que la de hombres. Es importante resaltar que, en cuanto a variables de edad, sexo, además de tiempo de diagnóstico de AR, no existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio, por lo que los grupos fueron homogéneos al realizar comparaciones en el resto de las variables de interés.

Por otro lado y como era de esperarse, en cuanto al estado periodontal, en los grupos de PE y AR/PE se obtuvieron promedios significativamente mayores de profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica en comparación con los grupos de sanos y de AR, los cuales tuvieron niveles normales alrededor de los 2 mm para la profundidad de sondaje y alrededor de 1 mm para la pérdida de inserción clínica; sin embargo, aunque el nivel de inserción fue similar en estos últimos dos grupos, la profundidad de sondaje fue significativamente mayor en los pacientes con AR versus el grupo de sanos, lo que pudiera considerarse como un signo temprano de PE.

Los pacientes con AR/PE mostraron niveles de profundidad de bolsa de 3.6 mm, similar al promedio de 3.9 mm reportado previamente en un grupo de pacientes mexicanos con AR/PE semejantes en edad y sexo (2). Este grupo también mostró mayor pérdida de inserción clínica en comparación con el grupo de PE que, aunque no alcanzó diferencia estadísticamente significativa, estos últimos datos van en concordancia con lo reportado por Schmickler et al. en el 2017, quien además concluye que los pacientes con AR presentan peores condiciones periodontales (41). También se ha reportado que, en comparación con la población sana, los sujetos con AR tienen mayor riesgo de desarrollar PE y viceversa, siendo por lo

menos 2 veces más frecuente en los pacientes con AR. De igual forma, su curso clínico es más severo, independientemente de la edad, el género, el origen étnico, o historia de hábito de tabaquismo, en comparación con los individuos que no presentan esta enfermedad reumatológica (92).

Además, en nuestro estudio se realizaron pruebas de correlación, encontrando correlaciones positivas entre los niveles séricos de AGEs con la profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica y la edad en grupos específicos.

La correlación positiva encontrada entre los niveles séricos de AGEs y la profundidad al sondaje, así como con el nivel clínico de inserción fue en el grupo de AR/PE. A pesar de no existir estudios previos para poder realizar nuestras comparaciones, con esto podemos observar que, cuando los pacientes presentan ambas enfermedades, los niveles séricos de AGEs se asocian con peores condiciones periodontales.

Se decidió realizar prueba de correlación de Spearman entre los niveles séricos de AGEs y la edad, ya que se ha reportado que los niveles de AGEs aumentan con el envejecimiento debido a un menor aclaramiento renal de los mismos (93), encontrando en nuestro estudio correlación positiva entre ambas variables en el grupo de sanos.

Por último, en nuestro estudio los AGEs no se correlacionaron con el tiempo de evolución de AR, a diferencia de lo reportado por Groot et al, quienes encontraron que los AGEs aumentaron en pacientes con AR de largo tiempo de diagnóstico (9.3 - 15.1 años) atribuyéndolo a una exposición prolongada al estrés oxidativo (30). Cabe mencionar que en nuestro estudio el tiempo de diagnóstico de los sujetos con AR a quienes pertenecían nuestras muestras fue menor (5.9 – 7.3 años en AR/PE y AR respectivamente), por lo que quizá no encontramos esta correlación ya reportada. Sin embargo, a pesar de ello podemos ver que incluso a partir de 5 años de evolución de esta enfermedad reumatológica la concentración sérica de AGEs

puede verse aumentada y no necesariamente se necesita que transcurran más años con la enfermedad.

Los hallazgos del presente estudio podrían apoyar la idea de que los niveles séricos de AGEs, aunque no son la única vía, pudieran ser un mecanismo de la relación entre PE y AR, influyendo en la patogenia de ambas enfermedades. Además de que la PE, mediante su influencia en el aumento de los niveles séricos de AGEs, puede ser un factor en la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria autoinmune que se produce en la AR, lo cual fortalecería la relación ya reportada entre ambas. Estos resultados son importantes al ser una información valiosa de compartir con médicos reumatólogos para enfocarse en un tratamiento interdisciplinario para el control de la AR y disminución de sus complicaciones, siendo necesario incrementar las medidas de prevención de PE en estos pacientes, fomentando citas de revisión periódicas al ser remitidos por su médico reumatólogo de manera rutinaria al especialista en periodoncia, para así poder instruir medidas de higiene oral y de ser necesario llevar a cabo el tratamiento periodontal pertinente. Lamentablemente, se ha revisado que el diagnóstico y manejo de la AR se enfocan en el alivio del dolor y la preservación estructural, y que las alteraciones orofaciales no son prioritarias (23). Tal es así que en la Guía Mexicana para el tratamiento farmacológico de la AR (Colegio Mexicano de Reumatología) no se incluye la vigilancia, diagnóstico ni manejo de los problemas de salud bucal, dejando en evidencia que la atención de estos pacientes no se está llevando a cabo de forma interdisciplinaria. Se ha descrito que los reumatólogos quizá no son sensibles al nivel de deterioro en las estructuras orales de estos pacientes; sin embargo, los pacientes tampoco lo son, pues probablemente el dolor generalizado desvíe su capacidad de concentrarse en área específicas, distrayendo la percepción del paciente y haciendo que la salud bucal pase a segundo plano. Con lo anterior surge la necesidad de compartir esta información con médicos reumatólogos para incluir el seguimiento de la salud orofacial en estos pacientes en busca de mejora en su calidad de vida (94).

Las fortalezas de este estudio radican en que no se encontraron reportes previos en los que se estudie el papel de los AGEs en pacientes con AR/PE ni se comparen sus concentraciones séricas, siendo este el primer estudio en analizarlo. La mayor parte de la literatura se ha centrado en el papel de los AGEs y su relación entre PE y diabetes mellitus (62,63,64,65,66). Esto quizá se deba al hecho de que parte del proceso de formación de AGEs depende de la concentración de glucosa, y que condiciones de hiperglicemia favorecen su acumulación (53,59). Sin embargo, se ha establecido que el eje AGE-RAGE se relaciona con otros estados metabólicos e inflamatorios como es el caso de la PE y de la AR. El nuevo hallazgo de niveles séricos de AGEs elevados en el grupo de AR/PE fortalece aún más la relación entre PE y AR.

Otra fortaleza es el hecho de tener grupos homogéneos en cuanto a edad, sexo y tiempo de diagnóstico de AR para realizar nuestras comparaciones; además de haber incluido un grupo control de sujetos sin enfermedades sistémicas y de sujetos con AR sin presencia de PE. De igual forma cabe mencionar que la técnica de laboratorio utilizada en el presente estudio es muy robusta. Debido a que actualmente no hay un método estándar de oro disponible para la detección y cuantificación de AGEs, se ha informado que la técnica más adecuada para la medición de AGEs depende de factores como el personal capacitado, el laboratorio disponible, recursos financieros y el objeto del estudio (concentración de AGEs, número y tipo de muestras, etc.); y que la metodología elegida es importante para proporcionar datos confiables (56).

Dentro de las limitaciones de este estudio se encuentra el tamaño de la muestra. Se podría haber aumentado la “n”; sin embargo, debido a la dificultad de reclutar pacientes con AR en el rango de edad establecido y que no tuvieran presencia de PE, así como a los controles que no presentaran ninguna enfermedad sistémica, se decidió mantener la “n” establecida.

El ensayo se realizó utilizando muestras congeladas. No se han encontrado reportes donde analicen los niveles de AGEs en muestras de este tipo. Sin embargo, se ha reportado que a una temperatura de -80°C no ocurre la desnaturalización de proteínas (95), y no se ha encontrado alteración en proteínas después de 10 ciclos de congelación – descongelación (96).

Es importante mencionar que no se tomaron en cuenta algunos criterios que pueden influir en los niveles séricos de AGEs como la obesidad y la dieta. Se ha descrito que, en la obesidad, la combinación de los efectos de un mayor consumo de alimentos, bajo gasto de energía, hiperglucemia, hiperlipidemia y aumento del estrés oxidativo pueden aumentar la formación de reactivos intermedios y ocasionar un aumento en la formación de AGEs (97). De igual forma, se ha informado que los AGEs además de formarse endógenamente, también se pueden proporcionar a partir de fuentes exógenas, siendo una dieta occidental, rica en alimentos procesados y/o tratados térmicamente, grasas y azúcar, la responsable de aumentar la exposición a AGEs (98). Debido a esto, en futuros estudios, podrían tomarse en cuenta IMC y la dieta para así controlar estas variables que pudieran influir en los resultados.

Además, condiciones como la destreza manual disminuida de los pacientes con AR la cual pudiera influir en el estado periodontal, así como el nivel de actividad física de los diferentes grupos que pudiera influir en el estado general de los sujetos, no se tomaron en cuenta. Sin embargo, a pesar de ello en el presente estudio podemos observar que la periodontitis influye en la presencia de AGEs en sujetos con AR, y contamos con la fortaleza de haber incluido 4 grupos de estudio, funcionando algunos grupos como controles.

Como perspectiva a futuro se planea realizar este estudio con una muestra mayor, utilizando muestras con menor tiempo de almacenamiento, tomando en cuenta IMC y la dieta de los sujetos, y además incluir otros índices clínicos revisando correlaciones entre estos y los niveles séricos de AGEs.

Además, sería interesante realizar estudios longitudinales y ensayos clínicos donde se lleve a cabo el tratamiento periodontal a pacientes que presenten AR y PE, y valorar si disminuyen los niveles séricos de AGEs en el tiempo.

Este estudio servirá de base para futuros estudios de causa-efecto, así como para enfatizar en la prevención de PE en pacientes con AR y en el manejo interdisciplinario de esta enfermedad sistémica, incluyendo así a la PE como parte de su manejo estándar debido a la relación demostrada.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente estudio indican que existe una diferencia en la concentración sérica de AGEs entre los grupos de estudio, observándose niveles elevados tanto en el grupo de PE como de AR y una tendencia al aumento cuando se presentan ambas enfermedades. Además, en este estudio se encontró una marcada correlación entre los niveles séricos de AGEs con la profundidad al sondaje y nivel de inserción clínica en el grupo de AR/PE. Se justifica investigación futura para comprender mejor el papel de los AGEs en la relación entre PE y AR.

ANEXOS

ANEXO I

OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SUERO

1. Pedir al sujeto que se siente y coloque el antebrazo en posición supina sobre una superficie cómoda.
2. Realizar una inspección preliminar para identificar la vena cubital: aplicar una banda elástica en la parte superior del brazo, pedir al paciente que cierre el puño y palpar entonces con el dedo índice para localizar la vena.
3. Limpiar la zona de la piel con solución antiséptica, comenzando en el sitio de inserción de la aguja y realizando círculos hacia afuera.
4. Palpar para localizar el centro de la vena diana.
5. Introducir la aguja con el bisel hacia arriba a lo largo de la línea media de la vena cubital en un ángulo superficial (10-30°) respecto de la piel. Aparecerá una gota de sangre en el centro de la aguja y entonces se debe avanzar la aguja en la vena para asegurar que permanezca en su posición durante la extracción de sangre.
6. Comenzar a extraer la muestra de sangre (cuando la sangre comience a fluir, retirar la banda elástica) empujando el tubo de vacío con cuidado de no desalojar la aguja de la vena, hasta recolectar 10 ml de sangre periférica de la vena cubital dentro de tubos rojos de plástico (BD Vacutainer).
7. Después de retirar el tubo del soporte, invertir suavemente el tubo 6-8 veces para mezclar el contenido.
8. Al terminar la recolección de sangre, sostener suavemente una torunda de algodón con la mano no dominante en el sitio de la punción y en un solo movimiento retirar la aguja e inmediatamente aplicar presión ligera en el sitio con la torunda de algodón.
9. Una vez obtenida la muestra de sangre, se debe extraer el suero por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos y colocarlo en tubos Eppendorf.
10. Almacenar todas las muestras a -40°C para su posterior procesamiento.

ANEXO II

PROTOCOLO PARA MEDICIÓN DE AGES SÉRICOS A PARTIR DEL KIT “AGES ELISA KIT MBS267540” MyBioSource, California (USA)

El siguiente ensayo fue realizado por triplicado, con 2 repeticiones por cada corrida.

1. Sacar el kit ELISA del refrigerador con 20 minutos de anticipación y comenzar la prueba una vez que se alcance la temperatura ambiente.
2. Preparar muestras, estándares y reactivos.
 - Diluir el tampón de lavado concentrado con agua bidestilada (1:25). Para el lavado automático de placas la cantidad requerida de tampón de lavado es 350n μ L, y los intervalos de inyección y extracción deben ser ~ 20-30 segundos.
 - Para el estándar: añadir 1.0 ml de diluyente al vial estándar liofilizado y dejar reposar durante 30 min. Una vez que el estándar se haya disuelto por completo, mezclarlo ligeramente y marcarlo con una etiqueta en el tubo. Se recomienda utilizar los siguientes valores de concentración para la curva estándar: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 0ng / mL.
 - Anticuerpo biotinilado: Retirar el volumen apropiado de solución de anticuerpo biotinilado para la cantidad de pocillos que se pretenden analizar y diluir con diluyente de anticuerpo en una proporción de 1: 100. Esto debe prepararse con 30 minutos de anticipación, y se recomienda absolutamente no volver a usarlo para análisis adicionales
 - Conjugado enzimático: Retirar la cantidad adecuada de solución de conjugado enzimático para la cantidad de pocillos que se pretenden analizar y diluir con el diluyente enzimático en una proporción de 1: 100. Esto debe prepararse con 30 minutos de anticipación, y se recomienda absolutamente no volver a usarlo para análisis adicionales.

- Reactivo de color: Preparar la solución de reactivo de color con 30 minutos de anticipación agregando el reactivo de color A y el reactivo de color B en una proporción de 9: 1.
- 3. Agregar estándares y muestras a los pocillos correspondientes en la placa (100µL para cada pocillo). Sellar la placa con la tira de cinta adhesiva.
- 4. Incubar a 37 ° C durante 90 min.
- 5. Preparar la cantidad necesaria de anticuerpo biotinilado con 30 minutos de antelación.
- 6. Lavar la placa ELISA 2 veces.
- 7. Agregar la solución de trabajo de anticuerpos biotinilados (100µL para cada pocillo) y sellar la placa con la tira de cinta adhesiva.
- 8. Incubar a 37°C durante 60 minutos.
- 9. Preparar la cantidad necesaria de conjugado enzimático con 30 minutos de antelación.
- 10. Lavar la placa ELISA 3 veces.
- 11. Agregar la solución de trabajo Enzyme o conjugado enzimático a cada uno de los pocillos que no sean los del blanco (100µL a cada uno), y sellar la placa con la tira de cinta adhesiva.
- 12. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- 13. Lavar la placa ELISA 5 veces.
- 14. Agregar 100µL de la solución de reactivo de color preparado a los pocillos (también en el pocillo del blanco), e incubar protegido de la luz a 37 °C durante 30 minutos.
- 15. Agregar el reactivo de color C (100µL) a cada pocillo (también en el pocillo del blanco). Mezclar bien.
- 16. El lector de microplacas medirá los valores de densidad óptica (450 nm) dentro de los 10 minutos.
- 17. Calcular el contenido del factor de las muestras analizadas.

El kit del fabricante da las siguientes recomendaciones:

1. El valor de OD de cada muestra y estándar deberá ser menor que el del pocillo del blanco (si no, la curva estándar del pozo cero debe cruzarse en el eje Y).
2. Se dibujará la curva estándar manualmente. Se tomará el valor de concentración de las muestras como abscisas y lecturas OD como coordenadas verticales. Se usará una línea suave para conectar cada punto de coordenadas de la muestra estándar. La concentración de muestras se podrá encontrar comprobando la lectura de OD de la muestra.
3. Si el OD de la muestra es más alto que el límite superior de la curva estándar, la muestra se deberá volver a diluir y volver a ejecutar el experimento.

Nota: El cálculo del contenido de las muestras estará sujeto a la curva estándar realizada para las muestras en el mismo experimento. Los resultados son calculados por el instrumento.

- Rango de detección: 200 ng / mL-3.12 ng / mL
- Sensibilidad: los AGE humanos mínimos detectables de hasta 0,6 ng / mL.
- Específico: Sin reacción cruzada con otros factores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89(12):Suppl 1:S159-S172.
2. Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW, Loyola-Rodríguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol*. 2009;36(12):1004–10.
3. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgerit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):218.
4. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ; CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012 Oct;91(10):914-20.
5. The American Academy of Periodontology. *Annals* Vol. 4, International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions. 1999;4(1).
6. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):481-90.
7. Ziebolz D, Pabel SO, Lange K, Krohn-Grimberghe B, Hornecker E, Mausberg RF. Clinical periodontal and microbiologic parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol*. 2011;82(10):1424-32.
8. Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol*. 2003;30(9):761-72.
9. Arora N, Mishra A, Chugh S. Microbial role in periodontitis: Have we reached the top? Some unsung bacteria other than red complex. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18(1):9-13
10. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014 Jan;35(1):3-11.
11. Gurenlian, J. R. The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health. *JDH / American Dental Hygienists' Association*. 2007;81(5):1-11.
12. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, Asadi H, Ojcius DM. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J*. 2019 Feb;42(1):27-35.
13. Du Q, Ma X. Research progress of correlation between periodontal pathogens and systemic diseases. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2020;40(5):759-64.
14. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S1-7
15. Cullinan MP, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):271-86.

16. Mawardi HH, Elbadawi LS, Sonis ST. Current understanding of the relationship between periodontal and systemic diseases. *Saudi Med J*. 2015;36(2):150-8.
17. Arunachalam LT. Autoimmune correlation of rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18(5):666-69.
18. Syngle A. Arthritis and its treatment. En: Rattan S, Kassem M. *Prevention and Treatment of Age Related Diseases*. Springer, Dordrecht, the Netherlands; 2006. 105–32.
19. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(6):265–78.
20. Tobón, GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2010;9(5):A288-92.
21. Symmons DPM. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002;16(5):707–22.
22. Sacks JJ, Luo YH, Helmick CG. Prevalence of specific types of arthritis and other rheumatic conditions in the ambulatory health care system in the United States, 2001–2005. *Arthritis Care Res*. 2010;62(4):460–64.
23. González-Chávez SA, Pacheco-Tena C, de Jesús Caraveo-Frescas T, Quiñonez-Flores CM, Reyes-Cordero G, Campos-Torres RM. Oral health and orofacial function in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2020 Mar;40(3):445-53.
24. Pelaez-Ballesteros I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo, M. Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico. A Study of 5 Regions Based on the COPCORD Methodology. *J Rheumatol Suppl*. 2011;86(0):3–8.
25. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Review. *J Periodontol*. 2005;76(11–Suppl):2066–74.
26. Arvikar SL, Collier DS, Fisher MC, Unizony S, Cohen GL, McHugh G, Steere AC. Clinical correlations with *Porphyromonas gingivalis* antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2013; 15(5): R109.
27. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(9):2569–81.
28. Gómez, A. Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*. 2011;6(S3):33–37.
29. Scott DL, Kingsley GH. *Inflammatory Arthritis in Clinical Practice*. 2 ed. London. Editorial Springer – Verlag; 2008.1–31.
30. De Groot L, Hinkema H, Westra J, Smit AJ, Kallenberg CG, Bijl M, Posthumus MD. Advanced glycation endproducts are increased in rheumatoid arthritis patients with controlled disease. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6):R205.

31. Hürlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, Béchir M, Spieker LE, Neidhart M, Michel BA, Gay RE, Lüscher TF, Gay S, Ruschitzka F. Antitumour necrosis factor- α treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2002;106(17):2184–7.
32. Del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2737–45.
33. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: the role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(4):1143–52.
34. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(10):606–20.
35. Soory M. Hormone mediation of immune responses in the progression of diabetes, rheumatoid arthritis and periodontal diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2002;2(1):13–25.
36. Georgiou TO, Marshall RI, Bartold PM. Prevalence of systemic diseases in Brisbane general and periodontal practice patients. *Aust Dent J*. 2004;49(4):177–84.
37. Dev YP, Khuller N, Basavaraj P, Suresh G. Rheumatoid arthritis among periodontitis patients in baddi industrial estate of himachal pradesh, India: A cross sectional study. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(10):2334–7.
38. Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, Landau H, Brinkmann PG, Schlattmann P, Zernicke J, Buttgereit F, Detert J. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79(6):979–86.
39. Chen HH, Huang N, Chen YM, Chen TJ, Chou P, Lee YL, Chou YJ, Lan JL, Lai KL, Lin CH, Chen DY. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72(7):1206–11.
40. Lee JY, Choi IA, Kim JH, Kim KH, Lee EY, Lee EB, et al. Association between anti-*Porphyromonas gingivalis* or anti- α -enolase antibody and severity of periodontitis or rheumatoid arthritis (RA) disease activity in RA. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16(1):1–8.
41. Schmickler J, Rupprecht A, Patschan S, Patschan D, Müller GA, Haak R, Mausberg RF, Schmalz G, Kottmann T, Ziebolz D. Cross-Sectional Evaluation of Periodontal Status and Microbiologic and Rheumatoid Parameters in a Large Cohort of Patients With Rheumatoid Arthritis. *J Periodontol*. 2017;88(4):368–79.
42. Bello-Gualtero JM, Lafaurie GI, Hoyos LX, Castillo DM, De-Avila J, Munevar JC, Unriza S, Londoño J, Valle-Oñate R, Romero-Sánchez C. Periodontal Disease in Individuals With a Genetic Risk of Developing Arthritis and Early Rheumatoid Arthritis: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol*. 2016 Apr;87(4):346–56.

43. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, Markt J, McGowan D, Kerr GS, Redman RS, Reimold A, Griffiths G, Beatty M, Gonzalez SM, Bergman DA, Hamilton BC 3rd, Erickson AR, Sokolove J, Robinson WH, Walker C, Chandad F, O'Dell JR. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014 May;66(5):1090-100.
44. Radwan-Oczko M, Duś-Ilnicka I, Richards P, Thomsen AM, Rasmussen C. Rheumatoid arthritis patients' oral health and disease activity. *Int J Rheum Dis*. 2019 Aug;22(8):1538-43.
45. Fuggle NR, Smith TO, Kaul A, Sofat N. Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Front Immunol*. 2016;7:80.
46. Äyräväinen L, Leirisalo-Repo M, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Meurman JH, Heikkinen AM. Periodontitis in early and chronic rheumatoid arthritis: a prospective follow-up study in Finnish population. *BMJ Open*. 2017;7(1):e011916.
47. Khare N, Vanza B, Sagar D, Saurav K, Chauhan R, Mishra S. Nonsurgical Periodontal Therapy decreases the Severity of Rheumatoid Arthritis: A Case-control Study. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17(6):484–8.
48. Shimada A, Kobayashi T, Ito S, Okada M, Murasawa A, Nakazono K, et al. Expression of anti-*Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodont Res* 2016; 51 (1): 103-11.
49. Moen K, Brun JG, Valen M, Skartveit L, Eribe EK, Olsen I, Jonsson R. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24(6):656-63.
50. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, Rosen A, Nigrovic PA, Sokolove J, Giles JT, Moutsopoulos NM, Andrade F. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra176.
51. Kaur, S., White, S., & Bartold, P. M. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Journal of Dental Research* 2013; 92(5):399–408.
52. Maillard LC. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *CR Acad Sci Ser*. 1912;154(2):66-68.
53. Fuentes M, Olmos P y Santos JL. Productos finales de glicación avanzada (AGEs) y su importancia en enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición. *Rev. chil. endocrinol. diabetes* 2015;8(2):70-7.
54. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-46.

55. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol.* 2012;4(3):259-70.
56. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:3818196.
57. Mahabee-Gittens EM, Mazzella MJ, Doucette JT, Merianos AL, Stone L, Wullenweber CA, A Busgang S, Matt GE. Comparison of Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Methods to Measure Salivary Cotinine Levels in Ill Children. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(4):1157.
58. Pinho AR, Fortuna A, Falcão A, Santos AC, Seïça R, Estevens C, Veiga F, Ribeiro AJ. Comparison of ELISA and HPLC-MS methods for the determination of exenatide in biological and biotechnology-based formulation matrices. *J Pharm Anal.* 2019;9(3):143-155.
59. Pietropaoli D, Tatone C, D'Alessandro AM, Monaco A. Possible involvement of advanced glycation end products in periodontal diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23(3):683-91.
60. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology.* 2005;15(7):16R-28R.
61. Soldatos G, Cooper ME. Advanced glycation end products and vascular structure and function. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8(6):472-8.
62. Chang PC, Chien LY, Yeo JF, Wang YP, Chung MC, Chong LY, Kuo MY, Chen CH, Chiang HC, Ng BN, Lee QQ, Phay YK, Ng JR, Erk KY. Progression of periodontal destruction and the roles of advanced glycation end products in experimental diabetes. *J Periodontol.* 2013;84(3):379-88.
63. Altıngöz SM, Kurgan Ş, Önder C, Serdar MA, Ünlütürk U, Uyanık M, Başkal N, Tatakis DN, Günhan M. Salivary and serum oxidative stress biomarkers and advanced glycation end products in periodontitis patients with or without diabetes: A cross-sectional study. *J Periodontol.* 2021;92(9):1274-85.
64. Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S, Nomura M, Amano A. Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients. *J Periodontol.* 2006;77(1):15-20.
65. Polak D, Shapira L. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol.* 2018;45(2):150-166.
66. Zizzi A, Tirabassi G, Aspriello SD, Piemontese M, Rubini C, Lucarini G. Gingival advanced glycation end-products in diabetes mellitus-associated chronic periodontitis: an immunohistochemical study. *J Periodontal Res.* 2013;48(3):293-301.

67. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: A study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol* 2005;32:40-44.
68. Abbass MM, Korany NS, Salama AH, Dmytryk JJ, Safiejko-Mroczka B. The relationship between receptor for advanced glycation end products expression and the severity of periodontal disease in the gingiva of diabetic and non diabetic periodontitis patients. *Arch Oral Biol.* 2012;57(10):1342-54.
69. Detzen L, Cheng B, Chen CY, Papapanou PN, Lalla E. Soluble Forms of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) in Periodontitis. *Sci Rep.* 2019;9(1):8170.
70. Ilea A, Băbțan AM, Boșca BA, Crișan M, Petrescu NB, Collino M, Sainz RM, Gerlach JQ, Câmpian RS. Advanced glycation end products (AGEs) in oral pathology. *Arch Oral Biol.* 2018;93:22-30.
71. Guo M, Liu L, Zhang J, Liu M. Role of Reactive Oxygen Species and Advanced Glycation End Products in the Malfunctioning of Dental Implants. *West Indian Med J.* 2015;64(4):419-23.
72. Plemmenos G, Piperi C. Pathogenic Molecular Mechanisms in Periodontitis and Peri-Implantitis: Role of Advanced Glycation End Products. *Life (Basel).* 2022;12(2):218.
73. Li DX, Deng TZ, Lv J, Ke J. Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) induce apoptosis of periodontal ligament fibroblasts. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(12):1036-43.
74. Murillo J, Wang Y, Xu X, Klebe RJ, Chen Z, Zardeneta G, Pal S, Mikhailova M, Steffensen B. Advanced glycation of type I collagen and fibronectin modifies periodontal cell behavior. *J Periodontol.* 2008;79(11):2190-9.
75. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin L. Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2009;80(7):1166-73.
76. Jafari Nakhjavani MR, Jafarpour M, Ghorbanihaghjo A, Abedi Azar S, Malek Mahdavi A. Relationship between serum-soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol.* 2019;29(6):943-48.
77. Knani I, Bouzidi H, Zrour S, Bergaoui N, Hammami M, Kerkeni M. Increased serum concentrations of N ξ -carboxymethyllysine are related to presence and severity of rheumatoid arthritis. *Ann Clin Biochem* 2018;55(4):430–6.
78. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res.* 2004;95(3), 233–8.
79. Drinda S, Franke S, Canet CC, et al. Identification of the advanced glycation end products N ϵ -carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002;61:488-92.

80. Moser B, Wendt TM, Ankersmit JH, Hofmann M, Bucciarelli LG, Hudson BI, et al. Blockade of receptor for age (RAGE) suppresses T lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte culture. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2003; 22
81. Najafizadeh SR, Amiri K, Moghaddassi M, Khanmohammadi S, Mirmiranpour H, Nakhjavani M. Advanced glycation end products, advanced oxidation protein products, and ferric reducing ability of plasma in patients with rheumatoid arthritis: a focus on activity scores. *Clin Rheumatol*. 2021.
82. Pérez-García C, Salman-Monte T, Carrión-Barbera I, Tio L, Triginer L, Polino L, Llorente J, Beltran-Catalán E, Pros-Simon A, Monfort Faure J. Valoración de los valores de los productos finales de la glicación (AGEs) en artritis reumatoide y comparación con población general. *Reumatol Clin*. 2020;16:59
83. Velasco-Corredor WE, Aranzazu Moya GC, Hernández Castañeda AA. Assessment of glycosylated hemoglobin (HbA1c) in type 2 diabetics before and after non-surgical periodontal treatment. A short-term follow-up study. *Brazilian J. Oral Sci*. 2018;17:1-12.
84. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
85. Straka M, Trapezanlidis M, Dzupa P, Pijak R. Associations between marginal periodontitis and rheumatoid arthritis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33(1):16-20.
86. Devangelio E, Santilli F, Formoso G, et al. Soluble RAGE in type 2 diabetes: association with oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2007;15;43:511-518.
87. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(7):426-40.
88. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16(3):408.
89. Fang H, Yang K, Tang P, Zhao N, Ma R, Luo X, Liu Q. Glycosylation end products mediate damage and apoptosis of periodontal ligament stem cells induced by the JNK-mitochondrial pathway. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(13):12850-68.
90. van Vollenhoven RF. Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye.. *BMC Med*. 2009;7:12.
91. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum*. 2010;62(6):1576-82.
92. Scher JU, Úbeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, Lipuma L, Attur M, Pillinger MH, Weissmann G, Littman DR, Pamer EG, Bretz WA, Abramson SB. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis rheum*. 2012;64(10):3083-94.
93. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Productos finales dietéticos de glicación avanzada y envejecimiento. *Nutrientes*. 2010;2(12):1247-6

94. Cardiel MH, Carrillo S, Pérez M et al. Update of the Mexican College of Rheumatology guidelines for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis, 2018. *Reumatol Clin*. 2021;17(4):215-28.
95. Schäffer L. Glycated lysine increases in serum samples stored at -20 degrees C. *Clin Chem*. 1988;34(9):1906-8.
96. Reynolds AN, Harper M, Venn BJ, Mann J. Glycated albumin is stable in plasma when exposed to common laboratory conditions and comparable when drawn from venous or capillary sites. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(2):e22236.
97. Gaens KH, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24(1):4-11.
98. Inan-Eroglu E, Ayaz A, Buyuktuncer Z. Formation of advanced glycation endproducts in foods during cooking process and underlying mechanisms: a comprehensive review of experimental studies. *Nutr Res Rev*. 2020;33(1):77-89.