



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTOS DE:
ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS AVANZADAS,
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSIDAD DE CHILE.**

**“PERIODONTITIS EXPERIMENTAL Y MODELO *IN VIVO* DE ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER: COMPARACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN,
APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL”**

Sebastián Alejandro Cordero Quezada

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asistente Dr. Jaime Andrés Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS

**Prof. Asociada Dra. Andrea Paula-Lima
Prof. Asistente Dra. Samanta Melgar Rodríguez
Dra. Jamileth More de la Cruz**

**Adscrito a Proyecto FIOUCh C19-04, RDP-IADR 2017-2019,
RDP-IADR 2021-2023.**

Santiago - Chile

2022



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTOS DE:
ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS AVANZADAS,
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSIDAD DE CHILE.**

**“PERIODONTITIS EXPERIMENTAL Y MODELO *IN VIVO* DE ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER: COMPARACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN,
APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL”**

Sebastián Alejandro Cordero Quezada

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asistente Dr. Jaime Andrés Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS

**Prof. Asociada Dra. Andrea Paula-Lima
Prof. Asistente Dra. Samanta Melgar Rodríguez
Dra. Jamieth More de la Cruz**

**Adscrito a Proyecto FIOUCh C19-04, RDP-IADR 2017-2019, RDP-IADR 2021-
2023.**

Santiago – Chile

2022

DEDICATORIA

Dedicar este trabajo, que es el punto cúlmine de mi etapa universitaria, a mi familia. Mi madre Yislen. Freddy, mi padre. Ignacio, mi querido hermano menor. Priscilla, mi tía quien ha sido fundamental en este último tiempo, junto a mi primo Vicente.

Mis abuelos. Paternos como Alfredo y Casilda, quienes me entregaron su amor cada vez que los visitaba y estaban atentos a mi progreso. Siempre fue necesaria su palabra de ánimo y sus mejores deseos.

Y a quienes no están conmigo hoy en día, mis abuelo maternos. Rosa Amalia, mi abuela, quien no pudo verme en mi culminación de etapas básica, media y profesional. Y mi abuelo Jaime, quien fuera mi segundo padre, quien siempre estuvo preocupado por mí y que nos dejó hace ya casi 4 años. Los extraño como el primer día y no tengo duda que donde sea que estén, me están acompañando y están orgullosos de su nieto mayor.

Finalmente, dedicarme a mí este trabajo. Dedicármelo por todo el esfuerzo realizado, todo el sacrificio hecho. El poder ser resiliente ante las adversidades de la vida y poder seguir adelante. Por ser disciplinado y por cumplir con todas las responsabilidades que tenía, ya que era consciente de todo lo que había pasado para llegar a tener la oportunidad de estudiar una carrera profesional y del sacrificio de mi familia. Dedicármelo por nunca rendirme pese a que hubo muchos momentos negros en esta etapa, más de que lo uno quisiera. Sin embargo, y sin negar mis sentimientos, di lo mejor de mí en cada momento, lo que me llevó a este punto. Donde estoy a punto de ser un profesional y seguir creciendo como persona.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera agradecer a quienes han sido un pilar fundamental en mi vida desde que nací, mi familia. Agradecer a mi mamá Yislen y mi papá Freddy por su apoyo constante y por siempre creer en mí. Gracias por el aliento, por cada palabra de ánimo y consejos dados, gracias por el sacrificio que han hecho por mí desde el primer día, gracias por todo el esfuerzo que han puesto para poder tener la oportunidad de ser un profesional en mi vida. Sin duda todo el esfuerzo que realizaron ha valido la pena. Gracias por su amor y gracias por ser unos excelentes mamá y papá. No puedo no agradecer a mi hermano menor Ignacio, quien se convirtió en mi mejor amigo y siempre estar presente para darme ánimo y ayudarme en mis peores momentos anímicos.

Agradecer a los amigos y amigas de generación que realicé en esta etapa universitaria, quienes me recibieron y acogieron con mucho cariño desde el primer día, haciendo así mi adaptación, y mi estancia en Santiago, más amena y haciéndome sentir que no estaba sólo. Feñita Campos, Palito, Conito, Joshua, Nico Díaz, Peñita, Frijol, Nico Freire, Sebita Soto y Oscar... Siempre los llevaré en mi corazón y mis recuerdos.

Dar gracias también a quienes compartí el día a día en la querida residencia universitaria Amanda Labarca. Claudio Labarca, Camilo Díaz, Matías Arteaga, Seba Marina y Matías Avendaño, con quienes compartí lindos momentos cotidianos y aportaron cada uno un granito de arena con su compañía diaria. No puedo olvidar a Hugo y Gabi, con quienes viví en 2021, quienes también me apoyaron y me animaron cuando todo estaba cuesta arriba. No olvidaré los buenos momentos vividos.

Agradecer a docentes clínicos que, aparte de ser unos excelentes docentes y entregar sus conocimientos con mucha dedicación, son unas excelentes personas y que llevaré los mejores recuerdos de ellos. Dr. Milla, Dra. Natalia Castro, Dr. Trujillo, Dra. Matamala, Dra. Reinero, Dr. Ehrmantraut y Dra. Concha

No puedo olvidar también dar gracias a mis equipo de fútbol y baby fútbol. Dar gracias a quienes formaron parte del equipo de fútbol de la facultad desde 2016 a

2021, donde me recreé y podía despejar mi mente. Gracias también a los integrantes de Algaretes FC, donde reafirmamos nuestra amistad. No existe nada mejor que jugar con amigos. Un orgullo haber sido su capitán todos estos años.

Dar gracias especiales a la profesora Claudia Lefimil y a Rina Castillo, quienes me apoyaron y ayudaron a salir adelante en mi peores momentos, y que, sin su ayuda, la historia pudo haber sido distinta.

Por último y no menos importante, agradecer a mi docente tutor, Dr. Jaime Díaz-Zúñiga y mis docentes tutoras, quienes me ayudaron bastante con sus conocimientos y observaciones, e hicieron que este proceso de tesis, desconocido y complejo haya sido una etapa de mucho aprendizaje y de inolvidables logros.

PRODUCTIVIDAD

1. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES

- i. **XXXIII Reunión Anual IADR División Chile 2021. 20 agosto de 2021.**
Trabajo presentado: *“Periodontitis and Alzheimer’s Experimental Models: Neuroinflammation and Cognitive Status Comparison”*. (Anexo 1)
- ii. **XII Encuentro científico CCEO Universidad de Chile. 17 y 18 diciembre de 2021.**
Trabajo presentado: *“Periodontitis y modelos experimentales de Alzheimer: comparación de neuroinflamación y estado cognitivo”*

2. PREMIOS

- i. **Premio Colgate Palmolive (Anexo 2)**
Congreso: XXXIII Reunión Anual IADR División Chile 2021. 20 agosto de 2021.
Trabajo presentado: *“Periodontitis and Alzheimer’s Experimental Models: Neuroinflammation and Cognitive Status Comparison”*.

ÍNDICE

1.RESUMEN	10
2.INTRODUCCIÓN	12
2.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12
2.2 <i>Enfermedad de Alzheimer, neuroinflamación, amiloide β y proteína Tau</i>	15
2.3 <i>Rol de los microorganismos en la patogenia de EA</i>	17
2.4 <i>Planteamiento del problema</i>	19
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 <i>Hipótesis</i>	20
3.2 <i>Objetivo general</i>	20
3.3 <i>Objetivos específicos</i>	20
4.METODOLOGÍA	22
4.1. <i>Modelo de infección periodontal y enfermedad de Alzheimer</i>	22
4.2. <i>Cultivo bacteriano y curva de crecimiento bacteriano</i>	23
4.3. <i>Oasis Maze</i>	24
4.4. <i>Obtención de muestras</i>	24
4.4.1. <i>Extracción de sangre periférica y cerebro</i>	24
4.4.2. <i>Extracción de hueso maxilar</i>	25
4.4.3. <i>Extracción de cerebro para inmunofluorescencia</i>	25
4.5. <i>Cuantificación de mediadores inflamatorios y resorción ósea</i>	26
4.5.1. <i>Cuantificación de resorción ósea</i>	26
4.5.2. <i>Detección de moléculas mediante ELISA</i>	26
4.5.3. <i>Cuantificación de malondialdehído</i>	27
4.6. <i>Análisis histológico</i>	27
4.7. <i>Análisis de datos</i>	27
5.RESULTADOS	29
5.1 <i>Cuantificación de la resorción ósea.</i>	29
5.2 <i>Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios.</i>	30
5.3 <i>Aprendizaje y memoria espacial</i>	33
5.4 <i>Niveles de $A\beta_{42}$ y MDA en hipocampo.</i>	35
5.5 <i>Activación de astrocitos en hipocampo.</i>	36
5.6 <i>Razón proteína Tau fosforilada y proteína Tau total.</i>	40
6. DISCUSIÓN	44

7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS	52
9. ANEXOS	68
9.1 Anexo N°1	68
9.2 Anexo N°2	68
9.3 Anexo N°3	69
9.4 Anexo N°4	70
9.5 Anexo N°5	71

1. RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible caracterizada por generar un estado inflamatorio crónico de bajo grado. La causa principal es la disbiosis de la microbiota subgingival, que induce una respuesta inmune en el hospedero que desencadena la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Recientemente, diversos estudios han vinculado la disbiosis y la inflamación periodontal con la neuroinflamación y neurodegeneración. Sin embargo, no está claro si la periodontitis experimental es capaz de inducir un deterioro neurológico equivalente a la Enfermedad de Alzheimer (EA), de manera similar a lo observado en los modelos experimentales de EA. Así, este trabajo busca determinar si el modelo experimental de periodontitis inducido por mono-infección de *P. gingivalis* induce neuroinflamación, astrogliosis o alteraciones cognitivas de manera similar a lo observado en un modelo de EA.

Metodología: se utilizaron 24 ratas *Sprague-Dawley* macho de 6 semanas de edad, divididos en 4 grupos de 6 animales cada uno: 1) Periodontitis experimental, 2) Control de periodontitis experimental, 3) EA experimental y 4) Control de EA. Para el modelo de periodontitis experimental, se inocularon 10^{10} UFC/mL en 100 μ L de volumen de la cepa W50 de *P. gingivalis* en la mucosa palatina. El grupo control de periodontitis experimental, fue generado mediante inoculación del medio de transporte bacteriano. Para inducir EA se realizaron 3 inyecciones bilaterales, cada una de 0,5 μ L de oligómeros de amiloide β ($A\beta$) en la región CA3 del hipocampo, mediante cánulas guías previamente implantadas. El grupo control de EA, fue generado mediante 3 inyecciones bilaterales e intra-hipocampales de 0,5 μ L de solución salina cada una. Para evaluar el efecto cognitivo de la periodontitis o la EA, todos los animales fueron entrenados en el *OASIS Maze*, que es un protocolo conductual que evalúa la memoria y aprendizaje espacial. Además, a partir de de suero y homogenizados de hipocampo se cuantificaron mediadores pro-inflamatorios y moléculas asociadas a la EA. Finalmente, mediante inmunofluorescencia se observó la morfología y el número de astrocitos en las distintas regiones del hipocampo.

Resultados: tanto en la periodontitis como en la EA experimental se detectó neuroinflamación, astrogliosis y alteración en el aprendizaje y memoria espacial, en comparación a sus respectivos controles. Además, no se detectaron diferencias entre el modelo de EA con el de periodontitis.

Discusión: La periodontitis experimental inducida por mono-infección de *P. gingivalis* es capaz de inducir cambios con la misma severidad a nivel de hipocampo que la inducida por la inoculación de A β O $_2$ s. Esto sugiere que la periodontitis experimental induce cambios similares a la EA.

2. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible producida por la disbiosis de la microbiota subgingival (Hajishengallis y cols., 2012; Hajishengallis, 2014; Hajishengallis, 2015). Entre las bacterias responsables de esta disbiosis se describen *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis* y *Porphyromonas gingivalis*, siendo esta última la que se considera clave (*keystone*) para el inicio y progresión de la periodontitis (Darveau y cols., 2012; Hajishengallis y cols., 2012; Hajishengallis, 2014). La principal manifestación de la periodontitis es la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, que se desencadena por una respuesta inmune por parte de células del hospedero, tales como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) (Garlet, 2010; Hernández y cols., 2011; Silva y cols., 2015). Estas células pueden secretar citoquinas, como interleuquinas (IL)-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor* TNF)- α , quimioquinas, metaloproteinasas de matriz (del inglés *matrix metalloproteinases*, MMPs), factores de crecimiento y factores pro-resortivos, en respuesta a determinadas bacterias que residen en la microbiota subgingival (d'Empaire, 2006; Díaz-Zúñiga y cols., 2014; Díaz-Zúñiga y cols., 2015; Laine y cols., 1996; Soto et al. 2015; Vernal y cols., 2014a; Vernal y cols., 2014b; Vernal y cols., 2008). Entre las bacterias *keystone*, *P. gingivalis* es la más prevalente en sitios afectados por periodontitis (Hajishengallis y cols., 2012; Hajishengallis, 2014) .

2.1 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis es una bacteria Gram-negativo, capnofílica y asacarolítica, que posee la capacidad de colonizar la microbiota subgingival, invadir al hospedero, inducir una respuesta inmuno-inflamatoria local, destruir los tejidos periodontales y, posteriormente, ingresar a la circulación periférica e inducir la aterogénesis aórtica y coronaria, la secreción de proteína C reactiva (del inglés *C Reactive Protein*, CRP) e IL-6 a nivel hepático y de colonizar los vasos placentarios generando riesgo de parto prematuro (Bagavad y cols., 2019; Demmer y cols., 2010; López y cols., 2005; López y cols., 2002; Thanakun y Azumi, 2016; Udagawa y cols., 2018). En muestras de fluido crevicular gingival (FCG) y biopsias de tejido gingival afectados de

periodontitis, la presencia de *P. gingivalis* se asocia con un incremento en los niveles de expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (del inglés *Receptor of Activator Nuclear Factor κ B Ligand*, RANKL), de secreción de interferón (IFN)- γ y de infiltrado de linfocitos Th1 y Th17 (Dutzan y cols., 2009; Vernal y cols., 2005; Vernal y cols., 2006; Yamamoto y cols., 2006). Diversos estudios sustentan el rol etiológico de *P. gingivalis* en la periodontitis y su detección se relaciona con la destrucción progresiva de los tejidos periodontales (Silva y cols., 2015; Socransky y cols., 1999; van Winkelhoff y cols., 2002).

Esta respuesta inmune del hospedero frente a *P. gingivalis* está dada por distintos factores de virulencia propios de la bacteria, como gingipaínas, fimbria, lipopolisacárido (LPS) y polisacáridos capsulares, que le otorgan funciones diferentes y se asocian con su patogenicidad. Los polisacáridos capsulares, también llamados antígenos K, constituyen la principal macromolécula de la membrana externa y es la responsable de la serotipificación, que define su clasificación taxonómica y contribuye con la virulencia de *P. gingivalis* (van Winkelhoff y cols., 1993; Whitfield and Roberts, 1999). Sobre la base de su antigenicidad se describen 6 serotipos capsulares (K1 a K6) y cepas no encapsuladas o K⁻ (Laine y cols., 1997; van Winkelhoff y cols., 1993).

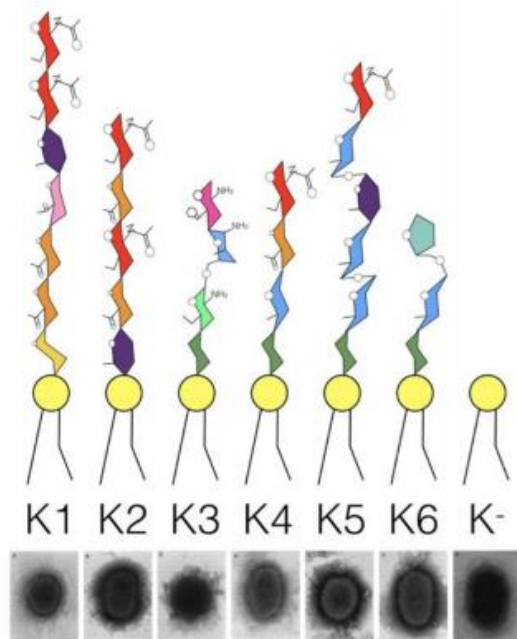


Figura 1. Estructura de los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis*. Imagen extraída de Díaz-Zúñiga y cols., 2019, donde se aprecia en las imágenes de microscopía electrónica de barrido tomadas de Laine y cols., 1996, y el esquema estructural de cada uno de los serotipos capsulares de *P. gingivalis*.

Distintos estudios demuestran que existe una respuesta diferencial por parte de las células inmunes del hospedero frente a los distintos serotipos de *P. gingivalis* (d'Empaire y cols, 2006; Vernal y cols, 2014a). Al estimular células dendríticas con los distintos serotipos de *P. gingivalis*, se ha evidenciado un incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias ante la presencia de los serotipos K1 o K2, una respuesta moduladora ante K3, K4, K5 o K6 y una respuesta reguladora ante la cepa no encapsulada K⁻ (Vernal y cols., 2008; Vernal y cols., 2009). Respecto a la respuesta en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *P. gingivalis*, se detectó una respuesta Th1 y Th17 ante los serotipos K1 o K2, una respuesta Th2 ante K3, K4, K5 o K6 y una respuesta T reguladora (Treg) ante la cepa K⁻, no encapsulada (Vernal y cols., 2014a).

En modelos animales de ratones o ratas *wild-type*, al inducir periodontitis experimental con el serotipo K1, se observa la generación de abscesos en sitios distantes al sitio de inoculación, mayor resorción ósea y una respuesta predominantemente Th1 y Th17, en comparación con la cepa no encapsulada K⁻ (Díaz-Zúñiga y cols, 2020; Laine and van Winkelhoff, 1998; Monasterio y cols., 2018b). Así, se ha logrado identificar que los serotipos K1 o K2 se asocian a inflamación y resorción ósea mediante una respuesta predominantemente Th17 y Th22, además de Th1 y Th9, en comparación con los otros serotipos capsulares que se asocian a una condición de salud o remisión de la enfermedad mediante la estimulación de una respuesta linfocitaria predominantemente Th2 o Treg (Vernal y cols., 2009; Vernal y cols., 2014^a; Vernal y cols., 2014b).

En términos generales, la elevada concentración de mediadores inflamatorios originados en los tejidos periodontales por las células inmunes, así como la difusión de bacterias o sus factores de virulencia a la circulación sanguínea periférica, vinculan a la periodontitis con el desarrollo de otras enfermedades tales como parto prematuro y bajo peso al nacer (López y cols., 2005) y más recientemente, se especula que podría participar del inicio de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Díaz-Zúñiga y cols., 2020).

2.2 Enfermedad de Alzheimer, neuroinflamación, amiloide β y proteína Tau

La EA es el desorden neurodegenerativo más prevalente en la población mayor de 60 años a nivel mundial (Alzheimer's Disease International, 2019) y, lamentablemente, en Chile no existen datos oficiales de su prevalencia. La EA se caracteriza clásicamente por la acumulación del péptido de amiloide β ($A\beta$) y la formación de ovillos neurofibrilares (del inglés *neurofibrillary tangles*, NFT), compuesto por la proteína Tau hiperfosforilada en el cerebro, acompañado del deterioro cognitivo (Forner y cols., 2017). La hipótesis aceptada para explicar la patogénesis de la EA es la cascada amiloide, la que se inicia con los eventos neuroinflamatorios que inducen en las microglías la producción de mediadores pro-inflamatorios, lo que genera la modificación del fenotipo de los astrocitos (Hardy y Allsops, 1991; Hardy y Higgins, 1992). Los astrocitos fisiológicos cambian a un fenotipo de astrocito reactivo caracterizado por la producción de mediadores pro-inflamatorios y un incremento en la producción de la proteína precursora de amiloide (del inglés *Amyloid Precursor Protein*, APP) y de las enzimas β y γ -secretasas que producirán $A\beta$ (Fang y cols., 2016; Glass y cols., 2010; Heppner y cols., 2015). El incremento en la producción de $A\beta$ en las condiciones inflamatorias permitirá su agregación y la formación de placas seniles extracelulares (Frost & Li, 2017). Además, el cambio fenotípico del astrocito genera un desbalance energético, metabólico y oxidativo en las neuronas, las que ven afectada la fosforilación y desfosforilación de la proteína Tau (Frost & Li, 2017). Así, la hiperfosforilación de la proteína Tau origina los NTF intracelulares (Cline y cols., 2018) que se relaciona con la neurodegeneración (Abbayya y cols., 2015).

Por otro lado, otra teoría propuesta, es la teoría neuroinflamatoria, que describe que la presencia crónica de mediadores pro-inflamatorios en la circulación periférica producidos por una respuesta inmune crónica distante al cerebro pueden afectar la homeostasis del cerebro (Heneka y cols., 2015). En este contexto, moléculas inflamatorias tales como IL- 1β , IL-6 y TNF- α , podrían difundir por la barrera hematoencefálica (BHE) y ser reconocidas por los receptores de citoquinas de las microglías. Inicialmente, las microglías pueden contrastar la inflamación actuando como microglías moduladoras o M2, mediante la secreción de IL-4, IL-10 y factor de crecimiento transformante (del inglés *Transforming Growth Factor*, TGF)- β 1, o

agravarla convirtiéndose en el fenotipo pro-inflamatorio M1, que se caracteriza por la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Alonso y cols. 1997; Block y Hong, 2005; Doens y Fernández, 2014). Las microglías son las células fagocíticas del cerebro y se reconoce que la activación crónica de los receptores tipo Toll (del inglés *Toll Like Receptor*, TLR)2 o TLR4 —clásicamente activados por antígenos bacterianos—, TLR6, TLR9, o de sus correceptores, como lo son CD36, CD14 y CD47, como también del receptor desencadenante expresado por células mieloides 2 (del inglés *triggering receptor expressed by myeloid cells 2*, TREM)-1 y TREM2, SCARA1, integrina $\alpha 6\beta 1$, entre otros, inducen una diferenciación al fenotipo M1 (Block y Hong, 2005; Heneka y cols., 2015; Heneka y cols., 2014). El incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y la respuesta M1 induciría la modificación del fenotipo astrocitario. Así, las microglías M1 y los astrocitos reactivos inducirían neuroinflamación, la acumulación del péptido A β extracelular y el incremento de la proteína Tau hiperfosforilada intracelular, desencadenando la producción de los marcadores histopatológicos de la EA (Fang y cols., 2016; Glass y cols., 2010; Heppner y cols., 2015).

Los péptidos A β pueden detectarse tanto en su forma soluble como insoluble, donde se organizan como fibrillas, protofibrillas y oligómeros. En efecto, los oligómeros de A β (A β Os) constituyen la forma más tóxica y soluble (Paula-Lima y cols., 2011). Así, en cerebros de pacientes afectados por la EA, se detectan tanto los A β Os solubles como agregados de A β insolubles, pero sólo la presencia de A β Os en el cerebro o LCE se ha correlacionado directamente con la pérdida de sinapsis y el deterioro cognitivo (Lue y cols; 1999, Mastrangelo y cols., 2006; Santos y cols., 2012). Es importante notar que el diagnóstico patológico de la EA incluye la detección del péptido A β , por lo que su presencia es necesaria para establecer que se trata de EA (Jack y Vemuri, 2018). En este contexto, existe un método experimental estandarizado para inducir EA en roedores, donde mediante la inoculación de A β Os sintéticos en la región CA3 del hipocampo se inducen eventos inflamatorios (Calvo-Flores Guzmán y cols., 2020a), aumento del estrés oxidativo y alteración del aprendizaje y memoria espacial (More y cols., 2018, Figueroa y cols., 2020), similares a la EA, que evidencia en los animales la alteración del aprendizaje y la memoria espacial (More y cols., 2018).

De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la formación de NFTs es un proceso neurodegenerativo secundario a la agregación del A β Os en la EA (Alonso y cols., 1997; Santacruz y cols., 2005; Wang y Mandelkow, 2016). Los NFTs son conformados por una forma hiperfosforilada de la proteína Tau, que forma parte de las proteínas asociadas a microtúbulos y se expresa principalmente en neuronas. Al fosforilarse, la proteína Tau cumple un rol esencial en el ensamblaje de los monómeros de tubulina y la estabilización de los microtúbulos a la dineína y kinesina en los axones neuronales, contribuyendo al mantenimiento de la forma celular y permiten el transporte vesicular (Danysz, 2001; Minghetti y cols., 2005; Halliwell, 2006; Lin y Beal, 2006). Tanto los A β Os como la respuesta inmune inducida ante A β Os genera la hiperfosforilación de la proteína Tau y la formación de NFTs, provocando disfunción axonal que a su vez, genera mayor acumulación de A β Os en los espacios sinápticos (Ferreira y cols., 2015; Elobeid y cols., 2016; Xu y cols., 2016).

2.3 Rol de los microorganismos en la patogenia de EA

Actualmente, existen diversos estudios epidemiológicos que han evaluado la salud oral de pacientes afectados de EA. En ellos, existe una asociación entre la severidad de la EA o el grado de deterioro cognitivo con una mayor pérdida de dientes, mayor pérdida del nivel de inserción clínica, mayor índice gingival y mayor índice de sangrado (Aragón y cols, 2018; Gurav, 2014; Ide y cols, 2016; Kramer y cols., 2007; Martande y cols, 2014), indicando que existe una relación entre el aumento en la severidad del daño cognitivo y la presencia de periodontitis (Holmes y Cotterell, 2009; Ide y cols, 2016). Recientemente, se ha postulado que la periodontitis podría estar relacionada con el inicio o progresión de EA. El principal mecanismo de asociación sería mediante la migración de los microorganismos al cerebro durante toda la vida del individuo, los que se alojarían en distintas zonas del cerebro y, dependiendo de su virulencia, podrían desencadenar eventos neuroinflamatorios. En este sentido, varios estudios han demostrado la presencia de virus, tales como Virus del Herpes Simplex tipo 1 (VH1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), hongos tales como *Candida albicans* o bacterias, como *Borrelia burgdorferi* o *Treponema denticola* (Balin y cols, 1998; Heneka y cols, 2014; Heneka y cols, 2015,

Itzhaki y cols, 2016; Jamieson y cols, 1991; Miklossy y cols, 2006) en cerebros de pacientes afectados de EA. Cuando evaluaron la presencia de distintas espiroquetas orales en el cerebro identificaron la presencia de *T. denticola* en el hipocampo de sujetos que estaban afectados de EA. Además, *T. denticola* fue detectada en el ganglio trigeminal y en el núcleo pontino del nervio trigeminal. Así, se definió que al menos las espiroquetas, podrían migrar al cerebro vía nerviosa (Miklossy, 2015; Reviere y cols, 2002). De manera similar, se ha propuesto que bacterias de la microbiota respiratoria o intestinal podrían migrar al cerebro por el nervio olfatorio, vago o mesentérico (Conti y cols, 2003; Leung y cols, 2008). En términos generales, las bacterias de la microbiota oral capaces de inducir una disbiosis podrían potencialmente migrar al cerebro y participar del fenómeno neuroinflamatorio.

Más recientemente se ha propuesto la teoría infecciosa como un mecanismo adicional para explicar la patogenia de la EA. Esta teoría propone una invasión al cerebro por bacterias orales mediante dos mecanismos. El primer mecanismo de asociación entre la periodontitis y el cerebro sería mediante la difusión o circulación de los mediadores pro-inflamatorios generados en el tejido periodontal hacia el cerebro, a través de la circulación sanguínea periférica (Abbayya y cols, 2015). El segundo mecanismo, sería mediante la invasión directa de patógenos hacia el cerebro, los que pueden ser reconocidos por las microglías, vía TLR2 o 4 y así, iniciar una respuesta inflamatoria cerebral (Abbayya y cols, 2015). En efecto, tanto *T. denticola* como *P. gingivalis* se han detectado en el LCE o el IV ventrículo cerebral de sujetos que fallecieron y estaban afectados de EA (Dominy y cols., 2019; Poole y cols., 2013; Reviere y cols., 2002). Estas bacterias o sus factores de virulencia pueden difundir a la circulación sanguínea y provocar daños a otros tejidos u órganos distantes a la cavidad oral. Los niveles aumentados de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α podrían incrementar la permeabilidad de la BHE e inducir su ruptura (Abbayya y cols, 2015, Poole y cols., 2013; Reviere y cols., 2002). En pacientes afectados de EA, los niveles de estas citoquinas en suero son mayores comparados con pacientes de la misma edad sin EA (Kramer y cols, 2009). Una vez en el cerebro, estas bacterias podrían ser reconocidas por los receptores tipo TLR4 de las microglías e inducir la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α generando como parte

de la respuesta cerebral, la activación de los astrocitos reactivos (Singhrao y Olsen, 2019). El astrocito reactivo secreta mayor cantidad de péptido A β , que tendría un rol antimicrobiano, con el objetivo de encapsular a las bacterias, facilitando su reconocimiento y posterior fagocitosis (Gosztyla y cols., 2018). Así, alrededor de la bacteria se genera un infiltrado de A β y microglías, creando regiones con un aumento en la concentración de mediadores inflamatorios, que podrían afectar la función de los astrocitos adyacentes (Kitazawa y cols., 2005; Lee y cols., 2008)

2.4 Planteamiento del problema

Recientemente, en un modelo de periodontitis experimental inducida por la inoculación palatina de distintas cepas de *P. gingivalis* se demostró que luego de 55 días se detecta la presencia de diversos factores de virulencia tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral (Díaz-Zúñiga y cols., 2020). La detección de estos factores de virulencia fue independiente de la virulencia bacteriana, detectándose la presencia de los serotipos K1, K2, K4 o la cepa no encapsulada K⁻. No obstante, los serotipos K1 y K2 se asociaron con la presencia de periodontitis y neuroinflamación, el serotipo K4 y la cepa no encapsulada K⁻ se asociaron con una respuesta moduladora. Además, la presencia de los serotipos K1 o K2 en el hipocampo con alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial similares a las reportadas previamente en un modelo experimental de la EA (More y cols., 2018; Figueroa y cols., 2020).

Considerando que la periodontitis se origina por la disbiosis de la microbiota subgingival y que existe susceptibilidad microbiológica, la cual depende del serotipo o cepa que coloniza al hospedero, sería interesante verificar si la periodontitis experimental inducida por el serotipo K1 de *P. gingivalis* es capaz de originar los eventos neuroinflamatorios similares a los generados por la EA experimental. Así, podríamos establecer como se comparan los efectos neuroinflamatorios en estos dos modelos experimentales, que inducen neuroinflamación y alteraciones de memoria espacial y aprendizaje.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La periodontitis experimental inducida por la inoculación del serotipo K1 de *P. gingivalis* desencadena neuroinflamación, alteración en la memoria espacial y activación de astrocitos de manera equivalente al producido por la inyección bilateral de oligómeros de A β en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley *wild-type*.

3.2 Objetivo general

Determinar si la periodontitis experimental inducida por la inoculación del serotipo K1 de *P. gingivalis* desencadena eventos neuroinflamatorios, defectos cognitivos y alteración en la memoria espacial equivalentes a los producidos a un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer inducido por inyección bilateral de oligómeros de A β en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley *wild-type*.

3.3 Objetivos específicos

1. Evaluar el aprendizaje y memoria espacial en ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis inducida por mono-infección o de enfermedad de Alzheimer inducidas por inyección de oligómeros de A β .
2. Cuantificar los niveles de producción de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ en homogenizados de hipocampo y suero de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis inducida por mono-infección o de enfermedad de Alzheimer inducidas por inyección de oligómeros de A β .
3. Determinar la presencia de astrogliosis en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis inducida por mono-infección o de enfermedad de Alzheimer inducidas por inyección de oligómeros de A β .
4. Comparar el aprendizaje y memoria espacial, los niveles de producción de los mediadores pro-inflamatorios y la activación de astrocitos en ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis inducida por mono-

infección con ratas afectadas de enfermedad de Alzheimer inducidas por inyección de oligómeros de A β .

4. METODOLOGÍA

4.1. Modelo de infección periodontal y enfermedad de Alzheimer

Para la inducción de la infección periodontal, EA o controles, se utilizaron 24 ratas *Sprague-Dawley* macho de 6 semanas de edad, divididos en grupos de 6 ratas cada uno, que fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas se alojaron en jaulas separadas, con filtros de aire y en condiciones estándar bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad, a $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 40-70% de humedad relativa, con agua y alimentación *ad libitum*, excepto cuando se indicaron otras condiciones.

Cada animal fue distribuido de manera aleatoria a los distintos grupos experimentales o control. Para generar el modelo de periodontitis experimental, se utilizaron 6 animales de 6 semanas de edad que fueron anestesiados con isoflurano 3% e inoculados mediante una inyección en la mucosa palatina, frente al primer molar, posterior a las rugas palatinas, con 100 μL de medio de cultivo bacteriano con 1×10^{10} UFC/mL del serotipo K1 (cepa W50) de *P. gingivalis*, tal como fue descrito anteriormente (Díaz-Zúñiga et al., 2020). La inoculación se realizó en 2 ocasiones, el día 0 y el día 7 y los animales se mantuvieron en la unidad de mantención de animales sin otras intervenciones, hasta que cumplieron un período de 45 días post tratamiento (Garlet y cols., 2007, Trombone y cols., 2009). Como control de inyección se utilizaron 6 ratas inyectadas con medio de transporte de bacterias (Ratas *sham*). Luego de 45 días, se procedió a evaluar el aprendizaje y la memoria espacial mediante el OASIS Maze, que es una versión seca del Laberinto Acuático de Morris (Clark y cols., 2005), con un protocolo experimental resumido a continuación en el ítem 4.3 (More y cols., 2018).

Para inducir la EA de manera experimental, se utilizó un protocolo descrito previamente (More y cols., 2018). Brevemente y bajo anestesia general con isoflurano 3%, 12 animales se ubicaron en un estereotáxico e instalaron cánulas de inyección en la región CA3 bilateralmente, para inyectar A β Os (A β 1-42 Bachem Inc., Torrance, CA) (6 animales experimentales) o solución salina NaCl 0,9%, pH 7,4 (6 animales control). A cada animal se le realizaron 3 inoculaciones de A β Os o solución

salina en un período de 48 hrs distribuidas de la siguiente manera: la primera inyección 24 hrs antes del inicio de la primera tarea de OASIS Maze, la segunda inyección se realizó 1 hora posterior a la primera tarea y la tercera inyección, 17 horas después de la segunda inyección. 2 horas posterior a la última inoculación, cada animal realizó el segundo día de tarea en el OASIS Maze. Todos los procedimientos fueron desarrollados con anterioridad y para el desarrollo de esta tesis se trabajó con las muestras biológicas obtenidas (el protocolo de extracción en detalle más adelante).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (17085-ODO-UCH) (Anexo N°3) y CBA 755 (FMUCH) y por el Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo N°4).

4.2. Cultivo bacteriano y curva de crecimiento bacteriano

Para la inoculación de bacterias en la mucosa palatina se utilizó la cepa encapsulada W50 (Serotipo K1) de *P. gingivalis* usada en estudios previos (Monasterio y cols., 2018b; Vernal y cols., 2009). Brevemente, la cepa de *P. gingivalis* W50 (K1), se cultivó en medio agar infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd, Ba-singstoke, Hampshire, England) a 37°C en condiciones de capnofilia (8% O₂ y 12% CO₂), usando el generador CampyGen™ (Oxoid Ltd). Luego la cepa se cultivó en 10 mL de caldo de cultivo BHI suplementado con hemina y menadiona hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 que fue medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm (Halo RB-10 UV-VIS Spectrophotometer, Dynamica, Germany). Se midieron lecturas de espectrofotómetro adicionales en distintos tiempos hasta que el microorganismo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO se tomó una muestra de 100 µL, la cual se diluyó de forma seriada (log₁₀) en tampón fosfato salino (PBS) y 100 µL de cada dilución se sembró en agar sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona. Luego de 5-7 días, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se contrastaron con las densidades ópticas correspondientes. Las curvas DO versus tiempo y DO versus UFC se graficaron para obtener un número conocido de bacterias en fase de crecimiento exponencial para realizar la inoculación con una concentración conocida de bacterias.

4.3. Oasis Maze

Para todos los animales, tanto experimentales como controles se procedió a evaluar el aprendizaje y la memoria espacial utilizando el protocolo de Oasis Maze. Para el modelo de periodontitis, luego de 45 días, el estrés se evaluó mediante un test de ansiedad, donde cada animal estuvo en la arena sin ningún pocillo y con la clave visual durante 15 min. Luego, cada animal fue privado de agua durante 23 horas previas a las sesiones de evaluación y se realizó el pre-entrenamiento que consistió en 10 min de actividad dentro de la arena con 21 pocillos con agua y una clave visual. Finalmente, se realizó el entrenamiento que consistió en 6 días de evaluación consecutiva, registrando 15 ensayos por día, cada uno con una duración de 1 min máximo o menos si el animal encuentra la recompensa ubicada en uno de los 21 pocillos presentes en la arena. La recompensa se ubicó en un solo pocillo sin modificar su ubicación durante los 15 ensayos, cambiando su ubicación durante los 6 días. Para el modelo de EA, a cada animal se le realizó una habituación o handling, luego, el test de ansiedad y el pre-entrenamiento. Posteriormente, se realizó la cirugía y un nuevo pre-entrenamiento para comenzar la tarea y las posteriores inoculaciones que se detallaron en el ítem 4.1 (Anexo 5). Cada video se registró mediante una cámara digital en posición cenital y analizó posteriormente utilizando el software MatLab (MathWorks, MITRE, MA, USA). Para cada video se registraron la distancia total recorrida por el animal (m), el tiempo de duración de cada ensayo (s), la tasa de éxito, y la razón de distancia observada v/s distancia ideal y la velocidad en actividad (cm/s).

4.4. Obtención de muestras

Después de 1 hora de finalizado el Oasis Maze, las ratas de todos los grupos experimentales o controles se eutanasiaron según las muestras a aislar, siendo distribuidas para cada grupo 4 ratas para extracción de sangre periférica y aislamiento de hipocampo y 2 ratas destinadas a histología.

4.4.1. Extracción de sangre periférica y cerebro

Una hora después de finalizar el Oasis Maze, 4 ratas por grupo se anestesiaron con Isoflurano al 3% utilizando sistema de anestesia controlada y se extrajeron de 2,5

a 3,5 mL de sangre periférica mediante punción cardíaca y se continuó con la eutanasia. La sangre se traspasó a un tubo Falcon de 50 mL y se incubó durante 30 min a 60°C, seguido de 5 min a 4°C y se centrifugó a 1.500 xg por 5 min para obtener el suero. El suero que se obtuvo se almacenó a -80°C.

En las mismas ratas, e inmediatamente después de ser eutanasiadas, el cerebro *ad integrum* se extrajo y mantuvo en una solución de disección compuesta por KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ mM, suplementado con Sacarosa 7,28%, dextrosa 0,18%, 2 mL de MgCl₂ 1M, 100 µL de CaCl₂ 1M y 1 mL de Piruvato 0,3 mM. De cada cerebro se aisló el hipocampo e inmediatamente se preservó en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

4.4.2. Extracción de hueso maxilar

Posteriormente, cada hemimaxilar se separó del resto del cráneo para aislarlo. Brevemente, con un bisturí N°15 se realizó una incisión inmediatamente anterior a la primera rugosidad palatina y se decoló toda la mucosa palatina. Luego, a cada hemimaxilar se eliminó todo el tejido blando y cartilaginoso e incubó secuencialmente durante 2 hrs en etanol 70%, seguido de etanol 90% y etanol 100%. Cada maxilar se almacenó en etanol 100% a temperatura ambiente hasta el análisis a realizar.

4.4.3. Extracción de cerebro para inmunofluorescencia

Luego de finalizado el Oasis Maze, 2 ratas por cada grupo se destinaron para análisis mediante inmunofluorescencia. Para el análisis histológico del cerebro, las ratas se perfundieron con 300 mL de solución salina 0,9% seguido de 300 mL de paraformaldehído (PFA) 4%. Luego de aislar el cerebro *ad integrum*, se almacenó durante 2 hrs en PFA 4% y posteriormente, en solución de sacarosa 30% con Azida de sodio. Una vez transcurridas 72 h se procedió a realizar cortes de 30 µm de grosor en crióstato y almacenaron en PBS 1x con azida de sodio a 4°C hasta su uso.

4.5. Cuantificación de mediadores inflamatorios y resorción ósea

Para confirmar que la inoculación bacteriana genera periodontitis experimental, en los animales inoculados con el serotipo K1 de *P. gingivalis* y las ratas *sham* se cuantificó la resorción ósea y los mediadores inflamatorios en mucosa palatina. La cuantificación de los mediadores pro-inflamatorios en suero se realizó para detectar inflamación sistémica y, en el hipocampo, para evaluar la neuroinflamación.

4.5.1. Cuantificación de resorción ósea

Para evaluar la posible pérdida de hueso, cada maxilar fue escaneado con un equipo Bruker microCT (SkyScan 1278; Bruker, Kontich, Belgium) utilizando los siguientes parámetros: 59 kV, 588 μ A, 0,5° de rotación y 360° de rango angular. Posteriormente se obtuvieron imágenes en 3D y la cuantificación de la resorción ósea fue realizada utilizando el software Nrecon (Bruker, Kontich, Belgium) según las mediciones descritas previamente (Park y cols., 2007). Brevemente, se realizaron mediciones lineales desde el límite amelocementario a la cresta ósea alveolar de todas las raíces de los molares superiores del lado derecho e izquierdo.

4.5.2. Detección de moléculas mediante ELISA

Para la cuantificación de las moléculas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ y A β 1-42 cada muestra se preparó según el siguiente protocolo. Cada hipocampo se descongeló y homogeneizó en una solución que contuvo Tris-HCl 0,5M, NaCl 2M, CaCl₂ 250 mM, Tx100 25% e inhibidor de proteasas. Brevemente, cada hipocampo se lavó con 1 mL de NaCl 0,9% 3 veces, para luego agregar 10 μ L de PBS por cada mg de peso de la muestra y se trituroó con un homogenizador eléctrico para luego centrifugar a 10.000 xg durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, midió la concentración en un espectrofotómetro (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) y almacenó en alícuotas de 200 μ L a -80°C.

A partir de 100 μ L de muestras de suero u homogenizado de hipocampo se cuantificó la secreción de las moléculas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ y A β 1-42 mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA), y se evaluó la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek).

4.5.3. Cuantificación de malondialdehído

Para determinar la lipoperoxidación, se cuantificó el malondialdehído (MDA) en homogeneizado de hipocampo mediante el método colorimétrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA). Brevemente, las muestras se sometieron a un tratamiento con ácido tricloroacético 0,6 N para precipitar cualquier proteína que pueda interferir con la lectura. Luego a partir de 50 μ L de cada muestra, se incubaron con el reactivo TBA y se leyó la densidad óptica de la placa a 532 nm. Luego de incubar de 2 a 3 horas a 50°C se leyó nuevamente la densidad óptica a 532 nm. Para cuantificar la concentración de las sustancias reactivas derivadas del ácido tiobarbitúrico, la lectura final se sustrajo a la lectura inicial y cuantificó según la curva concentración/densidad óptica obtenida de la curva estándar.

4.6. Análisis histológico

Para las inmuno-fluorescencias se utilizaron anticuerpos primarios anti-TubIII (Abcam, Ab18207), anti-GFAP (Abcam, ab10062), anti-phosphoTau (Phospho S404, Abcam, ab64193) y anti-Tau (Abcam, ab254150), seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón, cabra o conejo (Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 594 o Alexa Fluor[®] 647, Abcam US). Para poder visualizar los núcleos se utilizó un medio de montaje que contiene DAPI (Abcam, ab104139). La obtención de las imágenes se realizó mediante el Microscopio Confocal C2 Plus Espectral (Nikon, USA) y el análisis de las imágenes se realizó con los software NIS Elements Viewer (Nikon Instruments Inc., Mitsubishi, JPY) e ImageJ 5.0 (NIH, MD, USA).

4.7. Análisis de datos

Los datos de los niveles de secreción y expresión de citoquinas se expresaron como el valor promedio de la concentración (pg/mL) y niveles relativos de expresión \pm desviación estándar, respectivamente. Los datos del OASIS Maze se representó como el valor promedio en unidades de tiempo (s) o distancia (cm) \pm desviación estándar. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Levene y se analizaron utilizando la prueba ANOVA-Tukey. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc.,

Charlotte, NC, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p -value $<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de la resorción ósea.

Para confirmar que la inoculación palatina del serotipo K1 de *P. gingivalis* generó periodontitis experimental, se cuantificó la resorción ósea en cada hemimaxilar mediante microCT en los animales experimentales y *sham* (Díaz-Zúñiga et al, 2020). En este sentido, los ratones inoculados con el serotipo K1 de *P. gingivalis* presentaron resorción ósea patológica en comparación a las ratas *sham*, confirmando la presencia de periodontitis (Figura 2).

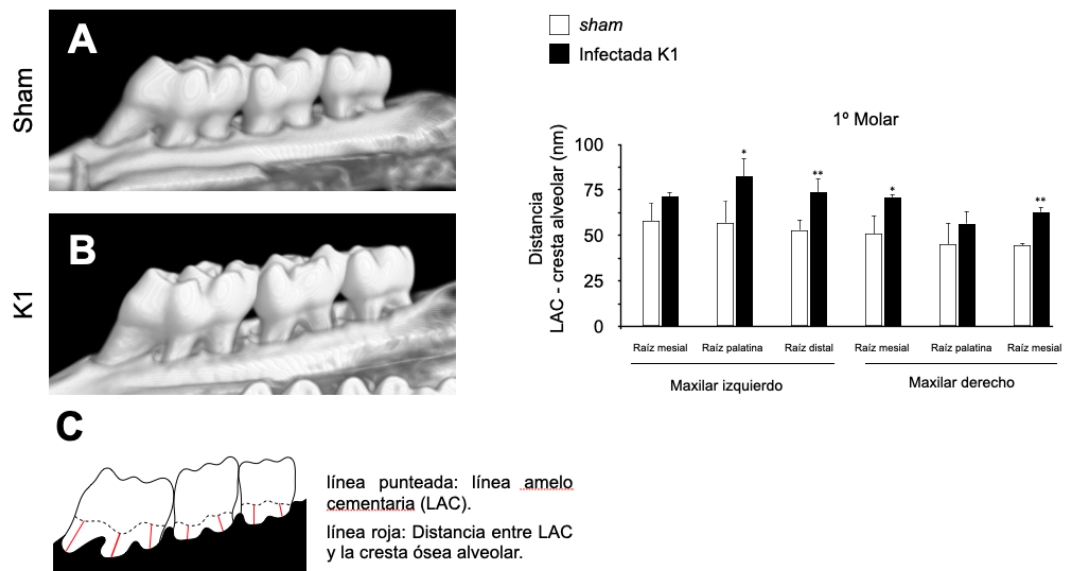


Figura N°2. Cuantificación de la resorción ósea en primeros molares maxilares de ratas con enfermedad periodontal experimental y su respectivo control . A partir de 4 ratas de ambos grupos se procedió a evaluar la distancia existente, en las tres raíces de los primeros molares maxilares, entre la línea amelocementaria y la cresta alveolar ósea. A y B: Imagen tomada con MicroCT donde se aprecia modelo en tres dimensiones las estructura dentaria de molares maxilares y de tejido óseo de soporte de ambos grupos. C: Esquema que indica los límites que fueron establecidos para determinar cuantitativamente la resorción ósea. LAC: Línea amelocementaria, nm: nanómetro. Diferencias entre grupo experimental con ratas control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.2 Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de producción de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ en muestras de suero y homogenizados de hipocampos de ratas en todos los grupos (Figura N°3).

Para el modelo de periodontitis experimental se detectó un incremento significativo en los niveles de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ en suero en comparación a las ratas controles. De manera similar, para el modelo de EA experimental se detectó un incremento en los niveles de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ . Es importante de destacar que para las citoquinas IL-1 β e IL-6 los niveles producidos fueron similares para ambos modelos experimentales. Curiosamente, al evaluar los niveles de IL-4 en el modelo de periodontitis experimental, se observó una disminución significativa en comparación con las ratas control, siendo similar a los niveles de los grupo control salino y EA experimental. En cuanto a IFN- γ , en muestras de suero se encontraron valores menores en el grupo de periodontitis experimental en comparación al grupo de EA experimental, siendo esta diferencia estadísticamente significativa y siendo mayor al grupo control *sham* y al grupo de control salino.

Al evaluar los mismos mediadores en muestras de hipocampo, se observaron diferencias para IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . En el modelo de periodontitis experimental, se detectó un incremento en los niveles de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en comparación a las ratas control. Contrariamente, para el modelo de EA sólo se detectó un incremento significativo en los niveles de IL-6 en comparación a las ratas controles. Para IFN- γ , de igual manera que en suero, también existió una menor concentración de esta molécula en el grupo de periodontitis en comparación al grupo de EA experimental, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, y de manera similar a lo observado en suero, en los homogenizados de hipocampo de las ratas afectadas de periodontitis también se observó una disminución significativa en los niveles secretados de IL-4 en comparación a su respectivo control, siendo también menor, pero no significativamente, a los grupos control salino y de EA experimental. Finalmente, y al igual que lo observado en las muestras de suero, es importante destacar que las concentraciones de IL-1 β e IL-6 fueron similares entre ambas condiciones experimentales. Para los niveles de IL-10

no se observaron diferencias significativas ni en suero ni en hipocampo en los distintos grupos experimentales y controles. Sorprendentemente, los niveles de TNF- α entre el grupo experimental de EA y su respectivo control fueron similares, tanto en muestras de suero como en hipocampo.

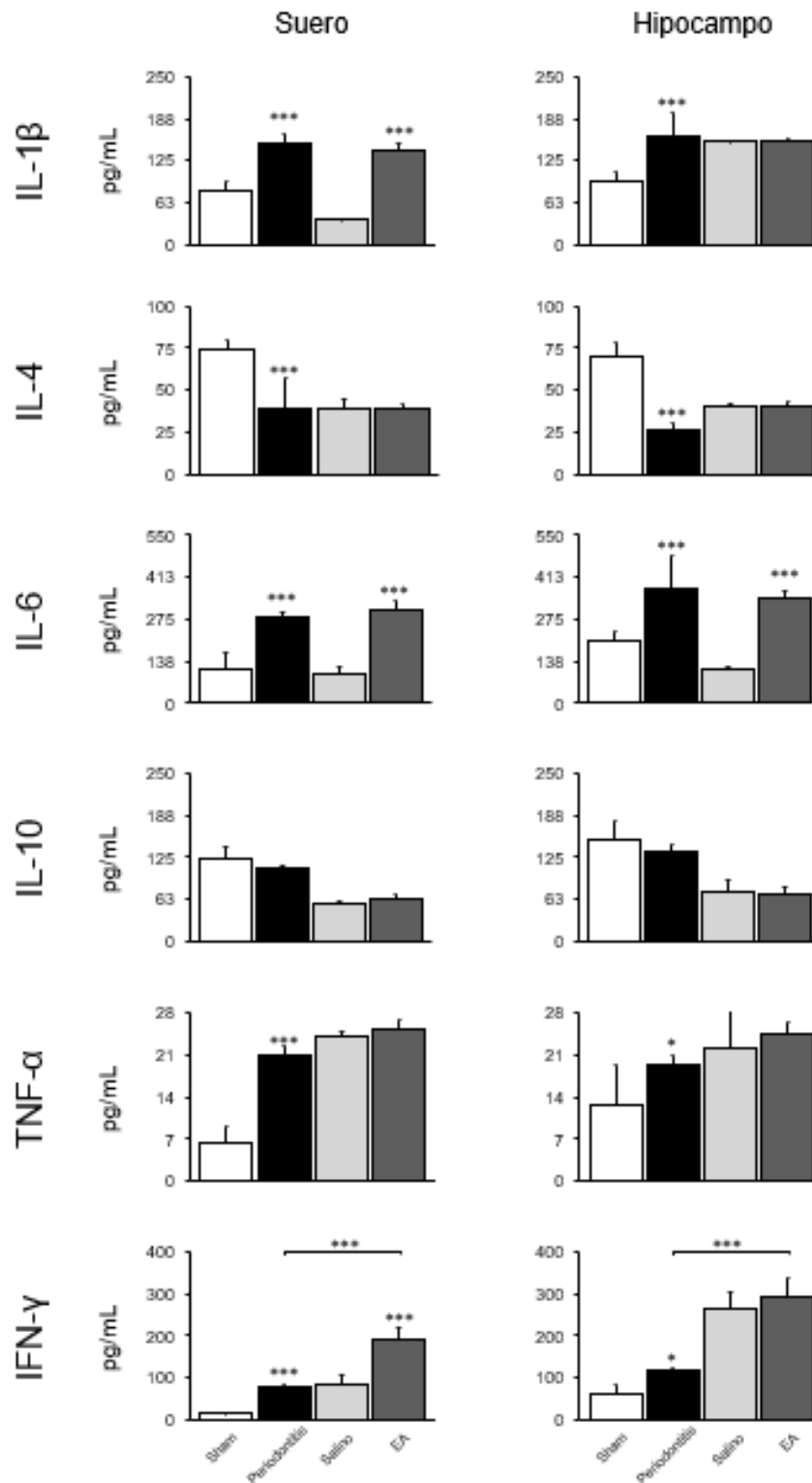


Figura N°3. Cuantificación de mediadores en suero e hipocampo de ratas controles y experimentales. A partir de 4 ratas por grupo se midieron los niveles de secreción de IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ mediante ELISA. Valores promedio de concentración para cada citoquina por cada grupo: **IL-1β** (Suero) Sham 79,91 pg/mL ± 14,43; Periodontitis 151,89 pg/mL ± 14,50; Salino

36,4 pg/mL \pm 2,43; EA 141,74 mg/mL \pm 8,42 (Hipocampo) Sham 95,63 pg/mL \pm 11,76; Periodontitis 162,81 pg/mL \pm 34,77; Salino 153,04 pg/mL \pm 0,64; EA 155,33 mg/mL \pm 2,78. **IL-4** (Suero) Sham 74,3 pg/mL \pm 5,22; Periodontitis 39,11 pg/mL \pm 18,01; Salino 38,92 pg/mL \pm 5,62; EA 39,02 mg/mL \pm 2,55 (Hipocampo) Sham 70,03 pg/mL \pm 8,48; Periodontitis 26,5 pg/mL \pm 3,29; Salino 40,88 pg/mL \pm 1,25; EA 40,42 mg/mL \pm 2,55. **IL-6** (Suero) Sham 114,60 pg/mL \pm 50,43; Periodontitis 285,31 pg/mL \pm 12,88; Salino 97,04 pg/mL \pm 19,51; EA 302,17 mg/mL \pm 32,04 (Hipocampo) Sham 202,69 pg/mL \pm 35,40; Periodontitis 375,42 pg/mL \pm 104,20; Salino 107,67 pg/mL \pm 13,91; EA 342,39 mg/mL \pm 21,98. **IL-10** (Suero) Sham 123,46 pg/mL \pm 17,50; Periodontitis 106,69 pg/mL \pm 4,52; Salino 56,49 pg/mL \pm 3,09; EA 63,93 mg/mL \pm 5,72 (Hipocampo) Sham 149,24 pg/mL \pm 28,45; Periodontitis 132,54 pg/mL \pm 12,06; Salino 73,38 pg/mL \pm 18,69; EA 69,6 pg/mL \pm 11,16. **TNF- α** (Suero) Sham 6,46 pg/mL \pm 2,59; Periodontitis 20,82 pg/mL \pm 1,81; Salino 24,05 pg/mL \pm 0,99; EA 25,29 pg/mL \pm 1,55 (Hipocampo) Sham 12,71 pg/mL \pm 6,50; Periodontitis 19,41 pg/mL \pm 1,69; Salino 22,28 pg/mL \pm 6,96; EA 24,36 mg/mL \pm 1,96. **IFN- γ** (Suero) Sham 16,41 pg/mL \pm 0,95; Periodontitis 76,96 pg/mL \pm 8,09; Salino 86,05 pg/mL \pm 22,22; EA 193,71 pg/mL \pm 25,01 (Hipocampo) Sham 63,93 pg/mL \pm 19,05; Periodontitis 115,48 pg/mL \pm 9,39; Salino 264 pg/mL \pm 40,20; EA 292,29 mg/mL \pm 40,50. IL: Interleuquina, TNF: Factor de necrosis tumoral, IFN: Interferón, pg: picogramo, mL: mililitro. Diferencias entre grupos: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.3 Aprendizaje y memoria espacial

Al evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ambos modelos por separado, se detectó que tanto las ratas afectadas con periodontitis como aquellas afectadas de EA tuvieron un peor desempeño en comparación a sus respectivos controles. En particular, ambos grupos experimentales presentan una mayor razón de distancias, una mayor latencia y una menor tasa de éxito en comparación a sus respectivos controles (Figura N^o4). Curiosamente, las ratas afectadas de EA tuvieron una mayor razón de distancias en comparación con las ratas afectadas de periodontitis y, para el modelo de periodontitis siendo estadísticamente significativa. Por otro lado, se observó una mayor latencia que las observadas en las ratas con EA, sin ser esta última diferencia estadísticamente significativa. Curiosamente, para ambos modelos experimentales se observó una disminución en la tasa de éxito, siendo similares entre sí y estadísticamente menores a sus respectivos controles.

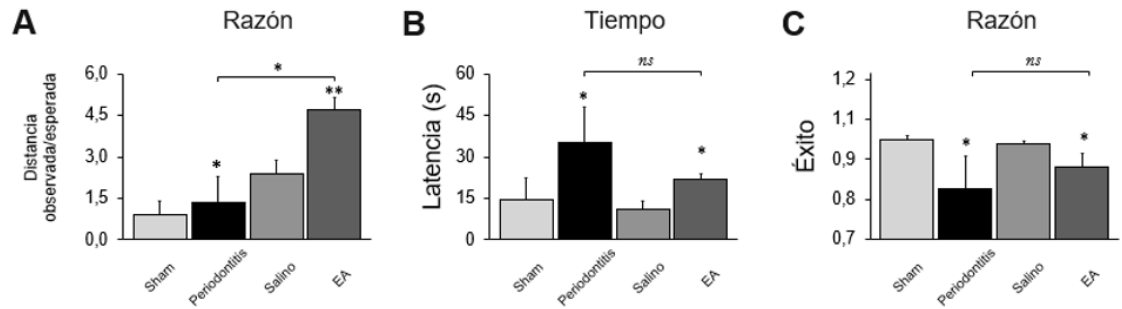


Figura N°4. Memoria espacial y aprendizaje. A partir de 6 ratas por grupo, las gráficas representan el valor promedio de los 15 ensayos por cada animal en el día 6 de la tarea. A: Representa la razón de la distancia observada y esperada. B: Representa el tiempo que los animales tardaron en encontrar la recompensa, con un máximo de duración de 60 segundos. C: Representa la tasa de éxito de la cantidad de veces en que los animales encontraron su recompensa por el total de ensayos realizados. Valores promedio para cada grupo de la razón distancia observada/esperada: Sham, $0,93 \pm 0,45$; Periodontitis, $1,37 \pm 0,91$; Salino $2,38 \pm 0,5$; EA $4,68 \pm 0,46$. Valores promedio para cada grupo de la latencia: Sham, $14,56 \text{ s} \pm 7,84$; Periodontitis, $35,29 \text{ s} \pm 12,59$; Salino $11,03 \pm 3,21$; EA $21,67 \text{ s} \pm 2,19$. Valores promedio para cada grupo de la razón de éxito en completar la prueba: Sham, $0,98 \pm 0,01$; Periodontitis, $0,85 \pm 0,10$; Salino $0,99 \pm 0,01$; EA $0,92 \pm 0,04$. s: segundos. Diferencia entre grupos: * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, p*** $< 0,001$, ns: no significativa.

5.4 Niveles de A β 42 y MDA en hipocampo.

Posteriormente y para evaluar si la neuroinflamación permite explicar, al menos en parte, las alteraciones en la memoria espacial y aprendizaje evidenciada en las ratas afectadas de periodontitis o EA, determinamos los niveles de producción de A β 42 en el hipocampo (Figura N^o5). Para las ratas afectadas de periodontitis o las ratas con EA se observaron mayores niveles de producción de A β 42 en comparación con sus respectivos controles. Curiosamente, los niveles secretados de A β 42 en las ratas afectadas de periodontitis fue mayor a la detectada en las ratas con EA.

Posteriormente, evaluamos los niveles de MDA, que es un producto de reacción entre el lipoperóxido y el ácido tiobarbitúrico y representa el efecto del incremento de especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*, ROS) y nitrógeno (del inglés *Reactive Nitrogen Species*, RNS) en la oxidación de los lípidos de la membrana celular. Sólo en las ratas con periodontitis experimental se observó una mayor concentración de MDA en comparación a su respectivo control y el modelo experimental de EA. Para las ratas afectadas de EA no se detectaron diferencias en la concentración de MDA en comparación con sus ratas control.

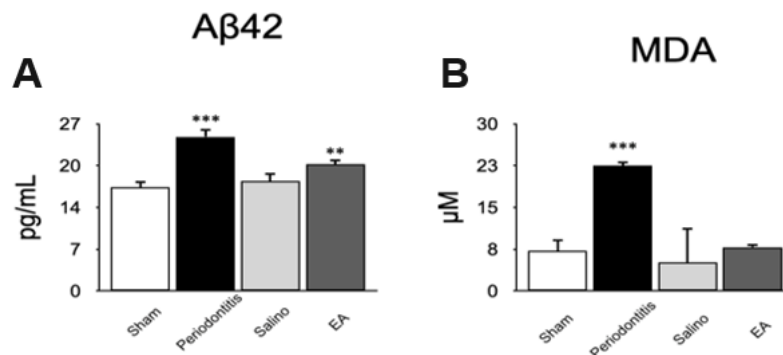


Figura N^o5. Cuantificación de A β 42 y MDA. A partir de 4 ratas por grupo se cuantificaron los niveles de A β 42 (Fig. 5A) y MDA (Fig. 5B) mediante ELISA. Valores promedio para cada grupo de **A β 42**: Sham, 16,78 pg/mL \pm 1,24; Periodontitis, 24,93 pg/mL \pm 1,30; Salino 17,79 pg/mL \pm 0,74; EA 20,5 mg/mL \pm 1,44. Valores promedio para cada grupo de **MDA**: Sham, 7,21 pg/mL \pm 0,72; Periodontitis, 22,89 pg/mL \pm 0,47; Salino 5,27 pg/mL \pm 0,52; EA 10,81 mg/mL \pm 2,86. A β 42: Amiloide β , MDA: malondialdehído. Diferencia entre grupo experimentales y su respectivo control ** p <0,01, *** p <0,001.

5.5 Activación de astrocitos en hipocampo.

Posteriormente y con el objetivo de determinar si la neuroinflamación, la mayor producción de A β 42 y MDA y la alteración en el aprendizaje y memoria espacial se asocian con una mayor activación de astrocitos en el hipocampo, evaluamos morfológicamente a estas células mediante inmunofluorescencia (Figura N°6A, B y C). Tanto en las ratas afectadas de periodontitis como de EA se observó un mayor número de astrocitos, definido como astrogliosis, en comparación con sus controles respectivos. Además, al cuantificar el porcentaje de células GFAP positivas, se observó un incremento en ambas condiciones experimentales con relación a sus respectivos controles (Figura N°7). Es sumamente importante destacar que el aumento del porcentaje de células GFAP positivas fue similar entre ambas condiciones experimentales.

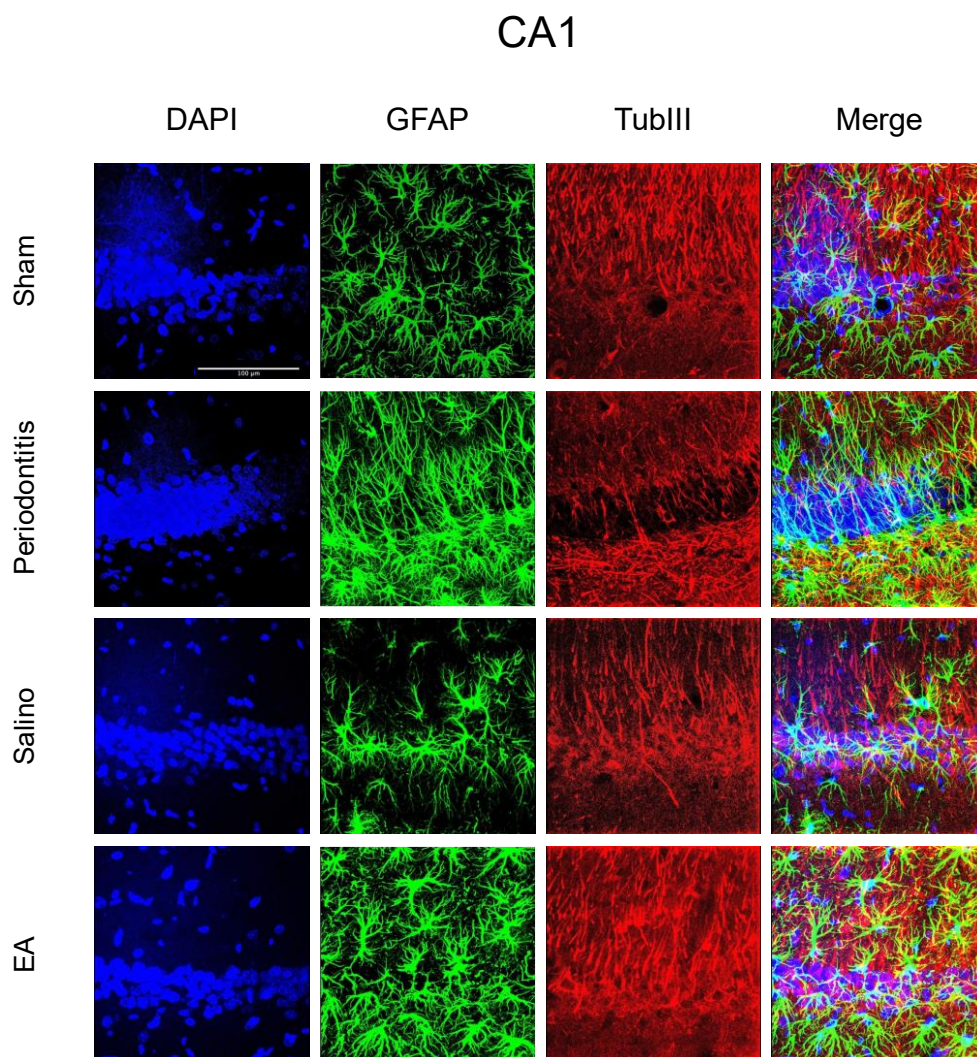


Figura N°6A. Análisis de inmunofluorescencia. A partir de los hipocampos se evaluó mediante inmunofluorescencia la morfología de los astrocitos y neuronas en la región CA1 para todas las condiciones controles y experimentales. Las figuras representan la proyección 3D de 36 imágenes para cada condición. En azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde la proteína GFAP específica de astrocitos, en rojo las neuronas marcadas con tubulina III y en merge la sobreposición de todos los canales. GFAP: proteína ácido fibrilar glial, A β O: oligómeros de Amiloide β .

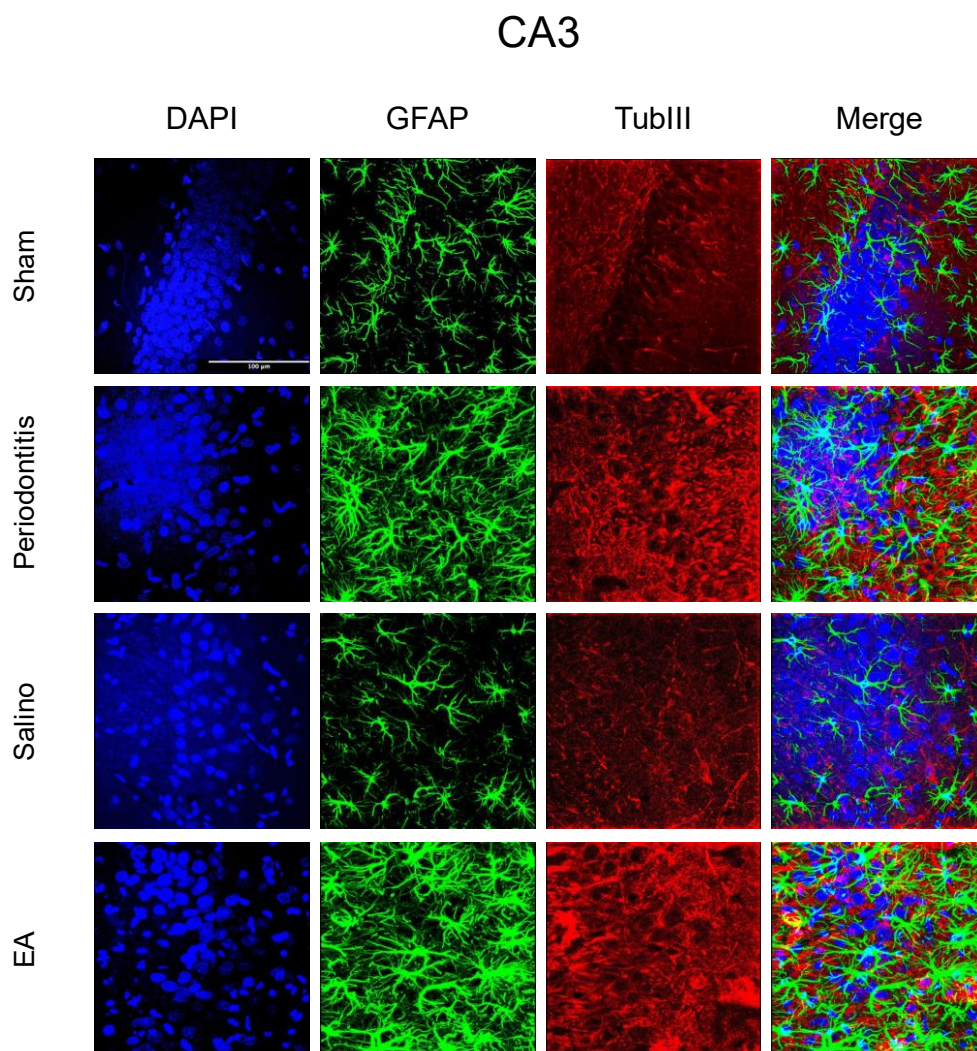


Figura N°6B. Análisis de inmunofluorescencia. A partir de los hipocampos se evaluó mediante inmunofluorescencia la morfología de los astrocitos y neuronas en la región CA3 para todas las condiciones controles y experimentales. Las figuras representan la proyección 3D de 36 imágenes para cada condición. En azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde la proteína GFAP específica de astrocitos, en rojo las neuronas marcadas con tubulina III y en merge la sobreposición de todos los canales. GFAP: proteína acídica fibrilar glial, A β O: oligómeros de Amiloide β

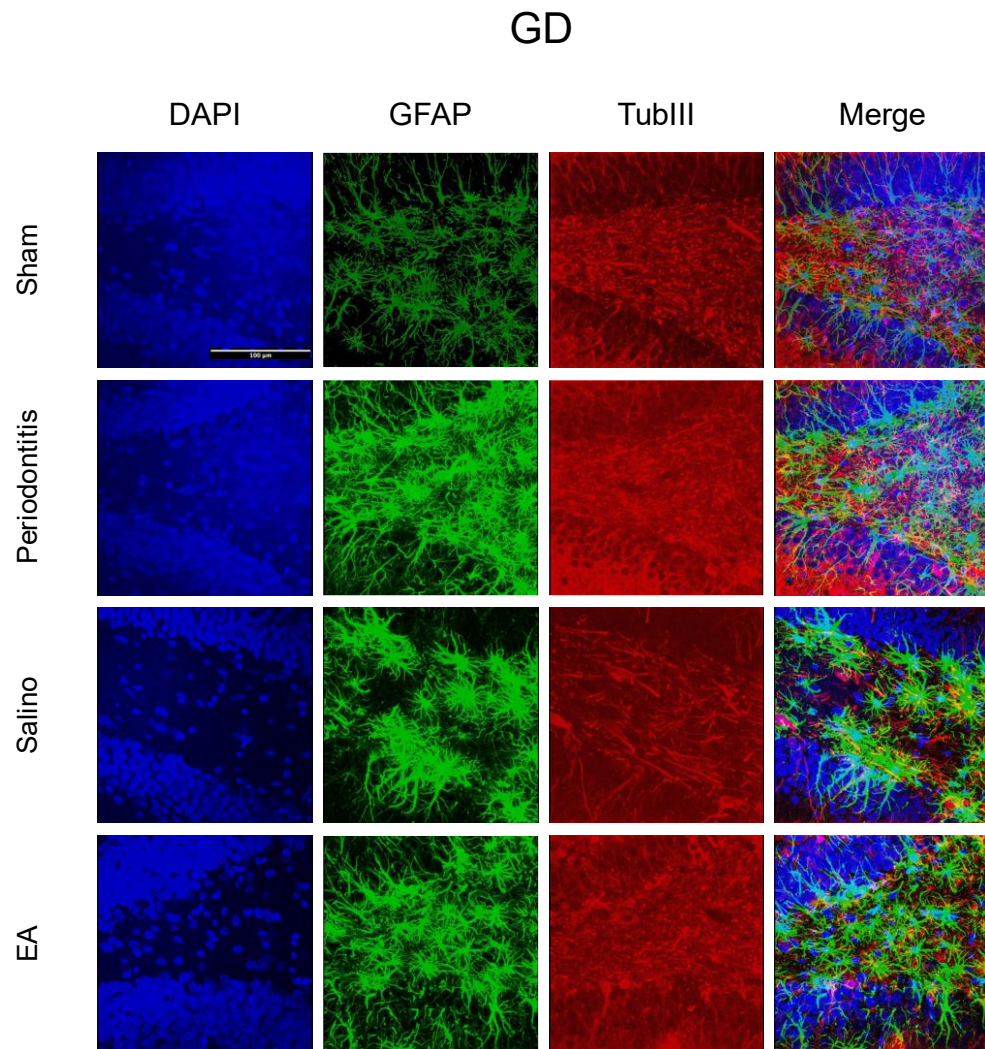


Figura N°6C. Análisis de inmunofluorescencia. A partir de los hipocampos se evaluó mediante inmunofluorescencia la morfología de los astrocitos y neuronas en la región GD para todas las condiciones controles y experimentales. Las figuras representan la proyección 3D de 36 imágenes para cada condición. En azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde la proteína GFAP específica de astrocitos, en rojo las neuronas marcadas con tubulina III y en merge la sobreposición de todos los canales. GFAP: proteína ácido fibrilar glial, A β O: oligómeros de Amiloide β .

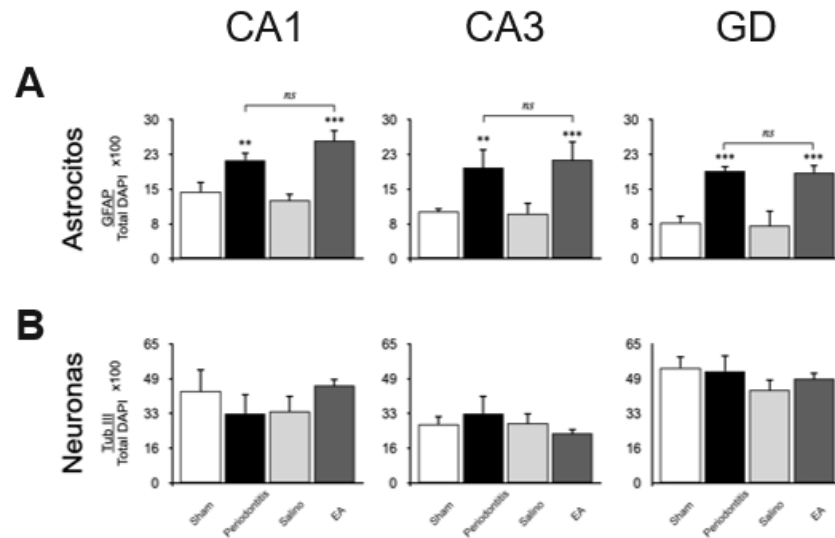


Figura N°7. Cuantificación de células en hipocampos de ratas afectadas de periodontitis o enfermedad de Alzheimer experimental. Las gráficas representan el porcentaje \pm desviación estándar del recuento de astrocitos (GFAP/DAPI, Fig. 7A) y de neuronas (TubIII/DAPI, Fig. 7B) en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo. El recuento se normalizó al total de DAPI. Valores promedio del recuento de astrocitos para cada grupo en distintas regiones del hipocampo: **CA1**, sham $14,46 \pm 2,2$; Periodontitis $21,30 \pm 1,61$; Salino $12,64 \pm 1,42$; EA $25,47 \pm 2,39$. **CA3**, sham $10,20 \pm 0,7$; Periodontitis $19,61 \pm 4,00$; Salino $9,73 \pm 2,4$; EA $21,34 \pm 3,99$. **GD**, sham $7,79 \pm 1,5$; Periodontitis $18,95 \pm 1,04$; Salino $7,13 \pm 3,3$; EA $18,60 \pm 1,7$. Valores promedio del recuento de neuronas para cada grupo en distintas regiones del hipocampo: **CA1**, sham $43,02 \pm 10,3$; Periodontitis $32,49 \pm 9,30$; Salino $33,48 \pm 7,50$; EA $45,63 \pm 3,08$. **CA3**, sham $27,52 \pm 3,80$; Periodontitis $32,49 \pm 8,30$; Salino $27,90 \pm 4,7$; EA $23,11 \pm 2,2$. **GD**, sham $53,91 \pm 5,44$; Periodontitis $52,30 \pm 7,60$; Salino $43,51 \pm 4,99$; EA $48,66 \pm 2,97$. Diferencias entre grupos experimentales y su respectivo control: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns: no significativo.

5.6 Razón proteína Tau fosforilada y proteína Tau total.

Finalmente, y con el objetivo de determinar si la neuroinflamación, producción de $A\beta_{42}$ y MDA, alteración en el aprendizaje y memoria espacial y astrogliosis se asocian con una mayor fosforilación de la proteína Tau, mediante inmunofluorescencia determinamos la presencia de las formas fosforiladas y no fosforiladas de la proteína asociada a microtúbulos Tau (Figura N°8A y B). Tanto en las ratas afectadas de periodontitis como de EA se observó una mayor señal de pTau. Para determinar si existe un incremento real de la proteína pTau se determinó

la razón pTau/Tau total, detectándose un incremento en esta razón en las ratas afectadas de periodontitis y EA experimental en comparación a sus respectivos controles (Figura N°9). Sin embargo, las ratas afectadas de EA experimental presentaron mayor razón en comparación a las ratas afectadas de periodontitis experimental.

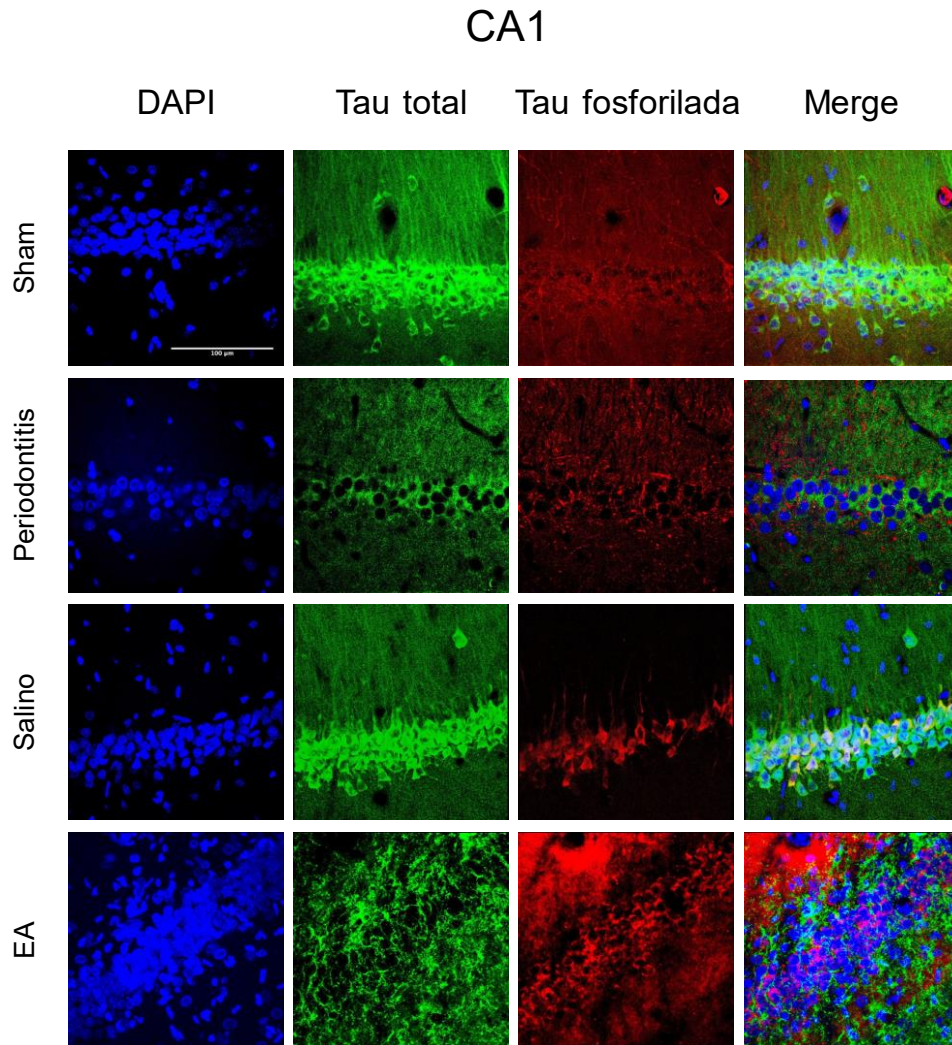


Figura N°8A. Inmunofluorescencia de Tau y fosfo Tau en hipocampos de ratas afectadas de periodontitis o enfermedad de Alzheimer experimental. Las figuras representan la proyección 3D de 36 imágenes para cada condición de la región CA1 de hipocampos. En verde la proteína Tau, en rojo la proteína Tau fosforilada, en azul los núcleos de las células (DAPI) y en merge la sobreposición de los canales.

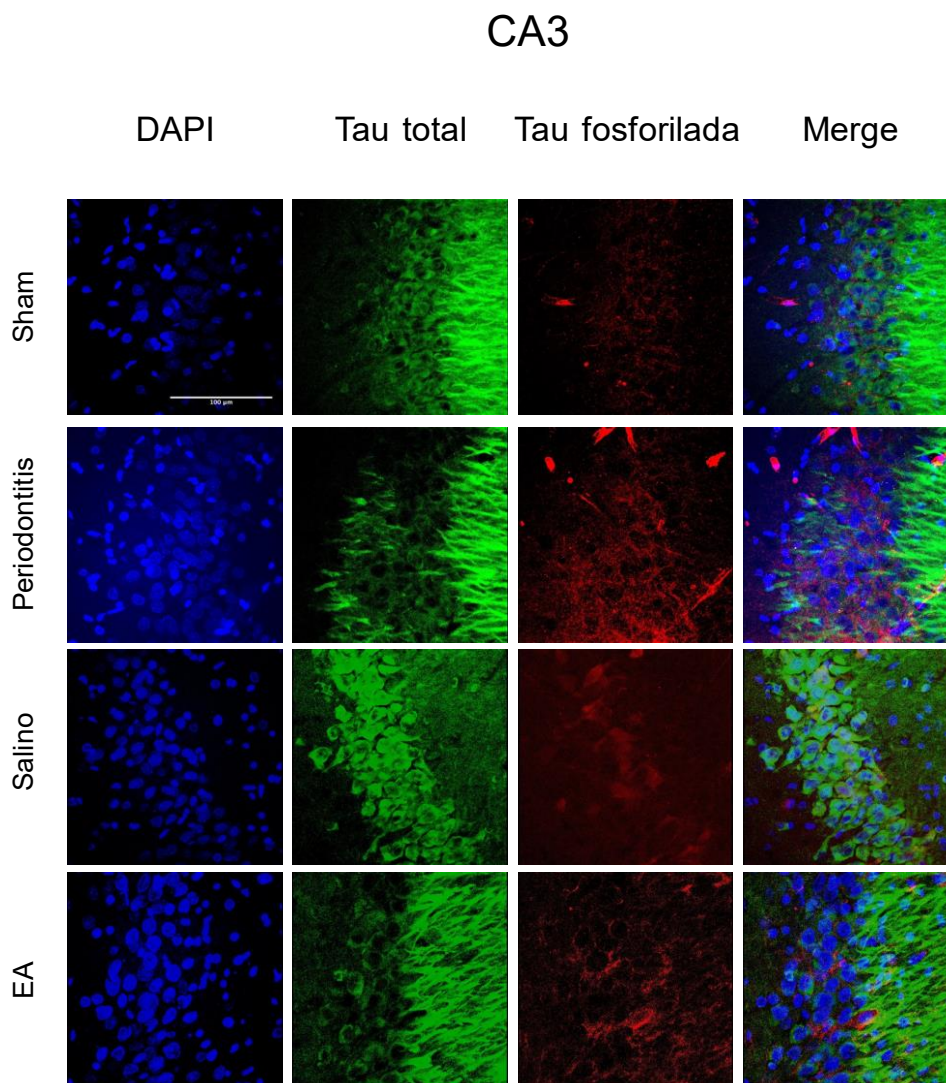


Figura N°8B. Inmunofluorescencia de Tau y fosfo Tau en hipocampos de ratas afectadas de periodontitis o enfermedad de Alzheimer experimental. Las figuras representan la proyección 3D de 36 imágenes para cada condición de la región CA1 de hipocampos. En verde la proteína Tau, en rojo la proteína Tau fosforilada, en azul los núcleos de las células (DAPI) y en merge la sobreposición de los canales.

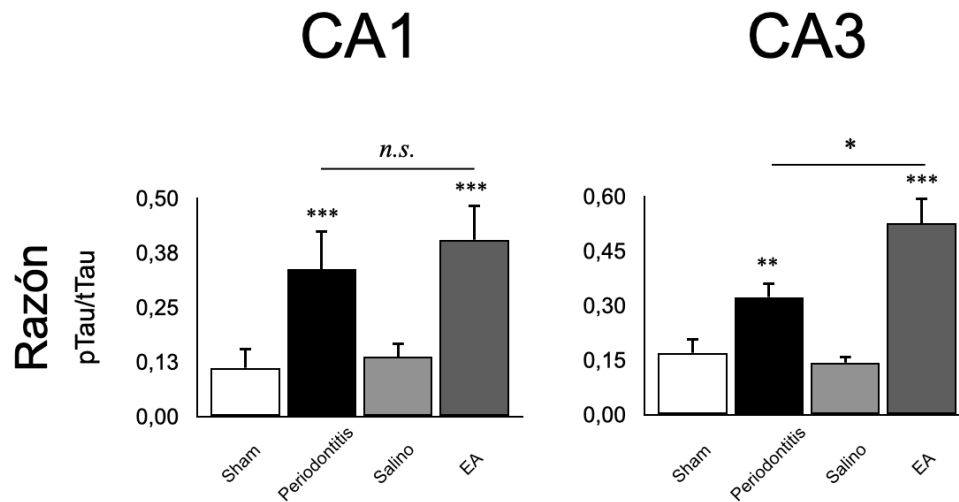


Figura N°9. Razón Tau fosforilada/Tau total. A partir del total de células fosfo Tau⁺/DAPI se determinó la razón respecto de las células Tau⁺/DAPI en la región CA1 y CA3 del hipocampo. Valores promedio de la razón pTau/tTau para cada grupo en distintas regiones del hipocampo: **CA1**, sham 0,11 ± 0,05; Periodontitis 0,34 ± 0,09; Salino 0,14 ± 0,03; EA 0,41 ± 0,08. **CA3**, sham 0,17 ± 0,04; Periodontitis 0,32 ± 0,04; Salino 0,14 ± 0,02; EA 0,53 ± 0,07. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns: no significativo.

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo logró determinar que la periodontitis experimental inducida por mono-infección del serotipo K1 de *P. gingivalis* es capaz de inducir cambios inflamatorios y celulares en el hipocampo asociados con alteración en el aprendizaje y memoria espacial y, que estos cambios, también se producen en un mayor grado en un modelo de EA experimental. En este sentido, al cuantificar en suero y homogenizados de hipocampo los mediadores pro-inflamatorios tanto en EA como en la enfermedad periodontal, se pudo evidenciar que ambos modelos experimentales presentaron un aumento de los niveles IL-6 tanto en suero como hipocampo, en comparación a sus respectivos controles. Para IL-1 β e IFN- γ a nivel sérico, se detectaron incrementos tanto en las ratas con periodontitis como con EA en comparación a sus controles (Fig N°2), siendo las concentraciones de estos mediadores pro-inflamatorios similares entre ambas condiciones experimentales. Por otro lado, al evaluar el aprendizaje y memoria espacial mediante la prueba de OASIS Maze, en el 6° día de tarea las ratas afectadas por enfermedad periodontal tuvieron una alteración de estos procesos cognitivos de una magnitud similar al modelo experimental de EA a excepción de la razón de distancias donde se apreció que las ratas del modelo experimental de EA presentaron un aumento significativamente mayor en comparación al modelo experimental de periodontitis (Fig N°3). En la misma línea, al evaluar los niveles de A β -42 y MDA (Fig. 4), marcadores utilizados para evaluar los efectos de la neuroinflamación, en ambos modelos experimentales se evidenció un aumento significativo de ambos marcadores en los modelos experimentales en comparación a sus controles, siendo curiosamente, mayores los niveles de MDA en el modelo experimental de periodontitis en comparación al modelo experimental de EA. Finalmente, y, mediante inmunofluorescencia, evidenciamos una mayor astrogliosis y razón de pTau/Tau total en ambos grupos experimentales en comparación a sus respectivos controles, lo que nos demuestra que la periodontitis podría provocar cambios morfológicos en el hipocampo similares a los provocados por la EA.

Los resultados obtenidos producto de esta investigación concuerdan con lo que se ha reportado en la literatura hasta la fecha. En esta línea Ding y su grupo de estudio

evidenció que en ratones afectados de periodontitis inducida por *oral gavage* de la cepa ATCC®33277™ de *P. gingivalis*, tuvo alteraciones en la memoria espacial y aprendizaje, junto con un aumento de la expresión de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el tejido cerebral, en comparación al grupo control (Ding y cols, 2018). Por otro lado, el grupo de investigación de Hu, en ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis experimental inducida mediante inoculación de LPS de *P. gingivalis*, evidenció un deterioro en la memoria espacial, aprendizaje y presencia de neuroinflamación, caracterizada por una mayor concentración de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-21. Además, en las ratas afectadas de periodontitis se detectó la presencia de LPS en la corteza cerebral, la presencia de astrogliosis y activación microglial (Hu y cols., 2020). Sin embargo, ninguno de estos estudios y ninguno dentro de la literatura actual disponible evalúa efectivamente si la neuroinflamación y las alteraciones de memoria espacial y aprendizaje inducidas por la periodontitis o bacterias orales son compatibles con la generada en un modelo de EA, como si fue el caso de nuestro trabajo.

Los mediadores pro-inflamatorios evaluados en este trabajo, tales como IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ están involucrados en diversos procesos fisiológicos y patológicos en distintos sistemas del organismo. Especialmente el aumento de la concentración de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se han detectado en enfermedades como diabetes mellitus tipo II (Liu y cols., 2006), parto prematuro y bajo peso al nacer (López y cols., 2005), reparación muscular (de Souza y cols., 2020), y la EA, entre otras. Como evidenciamos en nuestro trabajo, la periodontitis aumentó los niveles séricos e hipocampales de estos mediadores, siendo para algunas citoquinas similares a los generados por la EA. Inusualmente, las ratas inoculadas bilateralmente con solución salina en la región CA3 también tuvieron mayor concentración de TNF- α y de manera similar a las ratas con EA, lo que nos evidencia que la canulación e inyección de solución salina genera inflamación, pero no alteraciones en el aprendizaje. Esto se podría deber al trauma mismo de la intervención quirúrgica para poder instalar las cánulas de inyección. Así, el aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias afectadas de periodontitis podría promover una mayor severidad de la EA al aumentar la carga inflamatoria a nivel

sistémico y cerebral, por lo que existe la importancia de prevenir, controlar y tratar la enfermedad periodontal. Curiosamente, los niveles de IL-4 fueron menores en los grupos de periodontitis, EA y control salino, lo cual se podría deber al breve tiempo de exposición a la intervención, por lo cual la respuesta inmune moduladora no alcanza a elevarse para llevar a cabo su función. Por otro lado, sorpresivamente los niveles de INF- γ fueron mayores en el grupo de EA en comparación al grupo de periodontitis tanto en suero como en hipocampo. En relación con esta última estructura, esta diferencia significativa se podría explicar por un posible *brea-down* de la barrera hematoencefálica de las ratas con periodontitis experimental. Se ha evidenciado que la neuroinflamación originada por la microglía y astrocitos reactivos provoca este *breakdown* de la BHE (Hannoks y cols, 2017), permitiendo así el ingreso o salida de moléculas pro-inflamatorias (Bowman y cols, 2018). Para que este *breakdown* ocurra se deben dar ciertas condiciones, como lo son un incremento de los niveles de IL-17 y TNF- α , disminución de los niveles de INF- γ y que la razón de MMP9/MMP2 aumente. En nuestro modelo de periodontitis se cumplieron dos condiciones, ya que se obtuvieron bajos niveles de INF- γ y altos de TNF- α . Sin embargo, no podemos concluir que la BHE esté afectada dado que nos falta información respecto a las demás condiciones, ya que no fueron objetivo de nuestro trabajo. Otra explicación para esta diferencia en los niveles de INF- γ se puede deber al período de tiempo en que las ratas estuvieron expuestas al fenómeno neuroinflamatorio, ya que el modelo experimental de periodontitis fue un modelo de enfermedad crónica, donde las ratas estuvieron expuestas por un mayor tiempo al proceso neuroinflamatorio. En cambio, el modelo de EA fue un modelo de inflamación aguda, por tanto, al ser menor el tiempo entre el inicio de la enfermedad y la eutanasia para estudio, la BHE no estuvo expuesta a la neuroinflamación un tiempo suficiente para presentar signos de *breakdown*. Es por ello, que se necesitan mayores ensayos futuros para evaluar la integridad de la BHE en ambos modelos de enfermedad.

Actualmente, existe la hipótesis que indica que el A β sería secretado por astrocitos para cumplir un rol antimicrobiano en presencia de un ambiente de neuroinflamación o frente a la invasión de un microorganismo externo al tejido cerebral, lo que permitiría unirse al macroorganismo infectante y facilitar de esa forma su fagocitosis por las

microglías (Perry y cols, 2010a; Shaked y cols, 2004; Sierra y cols, 2014). Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad de las microglías para eliminar los péptidos de A β disminuye a medida que aumenta la edad del sujeto (Streit, 2004; Streit y cols 2009). Es por ello que se ha utilizado este péptido como marcador para establecer un diagnóstico clínico de EA (Jack y Vemuri, 2018). En nuestro estudio, el grupo de periodontitis experimental presentó un aumento de los niveles de A β 42 en comparación a su control, siendo incluso mayor la concentración que el grupo de EA experimental. Estos resultados confirman lo reportado en la literatura, donde Kantarçi y su grupo evidenció un aumento en los niveles de este péptido en el grupo de periodontitis experimental inducida por ligadura en comparación al grupo control sin ligadura (Kantarçi y cols, 2020). Así, la periodontitis puede contribuir a una mayor acumulación del péptido A β , aumentando la neuroinflamación y astrogliosis, pudiendo favorecer la formación de placas seniles y mayor severidad de la EA.

El MDA corresponde a un marcador de oxidación lipídica u oxidación de lípidos de la membrana plasmática, es producto de la reacción entre el lipoperóxido y el ácido tiobarbitúrico, representa un efecto del incremento de ROS y RNS en el tejido y su concentración nos da un acercamiento al grado de estrés oxidativo (Gęgotek y Skrzydlewska, 2019). En nuestro trabajo, en el grupo de periodontitis experimental el aumento de este marcador fue mayor que su control y, curiosamente, mayor en comparación al grupo de EA experimental. Los altos niveles de MDA dan como resultado la formación de aductos de MDA con proteínas a través de la generación de N ϵ -(2 propenal) lisina, de 1-amino-3-iminopropeno-*type* o de reticulaciones piridilo dihidropiridina-*type* de lisina-lisina (Del Rio y cols., 2005). Un producto común de las interacciones MDA-proteína son los aductos de acetaldehído-proteína MDA (McCaskill y cols., 2011). La formación de aductos MDA-proteína y MDA-acetaldehído-proteína se asocian con una mayor respuesta pro-inflamatoria (Wang y cols., 2012). El mecanismo de estos aductos se basa en la activación de proteína quinasas, como la proteína quinasa C (PKC) (Ayala y cols., 2014), que conduce a la activación del factor NF- κ B. Sin embargo, el aumento de los niveles de MDA-acetaldehído en plasma, por modificación de la albúmina, influye en la activación de los factores de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y de la molécula de adhesión vascular (VCAM), lo que conduce directamente a un aumento en la

expresión de TNF- α (Busch y Binder, 2017). En el caso de MDA, similar a 4-HNE —intermediario secundario de estrés oxidativo y biomarcador de lipoperoxidación (Breitzig y cols., 2016)—, tras la formación de aductos de proteínas también afecta la biosíntesis de proteínas por medio de la generación de aductos con el factor de elongación eucariota-2 (eEF-2), proteína esencial para la síntesis proteica (Kaul y cols., 2011). El MDA bloquea directamente las interacciones eEF-2-ribosoma, lo que resulta en una alteración del movimiento de los ribosomas a lo largo de la traducción del mRNA y la inhibición de este proceso (Argüelles y cols., 2009). Por otro lado, el colágeno es una molécula susceptible a las modificaciones de MDA, donde la MDA forma aductos con residuos de cisteína y favorece las reacciones de glicación (Slatter y cols., 2000). Por lo tanto, los aductos de proteína MDA pueden afectar la regeneración y reorganización de los tejidos. Además, el MDA conduce a la reticulación del colágeno y a modificaciones covalentes adicionales, lo que provoca una pérdida de la elasticidad y una alteración en la remodelación tisular, induciendo al desarrollo de patologías dentro del organismo, con especial énfasis en los vasos sanguíneos (Avery y Bailey, 2006; Yamada y cols., 2009).

La astrogliosis corresponde a un fenómeno que ha sido asociado con la severidad de la EA y también con la capacidad de recuperación de la salud cerebral. Este fenómeno se produce por respuesta del astrocito frente a diversos patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) o a daño (del inglés *damage-associated molecular patterns*, DAMPs), contribuyendo a la protección de la salud cerebral, contención del daño o aumentando la inflamación (Olabarria y cols., 2010). Los mediadores proinflamatorios liberados por otras células del sistema nervioso central, tales como microglías, neuronas, oligodendrocitos, entre otras, producen la activación de los astrocitos a un fenotipo reactivo (Frost y Li, 2017). Este fenotipo de astrocito puede reparar alteraciones presentes en la BHE, junto con rodear a los oligómeros de A β y producir ROS y RNS, las cuales provocan neurotoxicidad (Olabarria y cols., 2010). Por otro lado, las moléculas estudiadas en este trabajo tales como IL-1 β , IL-6, TNF- α y A β 42 pueden ser reconocidas por este astrocito reactivo quien, a su vez, responde secretando mayores niveles de estas mismas moléculas (Olabarria y cols., 2010). El incremento de estas citoquinas, especialmente IL-1 β , IL-6 y TNF- α ,

inducen la activación del factor de transcripción de proteína activadora 1 (del inglés *activator protein 1*, AP-1) y de la enzima β secretasa (del inglés *β -site APP cleaving enzyme*, BACE), las cuales regulan la expresión de APP y la formación A β (Bourne y cols., 2007; Johnstone y cols., 1999; Thal, 2012). De esta forma, el aumento de las citoquinas pro-inflamatorias evidenciadas en nuestro trabajo se asocia con una mayor producción de A β y una mayor producción de mediadores pro-inflamatorios. Por otro lado, los astrocitos al modificar su fenotipo provocan un desbalance oxidativo, energético y metabólico que altera el funcionamiento de las neuronas, provocando así una mayor producción por parte de estas células, de A β 40 y una mayor acumulación de pTau (Frost y Li, 2017). Estos fenómenos tienen como consecuencia la neurodegeneración, con pérdida de la integridad de las membranas y la formación de NFTs. Finalmente, las microglías y los astrocitos reactivos rodean las placas seniles y los NFTs, continuando con la generación de mediadores pro-inflamatorios, creando así un ciclo vicioso de neuroinflamación (Alonso y cols., 1997; Frost y Li, 2007; Ghosh y cols, 2013; Saido y cols, 1995; Santacruz y cols, 2005; Xu y cols., 2016).

Un área importante para destacar corresponde al reporte de distintos grupos de investigación sobre diversos mecanismos para contrarrestar el daño cognitivo y neuroinflamación inducido por la periodontitis. En este sentido, Dominy y sus colaboradores estudiaron un tratamiento con pequeñas moléculas inhibitoras de las principales gingipaínas de *P. gingivalis* como son RgpA, RgpB y Kgp. Para ello infectaron células SH-SY5Y, que corresponden a células de neuroblastoma humano, con la cepa W38 de *P. gingivalis* y observaron que los inhibidores de las gingipaínas provocaron la muerte de *P. gingivalis* y, a su vez, protegían a las células. Además, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, como el moxifloxacino y la doxiciclina también provocó la muerte de *P. gingivalis*, pero no protegió a las células de su efecto. Posteriormente, tras infectar a ratones con las gingipaínas de *P. gingivalis*, observaron la presencia de neurodegeneración, la que pudo ser prevenida con la acción de los inhibidores específicos de las gingipaínas (Dominy y cols, 2019). También existe evidencia relacionada con la inhibición de TLR4, donde el bloqueador selectivo TAK-242 ha demostrado tener efecto en la disminución de la producción de TLR4, lo que contribuiría a disminuir la neuroinflamación. Esto,

debido a que el principal receptor que utilizan las microglías y los astrocitos para reconocer A β es el TLR4. Por ello, es necesario investigar más en este tipo de terapias a futuro con el fin de poder disminuir la ocurrencia de una EA o su severidad en pacientes que además presenten periodontitis.

Como se mencionó anteriormente, este es el primer trabajo, según la evidencia disponible actualmente en la literatura, que compara la neuroinflamación y daño cognitivo generado por la periodontitis con un modelo de EA, constituyendo así una gran fortaleza de nuestro estudio y sirviendo como base para ser contrastado y discutido con futuros estudios que profundicen más en esta área del conocimiento. Los resultados obtenidos en este estudio nos demuestran el posible rol de la periodontitis en la patogenia de la EA. Esto nos lleva a reflexionar sobre nuestro rol como odontólogos y más allá, como personal de la salud, sobre nuestro rol en la mantención del estado de salud oral y general de la población. Debemos educar a la población para que comprenda que la salud oral no es anexa al resto del organismo, sino que está relacionada con la salud de todo el sistema, pudiendo contribuir a la prevención o a una mayor incidencia de patologías en órganos distantes a la cavidad oral. Como odontólogos también debemos ser conscientes de que nuestros tratamientos no son centrados sólo en el diente, sino que tratamos también otros órganos, como en este caso, al cerebro, disminuyendo la posibilidad de sufrir patologías como la EA. Debido a ello, debemos realizar un correcto diagnóstico, tratamiento y terapia de soporte de la patología periodontal, motivando al paciente a comprometerse a mantener un estado de salud oral óptimo mediante una correcta higiene y controles periódicos con su profesional tratante. En esta misma línea, debemos involucrarnos dentro de un equipo de salud para, en conjunto, llevar a cabo el mejor tratamiento, mejorar el estado de salud del paciente y marcar la importancia de la salud oral en la salud general del paciente.

7. CONCLUSIONES

1. Tanto en el modelo de periodontitis como en la enfermedad de Alzheimer se observó alteraciones al aprendizaje y memoria espacial.
2. Tanto en el modelo de periodontitis como en la enfermedad de Alzheimer se detectó un incremento en los mediadores pro-inflamatorios en suero y la presencia de neuroinflamación.
3. Tanto en el modelo de periodontitis como en la enfermedad de Alzheimer existe mayor astrogliosis, siendo mayor en el modelo de enfermedad de Alzheimer en comparación al modelo experimental de periodontitis.
4. Tanto en el modelo de periodontitis como en la enfermedad de Alzheimer se observó una mayor producción de A β en homogenizados de hipocampo, mayor concentración de MDA y una mayor razón de pTau/Tau total en la región CA1 del hipocampo. Además, el modelo de enfermedad de Alzheimer presentó una mayor razón pTau/Tau total en comparación con el modelo de periodontitis.
5. Así, se comprueba que la enfermedad tipo Alzheimer detectada en las ratas afectadas de periodontitis experimental posee un componente celular y molecular similar al generado en el modelo experimental de Alzheimer, por tanto, es posible que la periodontitis experimental pueda ser un factor causal real de los eventos neuroinflamatorios que lleven al establecimiento de este tipo de demencia.

8. REFERENCIAS

1. Abbayya, K., Puthanakar, N. Y., Naduwinmani, S., & Chidambar, Y. S. (2015). Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North American journal of medical sciences*, 7(6), 241–246. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.159325>
2. Alonso, A. D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H. S., & Iqbal, K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 298–303. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.298>
3. Alzheimer's Disease International (2019). *Informe Mundial sobre el Alzheimer 2019: Actitudes hacia la demencia*. Londres: Alzheimer's Disease International.
4. Aragón, F., Zea-Sevilla, M. A., Montero, J., Sancho, P., Corral, R., Tejedor, C., Frades-Payo, B., Paredes-Gallardo, V., & Albaladejo, A. (2018). Oral health in Alzheimer's disease: a multicenter case-control study. *Clinical oral investigations*, 22(9), 3061–3070. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2396-z>
5. Argüelles, S., Machado, A., & Ayala, A. (2009). Adduct formation of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde with elongation factor-2 in vitro and in vivo. *Free radical biology & medicine*, 47(3), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.010>
6. Avery, N. C., & Bailey, A. J. (2006). The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathologie-biologie*, 54(7), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.005>
7. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
8. Bagavad Gita, J., George, A. V., Pavithra, N., Chandrasekaran, S. C., Latchumanadhas, K., & Gnanamani, A. (2019). Dysregulation of miR-146a by

- periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome. *Journal of periodontology*, 90(7), 756–765. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0466>
9. Balin, B. J., Gérard, H. C., Arking, E. J., Appelt, D. M., Branigan, P. J., Abrams, J. T., Whittum-Hudson, J. A., & Hudson, A. P. (1998). Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Medical microbiology and immunology*, 187(1), 23–42. <https://doi.org/10.1007/s004300050071>
 10. Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology*, 76(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
 11. Bourne, K. Z., Ferrari, D. C., Lange-Dohna, C., Rossner, S., Wood, T. G., & Perez-Polo, J. R. (2007). Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor-kappaB in neurons and glia upon exposure to beta-amyloid peptides. *Journal of neuroscience research*, 85(6), 1194–1204. <https://doi.org/10.1002/jnr.21252>
 12. Bowman, G. L., Dayon, L., Kirkland, R., Wojcik, J., Peyratout, G., Severin, I. C., Henry, H., Oikonomidi, A., Migliavacca, E., Bacher, M., & Popp, J. (2018). Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 14(12), 1640–1650. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.2857>
 13. Breitzig, M., Bhimineni, C., Lockey, R., & Kolliputi, N. (2016). 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *American journal of physiology. Cell physiology*, 311(4), C537–C543. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00101.2016>
 14. Busch, C. J., & Binder, C. J. (2017). Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1862(4), 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.06.016>
 15. Calvo-Flores Guzmán, B., Kim, S., Chawdhary, B., Peppercorn, K., Tate, W. P., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., Montgomery, J., & Kwakowsky, A. (2020). Amyloid-Beta1-42 -Induced Increase in GABAergic Tonic Conductance in Mouse Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), 693. <https://doi.org/10.3390/molecules25030693>

16. Clark, R. E., Broadbent, N. J., & Squire, L. R. (2005). Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus*, *15*(2), 260–272. <https://doi.org/10.1002/hipo.20056>
17. Conti, M. Z., Vicini-Chilovi, B., Riva, M., Zanetti, M., Liberini, P., Padovani, A., & Rozzini, L. (2013). Odor identification deficit predicts clinical conversion from mild cognitive impairment to dementia due to Alzheimer's disease. *Archives of clinical neuropsychology : the official journal of the National Academy of Neuropsychologists*, *28*(5), 391–399. <https://doi.org/10.1093/arclin/act032>
18. Danysz W. (2001). Neurotoxicity as a mechanism for neurodegenerative disorders: basic and clinical aspects. *Expert opinion on investigational drugs*, *10*(5), 985–989. <https://doi.org/10.1517/13543784.10.5.985>
19. Darveau, R. P., Hajishengallis, G., & Curtis, M. A. (2012). *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *Journal of dental research*, *91*(9), 816–820. <https://doi.org/10.1177/0022034512453589>
20. Demmer, R. T., Papapanou, P. N., Jacobs, D. R., Jr, & Desvarieux, M. (2010). Evaluating clinical periodontal measures as surrogates for bacterial exposure: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *BMC medical research methodology*, *10*, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-10-2>
21. d'Empaire, G., Baer, M. T., & Gibson, F. C., 3rd (2006). The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infection and immunity*, *74*(11), 6236–6243. <https://doi.org/10.1128/IAI.00519-06>
22. de Souza, B. C., Matte, B. F., Lopes, A. L., Teixeira, B. C., & Lamers, M. L. (2020). Periodontal Disease Impairs Muscle Recovery by Modulating the Recruitment of Leukocytes. *Inflammation*, *43*(1), 382–391. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01128-5>
23. Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, *15*(4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
24. Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández,

- M., Sanz, M., & Vernal, R. (2014). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of clinical periodontology*, 41(3), 242–251. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12205>
25. Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., Ciuchi, P., García, M., Arias, J., Sanz, M., & Vernal, R. (2015). Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *Journal of periodontology*, 86(1), 108–119. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140326>
26. Díaz-Zúñiga, J., More, J., Melgar-Rodríguez, S., Jiménez-Unión, M., Villalobos-Orchard, F., Muñoz-Manríquez, C., Monasterio, G., Valdés, J. L., Vernal, R., & Paula-Lima, A. (2020). Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Frontiers in immunology*, 11, 588036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588036>
27. Ding, Y., Ren, J., Yu, H., Yu, W., & Zhou, Y. (2018). *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity & ageing: I & A*, 15, 6. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0110-7>
28. Doens, D., & Fernández, P. L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of neuroinflammation*, 11, 48. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-48>
29. Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., ... Potempa, J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science advances*, 5(1), eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
30. Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguillon, J. C., Puente, J., Pozo, P., & Gamonal, J. (2009). Levels of

- interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 80(2), 290–296. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080287>
31. Elobeid, A., Libard, S., Leino, M., Popova, S. N., & Alafuzoff, I. (2016). Altered Proteins in the Aging Brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 75(4), 316–325. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw002>
32. Fang, Y., Yao, L., Li, C., Wang, J., Wang, J., Chen, S., Zhou, X. F., & Liao, H. (2016). The blockage of the Nogo/NgR signal pathway in microglia alleviates the formation of A β plaques and tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0522-x>
33. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>
34. Figueroa, D., Signore, A., Araneda, O., Contreras, H. R., Concha, M., & García, C. (2020). Toxicity and differential oxidative stress effects on zebrafish larvae following exposure to toxins from the okadaic acid group. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 83(15-16), 573–588. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1793046>
35. Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., & LaFerla, F. M. (2017). Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends in neurosciences*, 40(6), 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002>
36. Frost, G. R., Li, Y. M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open biology*, 7(12), 170228. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>
37. Garlet, GP., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2007). The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clinical and experimental immunology*, 147(1), 128–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03260.x>

38. Garlet G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*, 89(12), 1349–1363. <https://doi.org/10.1177/0022034510376402>
39. Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2019). Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and physics of lipids*, 221, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011>
40. Ghosh, A., Streit, W. J., Minghetti, L., & Basu, A. (2013). Microglia in development and disease. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 736459. <https://doi.org/10.1155/2013/736459>
41. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
42. Gosztyła, M. L., Brothers, H. M., & Robinson, S. R. (2018). Alzheimer's Amyloid- β is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 62(4), 1495–1506. <https://doi.org/10.3233/JAD-171133>
43. Gurav A. N. (2014). Alzheimer's disease and periodontitis —an elusive link. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*, 60(2), 173–180. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.60.02.015>
44. Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
45. Hajishengallis G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
46. Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
47. Halliwell B. (2006). Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 8(11-12), 2007–2019. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.2007>

48. Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*, *12*(10), 383–388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609)
49. Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
50. Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Immunology*, *14*(7), 463–477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
51. Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, *14*(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
52. Hannocks, M. J., Zhang, X., Gerwien, H., Chashchina, A., Burmeister, M., Korpos, E., Song, J., & Sorokin, L. (2019). The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, *75-76*, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.007>
53. Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *16*(6), 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
54. Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F. E., Vernal, R., Sorsa, T., & Gamonal, J. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of dental research*, *90*(10), 1164–1170.
55. Holmes, C., & Cotterell, D. (2009). Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS drugs*, *23*(12), 993–1002. <https://doi.org/10.2165/11310910-000000000-00000>
56. Hu, Y., Li, H., Zhang, J., Zhang, X., Xia, X., Qiu, C., Liao, Y., Chen, H., Song, Z., & Zhou, W. (2020). Periodontitis Induced by *P. gingivalis*-LPS Is Associated With Neuroinflammation and Learning and Memory Impairment in

Sprague-Dawley Rats. *Frontiers in neuroscience*, 14, 658.

57. Ide, M., Harris, M., Stevens, A., Sussams, R., Hopkins, V., Culliford, D., Fuller, J., Ibbett, P., Raybould, R., Thomas, R., Puentner, U., Teeling, J., Perry, V. H., & Holmes, C. (2016). Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PloS one*, 11(3), e0151081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151081>
58. Itzhaki, R. F., Lathe, R., Balin, B. J., Ball, M. J., Bearer, E. L., Braak, H., Bullido, M. J., Carter, C., Clerici, M., Cosby, S. L., Del Tredici, K., Field, H., Fulop, T., Grassi, C., Griffin, W. S., Haas, J., Hudson, A. P., Kamer, A. R., Kell, D. B., Licastro, F., ... Whittum-Hudson, J. A. (2016). Microbes and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 51(4), 979–984. <https://doi.org/10.3233/JAD-160152>
59. Jack, C. R., Jr, & Vemuri, P. (2018). Amyloid- β - a reflection of risk or a preclinical marker?. *Nature reviews. Neurology*, 14(6), 319–320. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0008-9>
60. Jamieson, G. A., Maitland, N. J., Wilcock, G. K., Craske, J., & Itzhaki, R. F. (1991). Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *Journal of medical virology*, 33(4), 224–227. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890330403>
61. Johnstone, M., Gearing, A. J., & Miller, K. M. (1999). A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of neuroimmunology*, 93(1-2), 182–193. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00226-4](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00226-4)
62. Kamer, A. R., Craig, R. G., Dasanayake, A. P., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L., & de Leon, M. J. (2008). Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 4(4), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.08.004>
63. Kamer, A. R., Craig, R. G., Pirraglia, E., Dasanayake, A. P., Norman, R. G., Boylan, R. J., Nehorayoff, A., Glodzik, L., Brys, M., & de Leon, M. J. (2009). TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *Journal of*

neuroimmunology, 216(1-2), 92–97.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.08.013>

64. Kantarci, A., Tognoni, C. M., Yaghtmor, W., Marghalani, A., Stephens, D., Ahn, J. Y., Carreras, I., & Dedeoglu, A. (2020). Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 10(1), 18561. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75517-4>
65. Kaul, G., Pattan, G., & Rafeequi, T. (2011). Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell biochemistry and function*, 29(3), 227–234. <https://doi.org/10.1002/cbf.1740>
66. Kitazawa, S., & Wolpert, D. M. (2005). Rhythmicity, randomness and synchrony in climbing fiber signals. *Trends in neurosciences*, 28(11), 611–619. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.09.004>
67. Laine, M. L., Appelmelk, B. J., & van Winkelhoff, A. J. (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontal research*, 31(4), 278–284. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1996.tb00494.x>
68. Laine, M. L., Appelmelk, B. J., & van Winkelhoff, A. J. (1997). Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *Journal of dental research*, 76(12), 1840–1844. <https://doi.org/10.1177/00220345970760120601>
69. Laine, M. L., & van Winkelhoff, A. J. (1998). Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral microbiology and immunology*, 13(5), 322–325. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1998.tb00714.x>
70. Lee, Y., Messing, A., Su, M., & Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*, 56(5), 481–493. <https://doi.org/10.1002/glia.20622>
71. Leung, J. Y., Chapman, J. A., Harris, J. A., Hale, D., Chung, R. S., West, A. K., & Chuah, M. I. (2008). Olfactory ensheathing cells are attracted to, and can endocytose, bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(17), 2732–2739. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8184-1>
72. Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress

- in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
73. Liu, R., Bal, H. S., Desta, T., Krothapalli, N., Alyassi, M., Luan, Q., & Graves, D. T. (2006). Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *Journal of dental research*, *85*(6), 510–514. <https://doi.org/10.1177/154405910608500606>
74. López, N. J., Smith, P. C., & Gutierrez, J. (2002). Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *Journal of periodontology*, *73*(8), 911–924. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.8.911>
75. López, N. J., Da Silva, I., Ipinza, J., & Gutiérrez, J. (2005). Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *Journal of periodontology*, *76*(11 Suppl), 2144–2153. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2144>
76. Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., & Rogers, J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, *155*(3), 853–862. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65184-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65184-x)
77. Martande, S. S., Pradeep, A. R., Singh, S. P., Kumari, M., Suke, D. K., Raju, A. P., Naik, S. B., Singh, P., Guruprasad, C. N., & Chatterji, A. (2014). Periodontal health condition in patients with Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, *29*(6), 498–502. <https://doi.org/10.1177/1533317514549650>
78. Mastrangelo, I. A., Ahmed, M., Sato, T., Liu, W., Wang, C., Hough, P., & Smith, S. O. (2006). High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *Journal of molecular biology*, *358*(1), 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.042>
79. McCaskill, M. L., Kharbanda, K. K., Tuma, D. J., Reynolds, J. D., DeVasure, J. M., Sisson, J. H., & Wyatt, T. A. (2011). Hybrid malondialdehyde and acetaldehyde protein adducts form in the lungs of mice exposed to alcohol and cigarette smoke. *Alcoholism, clinical and experimental research*, *35*(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01443.x>

80. Miklossy, J., Kis, A., Radenovic, A., Miller, L., Forro, L., Martins, R., Reiss, K., Darbinian, N., Darekar, P., Mihaly, L., & Khalili, K. (2006). Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiology of aging*, *27*(2), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.018>
81. Miklossy J. (2015). Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, *7*, 46. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00046>
82. Minghetti, L., Ajmone-Cat, M. A., De Berardinis, M. A., & De Simone, R. (2005). Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. *Brain research. Brain research reviews*, *48*(2), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.015>
83. Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, A., Hernández, M., Bravo, D., & Vernal, R. (2019). Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *Journal of periodontology*, *90*(5), 522–534. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0079>
84. More, J., Galusso, N., Veloso, P., Montecinos, L., Finkelstein, J. P., Sanchez, G., Bull, R., Valdés, J. L., Hidalgo, C., & Paula-Lima, A. (2018). N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model. *Frontiers in aging neuroscience*, *10*, 399. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00399>
85. Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhatsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, *58*(7), 831–838. <https://doi.org/10.1002/glia.20967>
86. Park, C. H., Abramson, Z. R., Taba, M., Jr, Jin, Q., Chang, J., Kreider, J. M., Goldstein, S. A., & Giannobile, W. V. (2007). Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *Journal of periodontology*, *78*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060252>

87. Paula-Lima, A. C., Adasme, T., SanMartín, C., Sebollela, A., Hetz, C., Carrasco, M. A., Ferreira, S. T., & Hidalgo, C. (2011). Amyloid β -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca^{2+} release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxidants & redox signaling*, *14*(7), 1209–1223. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3287>
88. Perry, V. H., Nicoll, J. A., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, *6*(4), 193–201. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>
89. Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A., & Crean, S. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *36*(4), 665–677. <https://doi.org/10.3233/JAD-121918>
90. Riviere, G. R., Riviere, K. H., & Smith, K. S. (2002). Molecular and immunological evidence of oral Treponema in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral microbiology and immunology*, *17*(2), 113–118. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2001.00100.x>
91. Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y., & Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, *14*(2), 457–466. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90301-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90301-1)
92. Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., & Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5733), 476–481. <https://doi.org/10.1126/science.1113694>
93. Santos, A. N., Ewers, M., Minthon, L., Simm, A., Silber, R. E., Blennow, K., Prvulovic, D., Hansson, O., & Hampel, H. (2012). Amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *29*(1), 171–176. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111361>

94. Shaked, I., Porat, Z., Gersner, R., Kipnis, J., & Schwartz, M. (2004). Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *Journal of neuroimmunology*, 146(1-2), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.10.049>
95. Sierra, A., Tremblay, M. È., & Wake, H. (2014). Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 240. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00240>
96. Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 23(3), 329–355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
97. Singhrao, S. K., & Olsen, I. (2019). Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. *Journal of oral microbiology*, 11(1), 1563405. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563405>
98. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Ximenez-Fyvie, L. A., Feres, M., & Mager, D. (1999). Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontology 2000*, 20, 341–362. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00165.x>
99. Soto, C., Bugueño, I., Hoare, A., Gonzalez, S., Venegas, D., Salinas, D., Melgar-Rodríguez, S., Vernal, R., Gamonal, J., Quest, A. F., Pérez-Donoso, J. M., & Bravo, D. (2016). The *Porphyromonas gingivalis* O antigen is required for inhibition of apoptosis in gingival epithelial cells following bacterial infection. *Journal of periodontal research*, 51(4), 518–528. <https://doi.org/10.1111/jre.12331>
100. Streit W. J. (2004). Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of neuroscience research*, 77(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jnr.20093>
101. Streit, W. J., Braak, H., Xue, Q. S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau

- pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 118(4), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>
102. Thal D. R. (2012). The role of astrocytes in amyloid β -protein toxicity and clearance. *Experimental neurology*, 236(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.021>
103. Thanakun, S., & Izumi, Y. (2016). Effect of Periodontitis on Adiponectin, C-Reactive Protein, and Immunoglobulin G Against *Porphyromonas gingivalis* in Thai People With Overweight or Obese Status. *Journal of periodontology*, 87(5), 566–576. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150583>
104. Trombone, A. P., Ferreira, S. B., Jr, Raimundo, F. M., de Moura, K. C., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S., Campanelli, A. P., De Franco, M., & Garlet, G. P. (2009). Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *Journal of periodontal research*, 44(4), 443–451. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01133.x>
105. Udagawa, S., Katagiri, S., Maekawa, S., Takeuchi, Y., Komazaki, R., Ohtsu, A., Sasaki, N., Shiba, T., Watanabe, K., Ishihara, K., Sato, N., Miyasaka, N., & Izumi, Y. (2018). Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. *Acta odontologica Scandinavica*, 76(6), 433–441. <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1426876>
106. van Winkelhoff, A. J., Appelmelk, B. J., Kippuw, N., & de Graaff, J. (1993). K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral microbiology and immunology*, 8(5), 259–265. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1993.tb00571.x>
107. van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A., & van der Velden, U. (2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of clinical periodontology*, 29(11), 1023–1028. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.291107.x>
108. Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Antonieta Valenzuela, M., &

- Gamonal, J. (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 32(4), 383–389. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00684.x>
109. Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Del Valle, I., Silva, A., & Gamonal, J. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *Journal of periodontology*, 77(10), 1772–1780. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050376>
110. Vernal, R., Leon, R., Herrera, D., Garcia-Sanz, J. A., Silva, & Sanz, M. (2008). Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of periodontal research*, 43(6), 689–697. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01073.x>
111. Vernal, R., León, R., Silva, A., van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A., & Sanz, M. (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of clinical periodontology*, 36(10), 823–829. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01462.x>
112. Vernal, R., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., & Garcia-Sanz, J. A. (2014a). Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of clinical periodontology*, 41(1), 19–30. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12176>
113. Vernal, R., Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Pujol, M., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., & Garcia-Sanz, J. A. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependent. *Journal of clinical periodontology*, 41(5), 451–459. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12236>
114. Yamada, T., Place, N., Kosterina, N., Ostberg, T., Zhang, S. J., Grundtman, C., Erlandsson-Harris, H., Lundberg, I. E., Glenmark, B., Bruton, J. D., & Westerblad, H. (2009). Impaired myofibrillar function in the soleus muscle of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 60(11), 3280–

3289. <https://doi.org/10.1002/art.24907>
115. Wang, G., Wang, J., Fan, X., Ansari, G. A., & Khan, M. F. (2012). Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal contribute to trichloroethene-mediated autoimmunity via activating Th17 cells: dose- and time-response studies in female MRL+/+ mice. *Toxicology*, 292(2-3), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.001>
116. Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature reviews. Neuroscience*, 17(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
117. Whitfield, C., & Roberts, I. S. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 31(5), 1307–1319. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01276.x>
118. Xu, L., Zheng, J., Margittai, M., Nussinov, R., & Ma, B. (2016). How Does Hyperphosphorylation Promote Tau Aggregation and Modulate Filament Structure and Stability?. *ACS chemical neuroscience*, 7(5), 565–575. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00294>
119. Yamamoto, T., Kita, M., Oseko, F., Nakamura, T., Imanishi, J., & Kanamura, N. (2006). Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontal research*, 41(6), 554–559. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00905.x>

9. ANEXOS

9.1 Anexo N°1



CERTIFICADO DE ASISTENCIA Y PRESENTACIÓN

La División Chilena de la *International Association for Dental Research* certifica que:

Sebastián Alejandro Cordero Quezada

asistió a la XXXIII Reunión anual Virtual, Chile, el día 20 de Agosto de 2021 y
presentó el trabajo titulado:

Periodontitis and Alzheimer's Experimental Models: Neuroinflammation and Cognitive Status Comparison



Dr. Sebastián Aguayo Paul
Presidente
IADR División Chile



Dr. Daniel Ortuño Borroto
Secretario Ejecutivo
IADR División Chile

9.2 Anexo N°2



CERTIFICADO DE PREMIACIÓN

La División Chilena de la *International Association for Dental Research* certifica que:

Sebastián Cordero Quezada

recibió el premio "Colgate Palmolive" en la XXXII Reunión anual Virtual, Chile, el día
20 de Agosto de 2021 por el trabajo titulado:

Periodontitis and Alzheimer's Experimental Models:
Neuroinflammation and Cognitive Status Comparison



Dr. Sebastián Aguayo Paul
Presidente
IADR División Chile



Dr. Daniel Ortuño Borroto
Secretario Ejecutivo
IADR División Chile

9.3 Anexo N°3



Santiago, a 16 de noviembre de 2017

Certificado n°: 17085-ODO-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el protocolo número **FOUCH-041702**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Asociación entre enfermedad periodontal y enfermedad de Alzheimer”**, cuyo Investigador es **Jaime Díaz Zúñiga** y cuyo Patrocinante e Investigadora Responsable es la **Dra. Andrea Paula-Lima** del Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso e Animales de la Universidad de Chile.

Los Investigadores, se han comprometido a la ejecución de este proyecto de investigación dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 42 ratas ***Rattus norvegicus*** (cepa *Sprague-Dawley*), provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde marzo de 2017 hasta marzo de 2019 tiempo estimado de ejecución del proyecto, el cual será financiado con por los siguientes proyectos **RDP-IADR 2017-2019, Fondecyt N°1150736, Fondecyt N°1140904 y BNI P-09-015F.**

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director
CICUA - VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

9.4 Anexo N°4



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°102

Santiago, 10 de Mayo de 2017.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH 2016 titulado "**Asociación entre Enfermedad Periodontal y Enfermedad de Alzheimer**". El Investigador Responsable de este proyecto es el Prof. Jaime Díaz Zúñiga, Profesor Asistente del Departamento Odontología Conservadora.

Los ensayos propuestos en este Proyecto involucran el manejo de:

- Moléculas de ADN Recombinante,
- Organismos y Virus que contienen las moléculas antes mencionadas,
- Bacterias: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ambas de NBS-2),
- Líneas celulares primarias de animales: neuronas de hipocampo de Sprague Dawley.
- Muestras Biológicas de Sprague Dawley: Líquido Cefalorraquídeo, Sangre, Tejido Animal, Biopsia Animal.
- Compuestos Químicos de tipo irritantes, inflamables, tóxicos y que producen vapores tóxicos.
- Instrumento que utiliza Rayos X.

Los ensayos se realizarán en el Laboratorio de Biología Periodontal y Laboratorio de Biología Celular y Molecular, ambos pertenecientes a la Facultad de Odontología. El personal que manipulará las muestras biológicas, líneas celulares, bacterias, compuestos químicos y el manejo del micro-CT, se encuentran debidamente entrenados en estas áreas. Además, técnicos de laboratorio y/o estudiantes que trabajarán con el equipo de investigación estarán bajo la supervisión del Prof. Díaz o de algunos de los Co-Investigadores del presente Proyecto.

Los ensayos con las ratas Sprague Dawley respecto a OASIS Maze, procedimientos quirúrgicos, inyecciones palatinas, extracción de cerebros de los embriones, infecciones periodontales y eutanasia se realizarán en la Estación Experimental dirigida por el Dr. José Luis Valdés, la cual está ubicada en Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Por lo tanto, la bioseguridad y ética animal respecto a los ensayos mencionados anteriormente son competencia de los Comités pertenecientes a dicha Facultad.

9.5 Anexo N°5

