



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

# **Estado periodontal en pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer: estudio de casos y controles**

**Francisca Morales Benítez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO- DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Jaime Díaz Zúñiga**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Andrea Paula-Lima  
Prof. Samanta Melgar Rodríguez**

**ASESOR**

**Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar**

**Adscrito a Proyecto FIOUCh C19-04, RDP-IADR 2021-2023 y FODO-2019-0001  
(UADY)**

**Santiago – Chile**

**2022**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

# **Estado periodontal en pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer: estudio de casos y controles**

**Francisca Morales Benítez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Jaime Díaz Zúñiga**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Andrea Paula-Lima**

**Prof. Samanta Melgar Rodríguez**

**ASESOR**

**Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar**

**Adscrito a Proyecto FIOUCh C19-04, RDP-IADR 2021-2023 y FODO-2019-0001  
(UADY)**

**Santiago – Chile**

**2022**



## DEDICATORIA

A mis padres, Manuel y Soledad, por haberme forjado como la persona que soy hoy en día, por haberme dado todas las oportunidades, no sólo en mi vida académica, por siempre creer en mi y en mis habilidades, por siempre tender un abrazo cuando se necesitaba, por ser la base de mi responsabilidad y perseverancia, gracias, por estar en cada una de las etapas de mi vida y por las que vendrán.

A mis hermanas, Yumna y Javiera, por ser la guía principal, por el apoyo constante y permanente.

A mis amigos, por abrirme los ojos a las realidades, al compañerismo y al cariño.

A Esteban, por el cariño y el apoyo.

Mil gracias a todos.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia, amigos y compañeros que me apoyaron durante el transcurso de estos años y me acompañaron en cada etapa de desarrollo personal y académico. Gracias a mi profesor a cargo de esta investigación y al Proyecto FIOUCh C19-04, RDP-IADR 2021-2023 y FODO-2019-0001 (UADY), por brindarme toda la ayuda necesaria y siempre impulsándome a seguir avanzando.

## ÍNDICE

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	9
1.1 Periodontitis	9
1.2 Enfermedad de Alzheimer	10
1.3 Bacterias orales y su asociación con la EA	11
1.4 Planteamiento del problema	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVO GENERAL	15
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1 Diseño de estudio	16
5.2 Población de estudio	16
5.3 Estado cognitivo: Test MoCA	16
5.4 Examen periodontal	17
5.5 Obtención de muestras de fluido crevicular gingival y microbiota subgingival	18
5.6 Cuantificación de proteínas mediante inmunoensayo Multiplex o ELISA	19
5.7 Identificación de <i>P. gingivalis</i> mediante qPCR	19
5.8 Análisis de los datos	20
6. RESULTADOS	21
6.1 Evaluación del estado periodontal	21
EA: enfermedad de Alzheimer.	22
6.2 Cuantificación de los mediadores en FCG	22
6.3 Correlación de citoquinas con el test MoCA	25
6.4 Detección de <i>P. gingivalis</i>	26
6.5 Detección de ApoE- $\epsilon$ 4 en el FCG	28
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIÓN	35
9. BIBLIOGRAFÍA	36
10. ANEXOS	44

## RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible que se caracteriza por generar una inflamación sistémica de bajo grado causada por una microbiota disbiótica subgingival. Varios estudios han determinado una mayor prevalencia de pérdida de dientes y mala higiene bucal en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y, hasta la fecha, no se han detectado los niveles de mediadores pro-inflamatorios y la carga bacteriana a nivel periodontal. El objetivo de este estudio fue determinar el estado periodontal de los pacientes mayores de 60 años afectados o no de EA, los mediadores pro-inflamatorios, la carga de *Porphyromonas gingivalis* y la apolipoproteína E (ApoE). Se realizó un examen odontológico completo en 30 pacientes, que incluía un examen periodontal, un diagnóstico periodontal de acuerdo a los parámetros establecidos por la Asociación Americana de Periodoncia y la Federación Europea de Periodontología en su consenso de 2017 y el estado cognitivo se determinó mediante la Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA). Se tomaron muestras de microbiota subgingival y fluido crevicular gingival (FCG) de los sitios más profundos. Se aisló el DNA total de las muestras de microbiota para la cuantificación de la subunidad ribosomal 16S. Los mediadores pro-inflamatorios y la ApoE en el FGC se cuantificaron a partir de ensayos Multiplex y ELISA, respectivamente. Los pacientes con EA presentaron una periodontitis en estadio III-IV en un 80%, una mayor concentración de mediadores pro-inflamatorios y ApoE, y una mayor carga de *P. gingivalis* en comparación con los sujetos sanos. Los mediadores pro-inflamatorios y la carga de *P. gingivalis* tuvieron una correlación negativa con las puntuaciones de la prueba MoCA. Por último, se realizó una curva ROC para evaluar la especificidad y sensibilidad de los niveles de ApoE, detectando un área bajo la curva mayor a 0,8. En definitiva, aquellos pacientes con periodontitis y EA presentaron un estadio de la enfermedad periodontal más avanzado y severo, mayores valores de mediadores pro-inflamatorios y mayor carga bacteriana. Los pacientes afectados de EA presentan una alta prevalencia de periodontitis en comparación con sujetos sanos. Además, los niveles detectados de ApoE nos permite determinar claramente a los pacientes con salud, periodontitis y periodontitis y EA.

# 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

## 1.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible (ECNT) producida por la disbiosis de la microbiota subgingival, que compromete la integridad de los tejidos que soportan al diente, tales como: ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (1). La periodontitis se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente mediada por la respuesta inmune del hospedero, donde las células de este sistema que participan son los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T colaboradores (Th) (2). Estas células liberan de forma exacerbada mediadores pro-inflamatorios, tales como interleuquinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , factores pro-resortivos y metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que tienen la capacidad de difundir a la circulación sanguínea (3). Entre las bacterias responsables de la disbiosis de la microbiota subgingival se encuentran *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis* y *Porphyromonas gingivalis*, las que se consideran esenciales para el inicio y progresión de la enfermedad (4). Entre las bacterias clave, *P. gingivalis* es la más prevalente en sitios afectados de periodontitis.

La periodontitis es una ECNT de progresión lenta y larga duración, que junto con otras ECNT comparten factores de riesgo, tales como el exceso de consumo de azúcar, alcoholismo, tabaquismo, dieta rica en grasas y sal, factores genéticos y determinantes socioeconómicos (5). Actualmente se reconoce que existe una asociación significativa entre la periodontitis con otras condiciones tales como el parto prematuro y bajo peso al nacer, la artritis reumatoide, el síndrome metabólico y, últimamente, con la Enfermedad de Alzheimer (EA) (6). De esta forma la presencia de periodontitis en un paciente con otra ECNT puede contribuir al desarrollo y progresión de éstas, ya sea de forma directa o indirecta (5).

Las bacterias que participan en el desarrollo de la periodontitis, al activar la respuesta inmune del hospedero, generan la producción de moléculas pro-inflamatorias, que difunden desde el tejido conectivo periodontal a la circulación sanguínea periférica; debido a esto, estas citoquinas pueden difundir por el cuerpo y afectar a otros órganos o tejidos (7). Dentro de estas bacterias, *P. gingivalis* tiene 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 (CRP) e IL-6 a nivel hepático o de colonizar los vasos placentarios generando riesgo de parto prematuro (8, 9, 10). 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  $\kappa$ B (RANKL), de secreción de interferón (IFN)- $\gamma$  y de infiltrado de linfocitos Th1 y Th17 (11, 12, 13). Debido a ello, la periodontitis produce una inflamación sistémica de bajo grado, también conocida por sus siglas en inglés como CLIP (*chronic low-grade inflammatory phenotype*). 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 (14). Recientemente, se ha determinado que la presencia de *P. gingivalis* estaría asociada a eventos neuroinflamatorios compatibles con la EA (15, 16, 17, 18, 19, 20). En efecto, tanto en estudios *in vivo* como en humanos, la presencia de *P. gingivalis* se ha detectado en distintos tejidos cerebrales y, su detección, se asoció con la presencia de péptido de amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ) y neuroinflamación (15, 16, 17, 18, 19).

## **1.2 Enfermedad de Alzheimer**

La EA es un tipo de demencia caracterizada por afectar la memoria, pensamiento, comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria. Es la forma más común de demencia, siendo una de las principales causas de discapacidad y dependencia en la población mayor (21). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el número total de personas con demencia alcance los 82 millones en 2030 y 152 millones para el año 2050 (22). La EA se caracteriza por la formación de placas extracelulares de A $\beta$  y agregados intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada conocidos como ovillos neurofibrilares (NFT), lo que lleva a una pérdida paulatina de las sinapsis neuronales y, en última instancia, a la degeneración neuronal con disminución de neurotransmisores esenciales (21). La hipótesis de origen infeccioso de la neuroinflamación propone que, debido a una invasión del cerebro por bacterias se produciría una respuesta inmuno-inflamatoria en las células residentes lo que incrementaría la producción de A $\beta$ . En efecto, tanto *T. denticola* (23) como *P. gingivalis* se han detectado en el líquido cerebro-espinal (LCE) o el IV ventrículo cerebral de sujetos que fallecieron y estaban afectados de EA y, recientemente, factores de virulencia de *P. gingivalis*

se detectaron en los hipocampos de personas afectadas o no de EA, sugiriendo que esta bacteria puede migrar al cerebro independiente de si está afectada o no de EA (24, 16).

En pacientes afectados de EA, los niveles de los mediadores pro-inflamatorios séricos son mayores comparados con pacientes de la misma edad y que no están afectados EA (25). Una posible explicación de la presencia de microorganismos en el cerebro de personas afectadas o no de EA radica en la capacidad de ciertas bacterias para migrar desde el sitio de invasión hacia el cerebro por vía nerviosa. Una vez en el cerebro, las bacterias pueden ser reconocidas por los receptores tipo TLR4 presentes en las microglías e inducir una respuesta pro-inflamatoria o inmuno-moduladora, la que depende de su virulencia y patogenicidad. Así, bacterias clave de la periodontitis, inducirían la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  mediada por TLR4, y este estado pro-inflamatorio podría generar un cambio en el fenotipo de los astrocitos, desde uno fisiológico a un astrocito reactivo (26). El astrocito reactivo secreta mayor cantidad de A $\beta$ , que en algunos trabajos de la literatura se han sugerido que podría funcionar como un péptido antimicrobiano con el objetivo de encapsular a las bacterias y facilitar su reconocimiento y posterior fagocitosis por las microglías (27). La fagocitosis de este complejo es mediada por la apolipoproteína E (ApoE), que reconoce al A $\beta$  que se encuentra rodeando a las bacterias. Así, alrededor de la bacteria se genera un infiltrado de A $\beta$ , ApoE y microglías, creando núcleos de mediadores pro-inflamatorios que podrán afectar la función de los astrocitos adyacentes.

### **1.3 Bacterias orales y su asociación con la EA**

El principal mecanismo de asociación entre las bacterias orales como *P. gingivalis* y la EA sería mediante la migración de los microorganismos al cerebro durante la vida del individuo y su capacidad de alojarse en distintas zonas del cerebro donde, dependiendo de su virulencia, podrían desencadenar eventos neuroinflamatorios (28). Están descritos en la literatura 3 vías posibles por las que las bacterias de la microbiota oral o los mediadores pro-inflamatorios podrían afectar al cerebro: 1) afectando la integridad de la barrera hemato-encefálica (BHE), 2) mediante la migración por los vasos linfáticos hacia los órganos circunventriculares y espacios peri vasculares y 3) mediante la migración retrógrada por las terminaciones nerviosas del nervio trigémino (29). Las acciones como masticar o cepillarse los dientes generan una bacteremia transitoria que puede producirse alrededor de 3 veces al día, que es controlada por

el sistema inmune del hospedero, pero en pacientes mayores esta respuesta podría verse disminuida, como puede ser el caso de pacientes con EA (28).

Las moléculas pro-inflamatorias producidas por la periodontitis a nivel oral pueden afectar la permeabilidad de la BHE, mediante el efecto de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  presentes en la circulación sanguínea. Estos mediadores cumplirían 2 funciones determinantes de la permeabilidad de la BHE: 1) difundirían al cerebro y activarían una respuesta pro-inflamatoria en las microglías y 2) estimularían a las células endoteliales a producir moléculas de señalización inductoras de la quimiotaxis, tales como, óxido nítrico, selectinas, entre otras. Así, las microglías secretarían MMP2 y MMP9 que degradarían a las proteínas que conforman la unidad neurovascular —que da origen a la BHE— compuesta por endotelios, oligodendrocitos y astrocitos, además de colágeno, laminina, agrina y  $\beta$ -dístroglicano. En efecto, las MMPs secretadas degradarían las proteínas de la unidad neurovascular, induciendo el desacople de los astrocitos a los endotelios con el objetivo de permitir la migración de células inmunes, tales como los macrófagos, al interior del cerebro. Si bien, este fenómeno cumple un rol protector, ante condiciones inflamatorias crónicas como la presencia de una ECNT, estos eventos son permanentes y evita que la BHE vuelva a reintegrarse, generando un *breakdown* persistente. De esta manera, si la ECNT es desencadenada por bacterias que ingresan transitoria o persistentemente a la circulación sanguínea, podrían ingresar al cerebro en conjunto con los mediadores pro-inflamatorios (28). Además, una vía alterna a la descrita anteriormente es de los órganos circunventriculares, que permiten la salida de hormonas polipéptídicas del hipotálamo sin el paso por la BHE, donde también podrían difundir mediadores pro-inflamatorios (29).

Distintos estudios han demostrado la presencia de virus, tales como virus del herpes simple tipo 1 (VH1), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hongos como *Candida albicans*, o bacterias como *Borrelia burgdorferi* o *Treponema denticola* en cerebros de pacientes que fallecieron y estaban afectados de EA (30, 31, 32, 33). 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 (34). 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 (35).

En términos generales, las bacterias de la microbiota oral capaces de inducir una disbiosis o los mediadores pro-inflamatorios podrían potencialmente migrar al cerebro y participar del fenómeno neuroinflamatorio, hipótesis conocida como el origen infeccioso de la neuroinflamación. De esta manera, al existir un conjunto de bacterias que desencadenan la periodontitis y que genera hospederos microbiológicamente susceptibles, también podría ser para desarrollar algún tipo de demencia, tal como la EA.

#### **1.4 Planteamiento del problema**

Diversos estudios han identificado la presencia de factores de virulencia o bacterias íntegras en el tejido cerebral *post mortem*, suero o LCE de pacientes afectados o no de EA. La presencia de *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia* se ha detectado en distintos tejidos cerebrales, identificándose *P. gingivalis* y *T. denticola* en el hipocampo, corteza cerebral, IV ventrículo o LCE de pacientes afectados o no de EA (23, 24, 16). En este mismo sentido, distintos estudios detectaron la presencia de anticuerpos anti-bacterias periodontales en pacientes afectados de EA (25,37, 38). Además, en estudios observacionales la presencia de anticuerpos contra *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* y *P. intermedia* se ha detectado en suero o FCG de pacientes afectados de EA con o sin periodontitis, demostrando que existe un incremento de estos anticuerpos cuando los pacientes se encuentran afectados de EA y periodontitis (26, 36, 37, 38). En un estudio de casos y controles se determinó la presencia de *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* en FCG de pacientes con y sin EA. De estas bacterias, la mayor carga de *P. gingivalis* se asoció con un mayor deterioro cognitivo de pacientes con EA (39). En efecto, en pacientes afectados de periodontitis y EA el deterioro cognitivo es 6 veces mayor al detectado en pacientes con EA y sin periodontitis (40).

Al analizar si *P. gingivalis* puede ingresar al cerebro de personas que no estén afectadas de EA, los estudios experimentales y algunos estudios descriptivos han demostrado que puede ser posible. Las bacteremias producidas por *P. gingivalis* a lo largo de la vida de la persona podrían generar la formación de ateromas. En efecto, *P. gingivalis* puede ingresar a la capa íntima de las arterias y colonizarlas mediante la acción directa de sus gingipaínas (41). Una vez en la arteria, las células endoteliales responden secretando mediadores pro-inflamatorios

que permitirán la migración e ingreso de macrófagos al sitio afectado mediante la secreción de MMP-2 y MMP-9 (42). De esta manera, el ingreso de *P. gingivalis* y la respuesta pro-inflamatoria inducida ante ella puede generar una respuesta inmuno-inflamatoria que afecte a los astrocitos de la unidad neurovascular, induciendo su desacople y con ello, la ruptura de la BHE secundaria a la aterogénesis (19, 43). Así, resulta interesante evaluar si la presencia de *P. gingivalis* en sacos periodontales de pacientes afectados de periodontitis se asocia o no con la EA y si existe alguna relación entre su presencia y el estado cognitivo de pacientes afectados o no de EA.

## **2. HIPÓTESIS**

En los pacientes afectados de EA existe una alta prevalencia de periodontitis, la cual se caracteriza por ser de una mayor severidad, presentar mayor concentración de mediadores pro-inflamatorios en fluido crevicular gingival, y una mayor carga de *P. gingivalis* en los sacos periodontales más profundos, en comparación con sujetos sin EA.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el estado periodontal, la presencia de marcadores pro-inflamatorios y la carga de *P. gingivalis* en pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el estado periodontal de pacientes mayores de 60 años afectados o no de enfermedad de Alzheimer.
2. Determinar la presencia de las moléculas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, GM-CSF y ApoE- $\epsilon$ 4) y la presencia de *P. gingivalis* en muestras de FCG de pacientes mayores de 60 años afectados o no de enfermedad de Alzheimer.
3. Correlacionar en pacientes afectados de EA la presencia de *P. gingivalis* con los mediadores pro-inflamatorios y el diagnóstico de periodontitis o salud periodontal.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Diseño de estudio**

Analítico observacional, prospectivo, transversal de casos y controles.

### **5.2 Población de estudio**

Para el estudio se seleccionaron sujetos adultos hombres o mujeres mayores de 60 años de edad, residentes del Asilo Brunet Celarain de la ciudad de Mérida, Yucatán, México, que cumplieron con los requisitos de inclusión durante los periodos comprendidos entre septiembre a noviembre del año 2019. Como criterios de inclusión, se seleccionaron pacientes que estaban diagnosticados de EA por un especialista en neurología del Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. Posterior a ello, se excluyeron los pacientes cuyo estado cognitivo no permitía seguir las indicaciones, el nivel de cooperación no era el adecuado, que presentaron agresividad o que sufrieron accidente vascular encefálico, o hayan estado bajo tratamiento con antibióticos o AINEs 6 meses previo al ingreso al estudio. Se ocuparon los criterios de NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Criteria).

Los pacientes se incluyeron por conveniencia de manera consecutiva. Cada paciente debió estar en compañía de su apoderado legal, a quien se le explicó los procedimientos a realizar, sus ventajas, desventajas y posibles riesgos. Luego de ello, el paciente y su apoderado consintieron, firmando el apoderado el consentimiento informado, aprobado previamente por el comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), de Mérida, México (Anexo N°1).

Como controles, se seleccionaron pacientes que no estaban afectados de ningún tipo de demencia y que asistieron a la clínica de postítulo de Especialización en Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UADY durante el mismo período de tiempo y que tuviesen edades similares a los pacientes afectados de EA.

### **5.3 Estado cognitivo: Test MoCA**

La Evaluación Cognitiva de Montreal es una breve prueba de 30 preguntas, cuya aplicación toma de 10 a 12 minutos, cuyo objetivo es evaluar las disfunciones cognitivas y

ayudar a identificar la demencia. Este Test evalúa diferentes habilidades cognitivas, tales como: orientación, memoria a corto plazo, función ejecutiva, habilidades del lenguaje, abstracción, denominación de animales, atención y prueba del dibujo del reloj. Las puntuaciones del Test MoCA van de 0 a 30 puntos, siendo mayor o igual a 26 un grado normal. Se agrega un punto si el paciente es menor a 12 años o no tiene estudios formales. Un puntaje menor a 21 indica un deterioro cognitivo leve; y un puntaje menor a 14 indica sujetos con demencia. El Test MoCA ayuda a los profesionales de la salud para determinar rápidamente si un paciente tiene una función cognitiva anormal y si requiere de un examen más completo para la EA. (Anexo N°2). La confiabilidad del Test MoCA fue valorada mediante alfa Cronbach para obtener la consistencia interna del instrumento; el nivel de significancia estadística se estableció con un valor de  $p < 0,05$ .

#### **5.4 Examen periodontal**

Posteriormente, a cada paciente se le realizó un examen periodontal por un cirujano dentista especialista en Periodoncia y en el periodontograma se registró la profundidad al sondaje, la posición de la encía marginal, el nivel de inserción clínica, el índice de sangrado y el índice de placa en 6 sitios periodontales por diente, excluyendo los terceros molares. El periodontograma a utilizar fue el Periodontal Chart, un programa diseñado por la Universidad de Berna y de acceso gratuito <https://www.periodontalchart-online.com/uk/>. Para el diagnóstico periodontal se consideraron los parámetros de la clasificación de enfermedades periodontales de 2017 de la AAP y EFP. El diagnóstico de “salud periodontal” se determinó utilizando los criterios presentados de *salud periodontal clínica* definido como: un estado caracterizado por una ausencia o niveles mínimos de inflamación clínica en un periodonto con estructuras de soporte normales. El diagnóstico de gingivitis se estableció ante un sangrado al sondaje  $\geq 10\%$  (localizada) y  $\geq 30\%$  (generalizada); en pacientes con un periodonto reducido se consideró una pérdida de inserción y sangrado al sondaje con  $\geq 10\%$ , y sin sangrado al sondaje y sitio con  $\geq 4$  mm de profundidad. La periodontitis se diagnosticó según los criterios del estadiaje. El estadio I se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de 1 a 2 mm, una puntuación de sondaje máxima de  $\leq 4$  mm y sin pérdida de dientes debido a periodontitis. El estadio II se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de 3 a 4 mm, una puntuación de sondaje máxima de  $\leq 5$  mm y sin pérdida de dientes debido a

periodontitis. El estadio III se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de  $\geq 5$  mm, las complicaciones del estadio II y adicionalmente una profundidad al sondaje de  $\geq 6$  mm con pérdida de dientes debido a periodontitis en al menos 4 dientes. El estadio IV se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de  $\geq 5$  mm, las complicaciones del estadio III y la pérdida de dientes debido a periodontitis de más de 5 dientes.

### **5.5 Obtención de muestras de fluido crevicular gingival y microbiota subgingival**

A todos los pacientes se le tomaron muestras de FCG y microbiota subgingival, tal como se detalla a continuación:

Las muestras de FCG se tomaron según el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biología Periodontal de la Universidad de Chile (44, 45, 46). Brevemente, se realizó el aislamiento relativo del diente que tuviese el mayor valor detectado en los sacos periodontales del examen periodontal. Luego, se eliminó la microbiota supragingival con una cureta Gracey 11-12 o 13-14 estéril y se introdujo un PerioPaper (OralFlow Inc.) en el surco gingivo-dentario o saco periodontal durante 1 min. Posteriormente, el PerioPaper se introdujo en un tubo estéril rotulado con los datos del paciente y almacenó a 4°C hasta su traslado al laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología UADY, para almacenarse a -80°C. Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron. Posteriormente, se adicionaron 100 $\mu$ L de tampón de fosfato salino (PBS) estéril y se centrifugó a 10.000 xg durante 15 min a 4°C. La muestra eludida se liofilizó y posteriormente, almacenó a -80°C hasta su envío al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Una vez allí, las muestras se reconstituyeron con PBS y almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Para la obtención de las muestras microbiológicas, los sitios periodontales seleccionados se aislaron en forma relativa con torundas de algodón y secaron suavemente con aire a presión. Se seleccionaron al menos 2 sitios en dientes distintos con la mayor profundidad al sondaje y realizó el protocolo establecido por Abusleme *et al* (45). En pacientes sin enfermedad periodontal, se tomó la microbiota supragingival. Para los pacientes con algún grado de enfermedad periodontal, la microbiota supragingival se eliminó utilizando una cureta Gracey

11-12 o 13-14 estéril. Una nueva cureta estéril se introdujo subgingivalmente hasta lograr una mínima resistencia tisular y se retiró arrastrando la microbiota adherida a la superficie radicular. Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron. La muestra se depositó en un tubo Eppendorf con 1mL de medio microbiológico RTF (Reduced Transport Fluid, que contiene: 200 mg/L de ditiotreitól y 0,1mg/L de resarzurina) a pH 8. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Microbiología Oral para su procesamiento, donde antes de 2 horas de su obtención se realizó un *pool* de las muestras de microbiota subgingival por cada paciente y se agitaron vigorosamente. Luego, las muestras se liofilizaron y enviaron al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Una vez en el Laboratorio de Biología Periodontal, las muestras se reconstituyeron y almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **5.6 Cuantificación de proteínas mediante inmunoensayo Multiplex o ELISA**

A partir de 100 µL de FGC se cuantificaron los niveles de secreción de las moléculas IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27y GM-CSF mediante inmunoensayo Multiplex, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™ Cytokine 25-Plex Human Panel- Thermo Fisher Scientific®) disponibles en línea ([https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FLHC0009M\\_Lot\\_1402357.pdf&title=SHVtYW4gQ3I0b2tpbmUgTWFnbmV0aWMgMjUtUGxleCBQYW5lbA==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FLHC0009M_Lot_1402357.pdf&title=SHVtYW4gQ3I0b2tpbmUgTWFnbmV0aWMgMjUtUGxleCBQYW5lbA==)) y se evaluó la absorbancia usando un lector automatizado de placas del sistema Luminex™ (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Además, a partir de 100 µL de FGC se cuantificaron los niveles de ApoE-ε4 mediante inmunoensayo ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™ Apolipoprotein E4 Human ELISA Kit- Thermo Fisher Scientific®) disponibles en línea (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/EHAPOE4.pdf>) y evaluó la absorbancia usando un espectrofotómetro (Synergy, Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

### **5.7 Identificación de *P. gingivalis* mediante qPCR**

A partir del volumen total de las muestras microbiológicas reconstituidas se procedió con la purificación del DNA total utilizando el *kit* FavorPrep™ (Tissue Genomic DNA extraction Mini

Kit, Favorgen Biotech Corp) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el DNA obtenido se rotuló y almacenó a -80°C hasta su uso.

Para identificar la presencia de *P. gingivalis* se utilizó el método de la cuantificación absoluta, basándose en una curva de niveles de expresión relativo de la subunidad 16S v/s las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para la confección de esta curva se utilizó la cepa ATCC®33277™. Con la curva obtenida se originó la ecuación de la recta que nos permite definir la carga bacteriana mediante la determinación del valor del CT de cada muestra. Brevemente, a partir de 50 ng de DNA se amplificaron mediante qPCR la subunidad rRNA 16S, utilizando partidores específicos (Tabla 1), el kit KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, USA) y un termociclador qPCR StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) según el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de 95°C durante 3 min y 40 ciclos de 95°C durante 3 seg y 60° durante 30 seg.

**Tabla 1. Partidores utilizados para la detección de *P. gingivalis*. Publicados en Díaz-Zúñiga et al, 2020.**

Gen	Partidor Forward	Partidor Reverse
16S DNA	<i>aaacccaatctctgagttcttcttc</i>	<i>atgccaacttgacgttaa</i>

### 5.8 Análisis de los datos

Los antecedentes clínicos correspondientes a los distintos índices periodontales, test MoCA y estadios de periodontitis se representaron como frecuencias (%). Los datos de los niveles de secreción de las distintas citoquinas se representaron como el valor promedio de la concentración (pg/mL) ± desviación estándar. La cuantificación absoluta se representan como el valor promedio ± desviación estándar de las UFC/mL. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Levène y se analizaron utilizando la prueba de ANOVA y el *post-hoc* de 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.

## 6. RESULTADOS

Entre los meses de septiembre a noviembre del año 2019 se evaluó un total de 30 pacientes, de ellos, 10 pacientes estaban afectados de EA. En base a la evaluación periodontal se determinó la presencia o ausencia de gingivitis o periodontitis, donde finalmente los participantes quedaron reunidos en 3 grupos: pacientes con EA y periodontitis, pacientes con periodontitis y sin EA y sujetos sanos, constituidos por 10 personas cada uno. La edad promedio, el porcentaje de mujeres, puntaje del test MoCA y su clasificación y los parámetros periodontales se representan en la Tabla N°2.

### 6.1 Evaluación del estado periodontal

Al evaluar los parámetros periodontales se pudo observar que los pacientes con periodontitis y EA presentaron una mayor PS, pérdida de LAC, IS e IP en comparación con los pacientes sin EA o sujetos sanos (Tabla N°2).

	Sanos (n=10)	Periodontitis	
		sin-EA (n=10)	EA (n=10)
<b>Edad</b>	69.10 ± 4.72	69.60 ± 3.83	71.00 ± 4.8
<b>Sexo (Femenino)</b>	60 %	50 %	50 %
<b>Puntaje MoCA</b>	25.80 ± 1.03	25.20 ± 1.61	16.56 ± 2.65
<b>MoCA etapa 2</b>	20 %	30 %	100 %
<b>MoCA etapa 1</b>	80 %	70 %	0 %
<b>Parámetros periodontales</b>			
PS (mm)	2.70 ± 0.48	6.70 ± 1.25	7.2 ± 2.04
NIC (mm)	-0.67 ± 0.89	-3.35 ± 1.65	-6.8 ± 1.97
IS (%)	5.30 ± 2.90	28.80 ± 5.78	41.90 ± 10.23
IP (%)	12.70 ± 2.49	31.70 ± 7.273	45.50 ± 7.09
<i>P. gingivalis</i> load (CFU/mL)	5.78 ± 0.74	9.01 ± 2.10	9.31 ± 2.77

**Tabla 2. Salud y Enfermedad de Alzheimer y los parámetros periodontales.**

PS: Profundidad al sondaje, NIC: nivel de inserción clínico, IS: índice de sangrado, IP: índice de placa, MoCA: Montreal Cognitive Assessment, EA: enfermedad de Alzheimer.

En particular, se pudo detectar que los pacientes con EA presentaron un puntaje en el

test MoCA de 16,56 puntos, lo que indica un deterioro cognitivo leve, lo que fue significativamente menor en comparación a los sujetos sin EA ( $p < 0,05$ ). Al evaluar la distribución del diagnóstico periodontal según la presencia o ausencia de EA se observó que mientras los pacientes sin EA presentaron periodontitis en estadio I (30%), estadio III (50%) y estadio IV (20%), los pacientes con EA presentaron periodontitis en estadio II (10%), estadio III (10%) y estadio IV (80%) (Tabla N°3).

**Tabla 3. Salud y enfermedad de Alzheimer y su diagnóstico periodontal.**

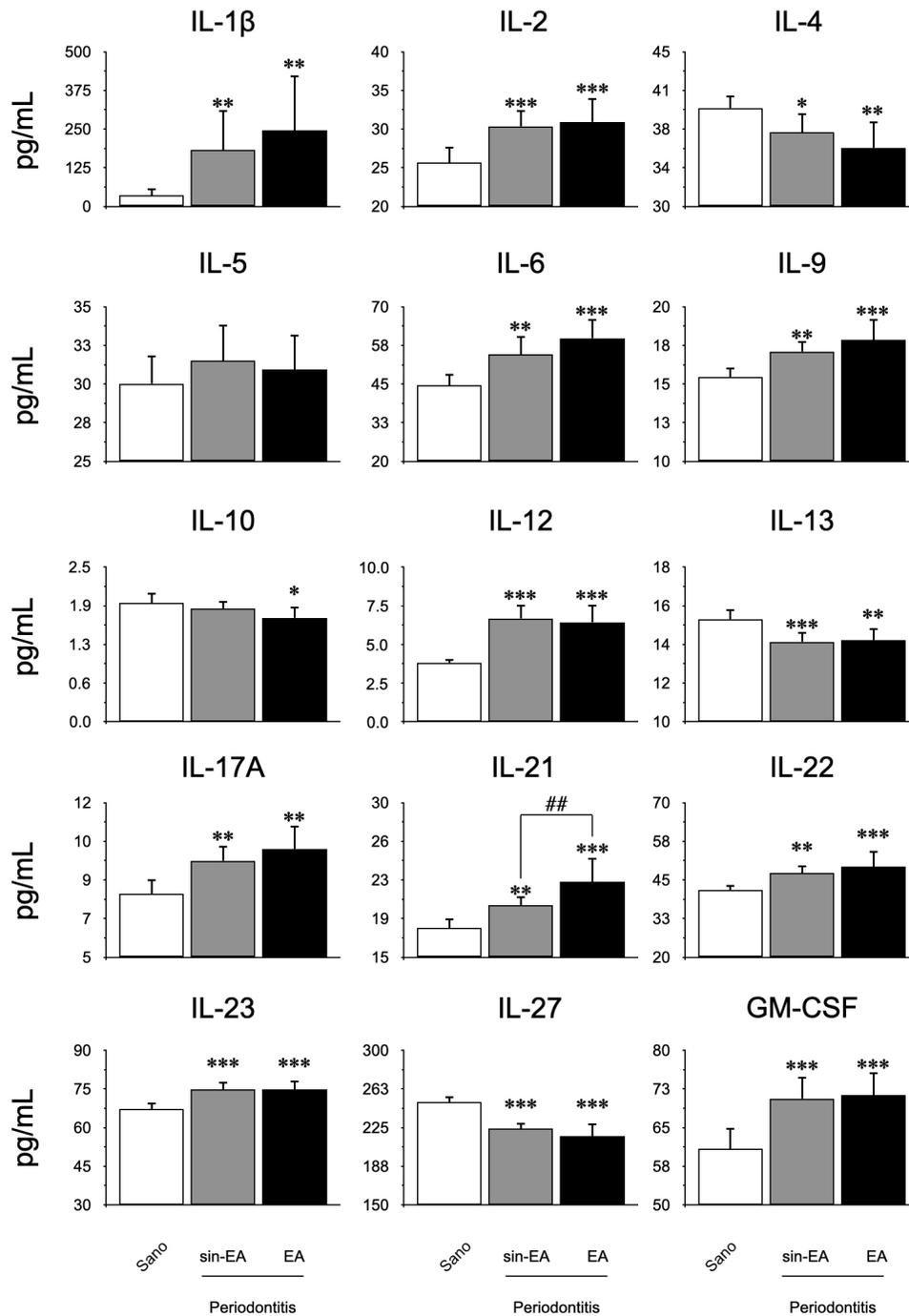
	Sanos (n=10)	Periodontitis	
		sin-EA (n=10)	EA (n=10)
Salud	100 %		0 %
Gingivitis	0 %	0 %	0 %
Periodontitis estadio I	0 %	30 %	0 %
Periodontitis estadio II	0 %	0 %	10 %
Periodontitis estadio III	0 %	50 %	10 %
Periodontitis estadio IV	0 %	20 %	80 %

EA: enfermedad de Alzheimer.

## **6.2 Cuantificación de los mediadores en FCG**

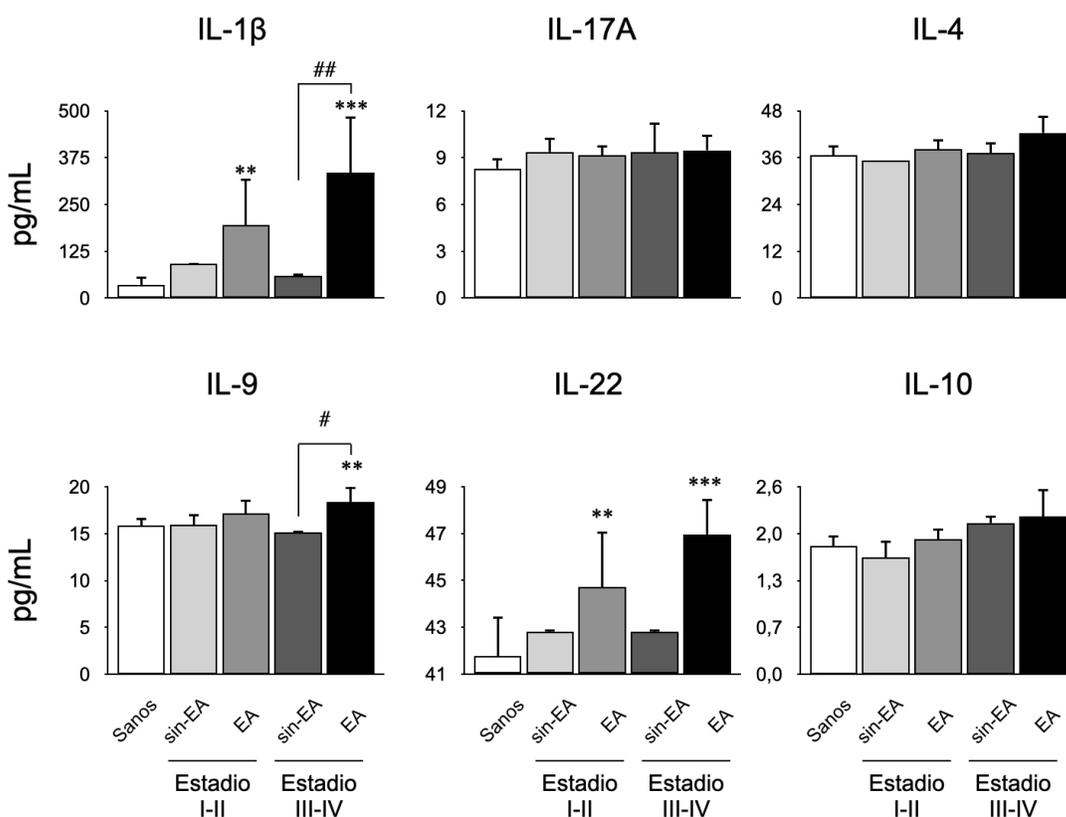
A partir de las muestras de FCG de todos los pacientes, los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 y GM-CSF se cuantificaron mediante Multiplex (Fig. N°1). Para las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-21, IL-23 y GM-CSF se detectó un aumento en pacientes con periodontitis afectados o no con EA, en comparación con sujetos sanos. Adicionalmente, para IL-21 se detectó una diferencia significativa en pacientes con periodontitis y EA en comparación con pacientes con periodontitis sin EA. Para los niveles de secreción de las citoquinas pro-resortivas IL-17A e IL-22, se detectó un aumento en los pacientes con periodontitis con o sin EA, en comparación con controles sanos. Al analizar las citoquinas inmuno-moduladoras o

reguladoras, se detectó una disminución significativa de IL-4, IL-13 e IL-27 en ambas condiciones de periodontitis con o sin EA en comparación con los controles. Además, para IL-10 se detectó una disminución en los niveles de secreción en pacientes con periodontitis y EA, en comparación con los controles.



**Figura N°1. Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios, osteo-resortivos, inmuno-moduladores o inmuno-reguladores en FCG de pacientes con o sin EA.** A partir de muestras de FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de EA, se cuantificaron los niveles de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 y GM-CSF mediante Multiplex. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ###p<0,01.

Además, analizamos los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-17A e IL-22 según el estadio de periodontitis que presentaban los pacientes con o sin EA (Fig. N°2). Para IL-1 $\beta$ , IL-9 e IL-22 se detectó un aumento en los niveles de secreción en pacientes con EA y periodontitis en estadio III-IV en comparación con controles sanos. Además, en pacientes con EA y periodontitis estadio III-IV se detectó un aumento en los niveles de secreción de IL-1 $\beta$  e IL-9 en comparación con pacientes con EA afectados por periodontitis estadio I-II.

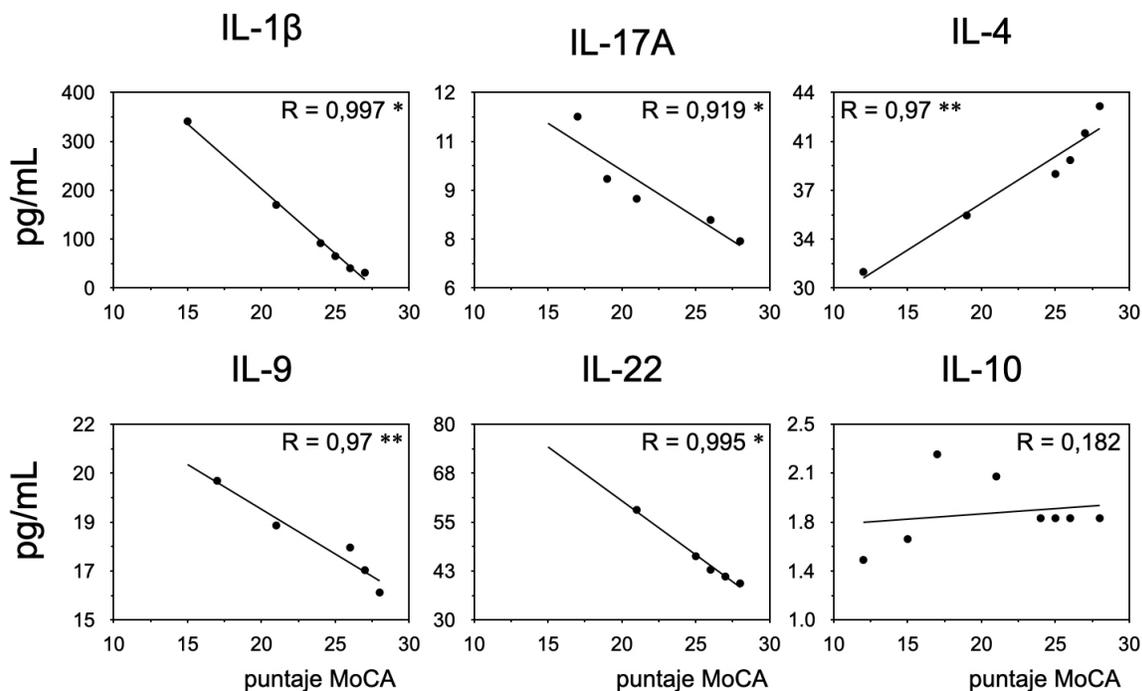


**Figura N°2. Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios, pro-resortivos, inmuno-moduladores o reguladores, agrupados según diagnóstico periodontal y presencia o ausencia de EA.** A partir de muestras de FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de EA, se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-17A, e IL-22 mediante Multiplex. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ .

### 6.3 Correlación de citoquinas con el test MoCA

Para determinar si los niveles de citoquinas asociadas a inflamación, pro-resorción ósea, regulación o modulación de la respuesta inmune con las diferentes puntuaciones de la prueba

MoCA, evaluamos la asociación mediante la correlación de *Pearson* (R) (Fig. N°3). Cuando analizamos las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-9, y las pro-resortivas IL-17A e IL-22, se detectó una correlación negativa con la puntuación del test MoCA. Para la citoquina moduladora de IL-4, se observó una correlación positiva con la puntuación MoCA, y para la IL-10 reguladora, no se detectó correlación.

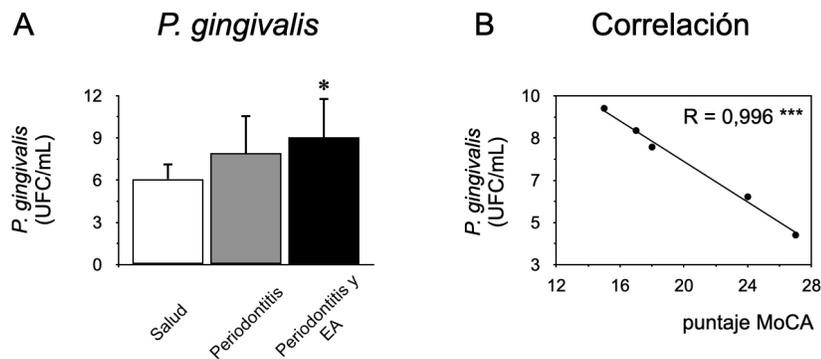


**Figura N°3. Correlación entre los mediadores pro-inflamatorios, pro-resortivos, inmuno-moduladores o reguladores con los puntajes del test MoCA.** A partir de muestras de FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de EA, se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-17A, e IL-22 mediante Multiplex y se correlacionaron con los distintos puntajes del test MoCA obtenidos de cada paciente. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ .

#### 6.4 Detección de *P. gingivalis*

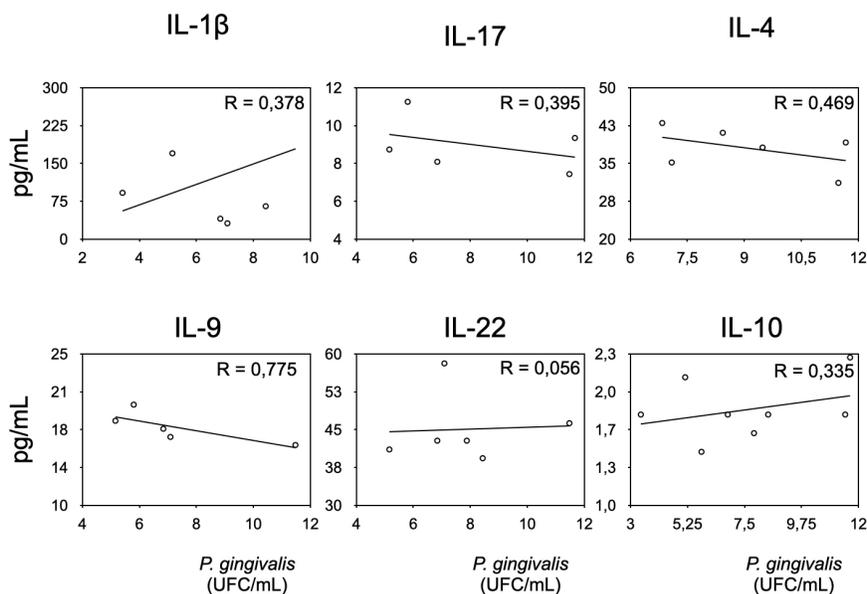
En muestras de microbiota subgingival de todos los pacientes se cuantificó mediante qPCR la presencia de *P. gingivalis* mediante el cálculo de las UFC/mL (Tabla N°2, Fig. N°4A). Se detectó una alta carga de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis y EA en comparación con sujetos sanos. Curiosamente, no se detectaron diferencias en la carga de *P. gingivalis*

entre sujetos sanos y pacientes con periodontitis. Además, cuando se correlacionó la carga de *P. gingivalis* con el puntaje MoCA observamos una correlación negativa (Fig. N°4B).



**Figura N°4. Detección de *P. gingivalis* en muestras de microbiota.** A) A partir de muestras de microbiota de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de EA, se detectó la presencia de *P. gingivalis* mediante la cuantificación de la subunidad ribosomal 16S. B) Correlación de Pearson para determinar la asociación entre la carga de *P. gingivalis* y los puntajes del test MoCA. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

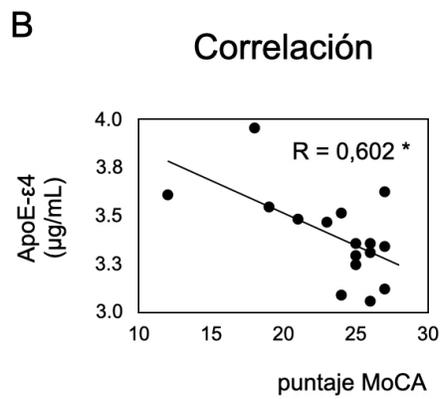
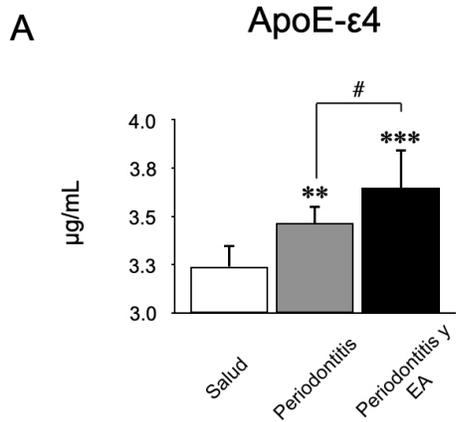
Posteriormente y con el objetivo de evaluar si la mayor o menor carga de *P. gingivalis* se asocia o no con la presencia de mediadores pro-inflamatorios, se evaluó su correlación (Fig. N°5). Cuando se evaluó la correlación de *P. gingivalis* con IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-17A, e IL-22, no se detectaron correlaciones entre las variables.



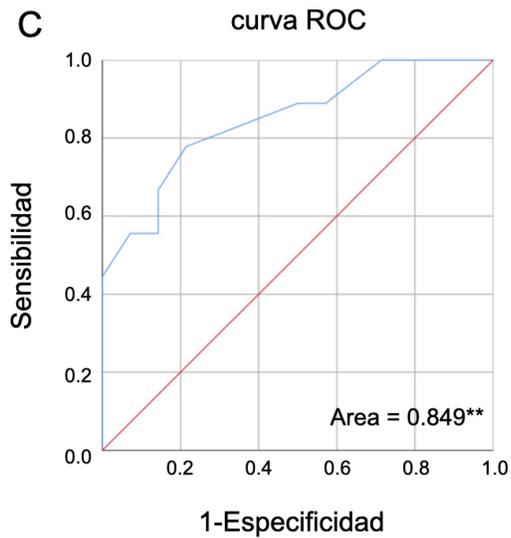
**Figura N°5. Correlación entre la carga de *P. gingivalis* con los mediadores pro-inflamatorios, pro-resortivos, inmuno-moduladores o reguladores.** A partir de muestras de microbiota subgingival y FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de EA, se cuantificaron los niveles absolutos de la subunidad ribosomal 16S de *P. gingivalis* y los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-17A, e IL-22 mediante qPCR y Multiplex, respectivamente. La asociación se determinó mediante la correlación de Pearson (R).

### **6.5 Detección de ApoE- $\epsilon$ 4 en el FCG**

Para determinar si en el FCG es posible detectar ApoE, una proteína asociada a un mayor riesgo de EA, y si el estado periodontal influye en los niveles o no, evaluamos mediante ELISA los niveles secretados de la forma  $\epsilon$ 4 en todos los grupos. (Figura 6A). En primer lugar, pudimos cuantificar ApoE- $\epsilon$ 4 en el FCG y detectar diferencias. En ambos grupos de pacientes afectados de periodontitis hubo un aumento en los niveles de secreción de ApoE- $\epsilon$ 4 en comparación con los controles sanos. Además, los pacientes con periodontitis y EA produjeron más ApoE- $\epsilon$ 4 que los pacientes con periodontitis y sin EA. En segundo lugar, determinamos la asociación de los niveles de ApoE- $\epsilon$ 4 con las puntuaciones de MoCA mediante la correlación de *Pearson*, detectando una correlación negativa (Fig. 6B). Debido a que no existe evidencia en la literatura de la detección de esta molécula en FCG, decidimos analizar la curva ROC (Figura 6C). El área bajo la curva fue superior a 0,8, lo que sugiere que la detección de ApoE- $\epsilon$ 4 en FCG de pacientes con diferentes estados cognitivos podría tener una evaluación positiva.



**Figura N°6. Cuantificación de ApoE.** A) Niveles de producción de ApoE-ε4 en FCG de pacientes con o sin EA. B) Correlación de Pearson (R) de los niveles de producción de ApoE-ε4 con el puntaje obtenido en el test MoCA. C) Curva ROC de sensibilidad v/v 1-especificidad de detección de ApoE-ε4 en FGC según diagnóstico de periodontitis en presencia o ausencia de EA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$ .



## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se evaluó el estado periodontal de personas mayores con periodontitis y EA, con periodontitis sin EA y sujetos sanos, de los cuales se evaluaron los parámetros periodontales tales como pérdida del NIC, PS, IS, IP y carga bacteriana de *P. gingivalis* y el estado cognitivo mediante el test MoCA, comparando los valores entre los sujetos de estudio y los controles. Se estableció también el estadio de la enfermedad periodontal, siendo etapa I, II, III o IV para cada grupo de estudio.

Al evaluar el estado periodontal de los pacientes se observó que aquellos afectados con enfermedad periodontal y EA tenían valores aumentados de PS, IP, IS y pérdida de NIC en comparación con los sujetos del grupo control. Por lo tanto, se puede decir que en aquellos pacientes con periodontitis y EA, todos los parámetros medidos se vieron afectados, lo que indica que la presencia de EA se podría asociar con un peor estado periodontal, tal como ha sido descrito anteriormente (47, 48). Además, se detectaron los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, pro-resortivas e inmuno-reguladoras en el FCG, de las cuales se observó que las pro-inflamatorias se encuentran aumentadas en pacientes con periodontitis, con o sin demencia. Al evaluar la correlación entre todas las citoquinas y los resultados del test MoCA, resultó que las citoquinas pro-inflamatorias y pro-resortivas tuvieron una correlación negativa con el test, lo que sugiere que el aumento de estas citoquinas se asocia de forma negativa al estado cognitivo de los pacientes afectados con EA. En efecto, IL-4, una citoquina reguladora tuvo una correlación positiva, siendo esta una citoquina protectora para el progreso de la EA. Posteriormente, la carga bacteriana de *P. gingivalis* estaba aumentada en pacientes afectados con EA y periodontitis. Junto con esto, existió una correlación negativa entre la carga bacteriana de *P. gingivalis* y el test MoCA, lo que sugiere que los niveles aumentados de *P. gingivalis* se asocian negativamente con el estado cognitivo de los pacientes afectados con periodontitis. Finalmente, para la proteína ApoE- $\epsilon$ 4 en FCG en pacientes con periodontitis se detectaron niveles aumentados de secreción, de los cuales los pacientes afectados con EA presentaban mayores niveles de ApoE- $\epsilon$ 4, lo cual puede indicar que mayores niveles de esta proteína influyen de forma negativa en el estado cognitivo de los pacientes con periodontitis (49). De estos resultados en FCG se puede sugerir que los niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias, pro-resortivas, altos niveles de carga bacteriana de *P. gingivalis* y de ApoE-

ε4 se asociarían negativamente con el estado cognitivo de los pacientes que presentan periodontitis.

Diversos estudios han detectado que las personas mayores con EA tienen peor control de su higiene oral, con mayores niveles de placa bacteriana, menor salivación, mayor sangrado de las encías y sacos periodontales más profundos (50). Esto se debería al pobre control de higiene de los propios pacientes por la pérdida de memoria, por la alteración motriz o por el olvido de sus cuidadoras (51). En ese mismo sentido, un estudio demostró que los parámetros periodontales aumentan en aquellos pacientes con periodontitis y EA, en comparación con los sujetos sanos y periodontitis (47). Así, los pacientes con EA tienen un mayor riesgo de perder dientes que personas que no sufren de esta enfermedad (52) y la pérdida de dientes se asocia con un mayor riesgo de demencia (53), lo que aumenta la posibilidad de mayor deterioro cognitivo. En efecto, considerando que la periodontitis es una de las principales causas de pérdida de dientes, se han propuesto 3 posibles mecanismos por el cual la pérdida de dientes lleva a un deterioro cognitivo. El primero, es por la disminución de la capacidad masticatoria generando como consecuencia una dieta insatisfactoria y desnutrición lo que compromete la función del sistema nervioso central (SNC). El segundo, es la disminución del contacto interoclusal, comprometiendo la propiocepción y con esto menor estimulación a las fibras del SNC, llevando a una función cognitiva disminuida. El tercero incluye una vía común de inflamación con la periodontitis resultando en la pérdida de dientes, que lleva a un deterioro cognitivo (54). Además, recientemente se ha descrito que al existir menor cantidad de dientes se producen menos ciclos masticatorios. Esta disminución en la contracción de la musculatura elevadora de la mandíbula afectaría directamente el retorno venoso cerebral, ya que por cada ciclo masticatorio se genera una presión que aumenta el drenaje de la vena yugular interna. Así, al disminuir los ciclos masticatorios, disminuiría el drenaje venoso y linfático y, por consecuencia, mayor acumulación de desechos en el cerebro.

Es importante de mencionar que las personas afectadas de EA poseen una barrera hemato-encefálica permeable, lo que crea un ciclo vicioso inflamatorio, donde a mayor severidad de EA, mayor permeabilidad, mayor ingreso de mediadores pro-inflamatorios y por tanto, mayor neuroinflamación. Así, la disminución del retorno venoso en pacientes con EA y afectados con algún grado de desdentamiento, podría exacerbar la neuroinflamación y acelerar la progresión de la enfermedad. Por otra parte, la presencia de periodontitis implica un aumento

de bacteremias transitorias y, en un paciente susceptible producto de una barrera permeable o un menor drenaje venoso, podría significar un mayor riesgo para que las bacterias que sobrevivan a la muerte por eritrocitos y macrófagos pudieran migrar y establecerse en el cerebro. Según Costa, et al (2021), la presencia de *P. gingivalis* en el cerebro puede generar la activación de la cascada del complemento, aumentando la producción de A $\beta$  y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, causando neuroinflamación, neurodegeneración e inflamación del cerebro dependiente de la edad (28). También la literatura confirma que la carga bacteriana de *P. gingivalis* y el proceso inflamatorio que produce la enfermedad periodontal, pueden intensificar la inflamación a nivel del SNC, debido al aumento de la inflamación producida por bacterias Gram negativo, como lo es *P. gingivalis*, donde se produce un aumento en la producción de A $\beta$  favoreciendo así la progresión de la EA.

En este estudio se midieron distintas citoquinas de carácter pro-inflamatorias, inmunomoduladoras y pro-resortivas, las cuales se ven alteradas frente a la periodontitis y EA. La citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  está significativamente aumentada en pacientes con EA y ampliamente correlacionada con la presencia y el metabolismo del A $\beta$  y de la proteína Tau (55). En cambio la IL-10, inmuno-reguladora, está aumentada en pacientes con EA, y podría cumplir un rol protector (56). La literatura indica que también existen niveles aumentados de biomarcadores pro-inflamatorios periféricos, tales como IL-2, IL-6, IL-12 en pacientes con EA (57) y, de ellos, los niveles de IL-6 son los que mayor relación tienen con el deterioro cognitivo en pacientes con EA (58). En efecto, en modelos experimentales de EA se ha observado que la infección por *P. gingivalis* provoca un aumento en la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-6, aumentando la producción del A $\beta$ , activando el sistema del complemento, causando inflamación, degeneración del tejido cerebral y deterioro cognitivo, agravando la EA (16, 28, 59).

Con respecto a la periodontitis, las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 están fuertemente asociadas a la destrucción del tejido periodontal, como respuesta defensiva frente a una infección en los tejidos de soporte del diente (60). Hay evidencia que indica que IL-21 se asocia con enfermedades crónicas no transmisibles, tales como la artritis reumatoide, arteriopatía coronaria y enfermedad inflamatoria intestinal y la periodontitis. En conjunto, IL-1, IL-6 e IL-21 contribuyen a la destrucción del tejido periodontal (61). Es importante mencionar que la evidencia demuestra que las ECNT comparten mediadores pro-inflamatorios y, recientemente, se ha propuesto una nueva clasificación de todas las enfermedades conocidas basándose en

el perfil de estos mediadores que caracterizan a cada una. Así, las enfermedades de origen disbiótico o infeccioso estarían clasificadas como enfermedades tipo VII, caracterizadas por la presencia de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (62).

Otro concepto que ha tomado gran relevancia en los últimos años, es la consecuencia que genera en el hospedero la presencia de las ECNT. Distintos estudios han tratado de determinar si la periodontitis se asocia o no con otras enfermedades, pero pocos han identificado un factor causal claro. Recientemente, se ha propuesto que todas las ECNT inducen un aumento subpatológico y suprafisiológico de los mediadores pro-inflamatorios que cada uno de ellas produce. Esto significa, que en el caso de la periodontitis u otra ECNT, los mediadores que difunden a la circulación periférica no son lo suficientemente elevados como lo que se detecta en el periodonto, pero lo necesariamente altos para no considerarse valores basales (63). Así, se define el concepto de “CLIP” como fenotipo inflamatorio crónico de bajo grado, no resuelto, indicado por un aumento de 2 a 4 veces los niveles séricos de mediadores inflamatorios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PCR entre varios mediadores (64). Este CLIP no es posible de tratarlo con AINEs y, recientemente, se ha demostrado que aún realizando un tratamiento periodontal exitoso, no es factible recuperar los niveles basales de estos mediadores, demostrando que el CLIP es una consecuencia desfavorable de estas enfermedades y que causan daño celular o tisular a tejidos u órganos distintos al cual dio origen a esta condición (65). El CLIP ocurre típicamente durante el envejecimiento, pero no es exclusivo de este fenómeno fisiológico. Los factores causales probablemente incluyen infecciones virales persistentes, senescencia celular, falta de eliminación de productos de desecho, disbiosis, permeabilidad intestinal, entre otros (66). El CLIP puede contribuir a padecer de fragilidad, sarcopenia, depresión, resistencia a la insulina, Diabetes Mellitus tipo 2, anemia, cáncer, enfermedad cardiovascular, neurodegeneración y demencia (64). Actualmente se reconoce que existe una asociación significativa entre la periodontitis con otras condiciones sistémicas tales como el parto prematuro y bajo peso al nacer, la artritis reumatoide y EA y, una explicación, sería mediante esta condición de CLIP (6).

Por otra parte, en el presente trabajo determinamos la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína (ApoE- $\epsilon 4$ ) en su forma protéica. ApoE- $\epsilon 4$  es el principal factor de riesgo de la aparición de forma espontánea de la EA, donde no sólo su presencia se asocia con un aumento en el riesgo de desarrollar esta enfermedad, sino que también, en la expresión y el fenotipo de

esta misma (49). Los pacientes con mayor cantidad de ApoE- $\epsilon$ 4 presentan mayor acumulación de la proteína Tau y atrofia en el lóbulo temporal medial, lo que resulta en mayor riesgo de demencia (67). Debido a que no hay registro en la literatura de la detección de ApoE- $\epsilon$ 4 en FGC, se decidió determinar la curva ROC (Fig. 6C). El área bajo la curva mostró un valor mayor a 0,8, sugiriendo que la detección de ApoE- $\epsilon$ 4 en FGC de pacientes con o sin estado cognitivo alterado podría tener una valoración positiva. Este es el primer estudio a la fecha que determina este marcador de enfermedad importante de EA en tejido periodontal. Este estudio determinó valores elevados de ApoE- $\epsilon$ 4 en pacientes con periodontitis, y aún más en pacientes con EA y periodontitis. Es por esto, que este estudio sugiere que una detección temprana de ApoE- $\epsilon$ 4 en FGC mediante una evaluación periodontal de rutina podría ser de vital importancia debido al rol que presentan estas proteínas, ya que ApoE- $\epsilon$ 4 es un factor de riesgo para la EA (49).

La principal limitante del estudio fue el tamaño de la muestra, por lo que se puede considerar este estudio como un piloto para futuras investigaciones que busquen determinar los marcadores pro-inflamatorios, la presencia de *P. gingivalis* y ApoE- $\epsilon$ 4 en pacientes afectados con EA. En pacientes con EA y periodontitis se observó que los parámetros periodontales, tales como, pérdida del NIC, PS, IS, IP, carga bacteriana de *P. gingivalis* y la presencia de ApoE- $\epsilon$  estaban aumentados y el estado cognitivo se veía más afectado en etapas avanzadas de la periodontitis. Es importante establecer que la detección temprana de la ApoE- $\epsilon$ 4 en FCG podría ayudar a los pacientes a evaluar su riesgo para tener EA, siendo este un examen simple de realizar, ya que consiste en la toma de una muestra de FCG en el diente con mayor PS y una prueba de ELISA. Así, el examen periodontal básico debiera de incluir a modo de rutina, la toma de muestras biológicas para analizar la susceptibilidad individual a desarrollar otros tipos de enfermedades en la vida de cada persona.

## 8. CONCLUSIÓN

1. El estado periodontal de pacientes mayores de 60 años con EA es de mayor severidad en comparación a pacientes que no presentan diagnóstico de EA. El 80 % de los pacientes afectados con periodontitis y EA presentaban etapas avanzadas de la enfermedad periodontal. Además, los pacientes sin EA afectados de periodontitis poseen una leve disminución en el puntaje del test MoCA en comparación a sujetos sanos.
2. Los pacientes con EA y periodontitis presentan mayores mediadores pro-inflamatorios, una mayor carga de *P. gingivalis* y altos niveles de secreción de ApoE- $\epsilon$ 4 en el FGC.
3. Las citoquinas pro-inflamatorias, la carga bacteriana y los niveles de ApoE- $\epsilon$ 4, tienen una correlación negativa con los puntajes del test MoCA, sugiriendo que estados avanzados de la periodontitis afectan el estado cognitivo de los pacientes con EA.
4. Los pacientes con periodontitis y EA presentan un estadio de la enfermedad periodontal más avanzado y severo, mayores valores de mediadores pro-inflamatorios y mayor carga bacteriana.
5. Se sugiere que en toda evaluación odontológica exista una evaluación cognitiva, para determinar la importancia de la salud oral en la prevención de demencias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hajishengallis G (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1):30-44.
2. Garlet GP (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.
3. Vernal R, Le.n R, Herrera D, García-Sanz J, Silva A, 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.
4. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA (2012). *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *Journal for Dental Research*, 91(9):816-820.
5. Alicia Morales, Joel Bravo, Mauricio Baeza, Fabiola Werlinger y Jorge Gamonal (2016). Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2016; 9 (2): 203-207.
6. Sudhakara, P., Gupta, A., Bhardwaj, A., & Wilson, A. (2018). Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dentistry journal*, 6(2), 10. <https://doi.org/10.3390/dj6020010>
7. Ardila CM, Guzmán IC. Comparison of serum amyloid A protein and C reactive protein level as inflammatory markers in periodontitis. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 2015;45:14–22.
8. López N, Silva ID, Ipinza J, Gutierrez J (2005). Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight women with pregnancy-associated gingivitis. *Journal of Periodontology*, 76(11 Suppl):2144-2153.
9. Thanakun S, Izumi Y (2016). Effect of Periodontitis on Adiponectin, CReactive Protein, and Immunoglobulin G Against *Porphyromonas gingivalis* in Thai People with Overweight or Obese Status. *Journal of Periodontology*, 87(5):566-576.

10. Bagavad Gita J, George AV, Pavithra N, Chandrasekaran SC, 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.
11. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, 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.
12. 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.
13. 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.
14. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, 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.
15. 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>
16. Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., ... 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. doi:10.1126/sciadv.aau3333
17. Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y., Hagiwara, M., Ferdous, T., Abdullah, M., Mitani, A., Michikawa, M., & Matsushita, K. (2017). Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic

- mice. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 3, 15. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0015-x>
18. Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., Kesavalu, L., & Crean, S. (2015). Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE<sup>-/-</sup> mice brains. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 43(1), 67–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-140315>
  19. Singhrao SK, Chukkapalli S, Poole S, Velsko I, Crean S, Kesavalu L. 2017. Chronic *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the occurrence of age-related granules in ApoE<sup>-/-</sup> mice brains. *Journal of Microbiology*. 9(1):1270602.
  20. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S (2013). Determining the Presence of Periodontopathic Virulence Factors in Short-Term Postmortem Alzheimer's Disease Brain Tissue. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(4):665-677.
  21. Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of clinical neurology*, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
  22. OMS. (2020). Demencia. 21 septiembre 2020, de OMS Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
  23. Riviere GR, Riviere KH, Smith KS (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.
  24. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S (2013). Determining the Presence of Periodontopathic Virulence Factors in Short-Term Postmortem Alzheimer's Disease Brain Tissue. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(4):665-677.
  25. Kamer AR, Craig RG, Pirraglia E, Dasanayake AP, Norman RG, Boylan RJ, Nehorayoff A, Glodzik L, Brys M, de Leon MJ (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.
  26. Block ML, Hong JS (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2):77-98.

27. Abbayya K, Puthanakar NY, Naduwinmani S, Chidambar YS (2015). Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North American journal of medical sciences*, 7(6):241–246.
28. Costa, M., de Araújo, I., da Rocha Alves, L., da Silva, R. L., Dos Santos Calderon, P., Borges, B., de Aquino Martins, A., de Vasconcelos Gurgel, B. C., & Lins, R. (2021). Relationship of *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies. *Clinical oral investigations*, 25(3), 797–806. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03764-w>
29. Ingar Olsen & Sim K. Singhrao (2015) Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *Journal of Oral Microbiology*, 7:1, 29143, DOI: 10.3402/jom.v7.29143.).
30. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF (1991). Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol*, 33:224–227.
31. Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (1998). Identificación y localización de *Chlamydia pneumoniae* en el cerebro de Alzheimer. *Medical Microbiology and Immunology*. 187:23–42.
32. Miklossy J, Kis A, Radenovic A, Miller L, Forro L, Martins R, Reiss K, Darbinian N, Darekar P, Mihaly L (2006). Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiology of Aging*, 27(2):228-236.
33. 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>
34. Miklossy J. (2015). Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 7:46.
35. Conti MZ, 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*. 28:391-399.
36. Sparks Stein P, Steffen MJ, Smith C, Jicha G, Ebersole JL, Abner E, Dawson Dr. 2012. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease.

- Alzheimer's & Dementia*. 8(3):196-203.
37. Noble JM, Scarmeas N, Celenti RS, Elkind MS, Wright CB, Schupf N, Papapanou PN. 2014. Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident Alzheimer disease. *PLoS One*. 9(12):e114959.
  38. Laugisch O, Johnen A, Maldonado A, Ehmke B, Bürgin W, Olsen I, Potempa J, Sculean A, Duning T, Eick S. 2018. Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 66(1):105-114.
  39. Leblhuber F, Huemer J, Steiner K, Gostner JM, Fuchs D. 2020. Knock-on effect of periodontitis to the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Wiener klinische Wochenschrift*. 132(17-18):493-498.
  40. Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, Fuller J, Ibbett P, Raybould R, Thomas R et al. 2016. Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 11(3):e0151081.
  41. Imamura T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 74:111-118.
  42. Zhou, J., & Windsor, L. J. (2006). Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *Journal of periodontal research*, 41(1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00835.x>
  43. Rokad F, Moseley R, Hardy RS, Chukkappalli S, Crean S, Kesavalu L, Singhrao SK. 2017. Cerebral oxidative stress and microvasculature defects in TNF- $\alpha$  expressing transgenic and Porphyromonas gingivalis-infected ApoE  $-/-$  mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. 60(2):359-369.
  44. Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
  45. Ovalle, Alfredo, Gamonal, Jorge, Martínez, M Angélica, Silva, Nora, Kakarieka, Elena, Fuentes, Ariel, Chaparro, Alejandra, Gajardo, Marta, León, Rubén, Ahumada, Alexis, & Cisternas, Carlos. (2009). Relación entre enfermedad periodontal, infección bacteriana ascendente y patología placentaria con parto prematuro. *Revista médica de*

- Chile, 137(4), 504-514. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000400008>
46. 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>
47. 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>
48. Hamza, S. A., Asif, S., & Bokhari, S. (2021). Oral health of individuals with dementia and Alzheimer's disease: A review. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 25(2), 96–101. [https://doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_287\\_20](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_287_20)
49. Pedroso, R. V., Fraga, F. J., Pavarini, S., Nascimento, C., Ayán, C., & Cominetti, M. R. (2021). A Systematic Review of Altered P300 Event-Related Potential in Apolipoprotein E4 (APOE4) Carriers. *Clinical EEG and Neuroscience*, 52(3), 193–200. <https://doi.org/10.1177/1550059420959966>
50. Delwel, S., Binnekade, T. T., Perez, R., Hertogh, C., Scherder, E., & Lobbezoo, F. (2018). Oral hygiene and oral health in older people with dementia: a comprehensive review with focus on oral soft tissues. *Clinical Oral Investigations*, 22(1), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2264-2>
51. Gao, S. S., Chu, C. H., & Young, F. (2020). Oral Health and Care for Elderly People with Alzheimer's Disease. *International journal of environmental research and public health*, 17(16), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165713>
52. Dioguardi, M., Gioia, G. D., Caloro, G. A., Capocasale, G., Zhurakivska, K., Troiano, G., Russo, L. L., & Muzio, L. L. (2019). The Association between Tooth Loss and Alzheimer's Disease: a Systematic Review with Meta-Analysis of Case Control Studies. *Dentistry journal*, 7(2), 49. <https://doi.org/10.3390/dj7020049>
53. Fang, W. L., Jiang, M. J., Gu, B. B., Wei, Y. M., Fan, S. N., Liao, W., Zheng, Y. Q., Liao, S. W., Xiong, Y., Li, Y., Xiao, S. H., & Liu, J. (2018). Tooth loss as a risk factor for dementia: systematic review and meta-analysis of 21 observational studies. *BMC*

- Psychiatry*, 18(1), 345. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1927-0>
54. Thomson, W. M., & Barak, Y. (2021). Tooth Loss and Dementia: A Critical Examination. *Journal of Dental Research*, 100(3), 226–231. <https://doi.org/10.1177/0022034520957233>
55. Dioguardi, M., Crincoli, V., Laino, L., Alovisi, M., Sovereto, D., Mastrangelo, F., Russo, L. L., & Muzio, L. L. (2020). The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 495. <https://doi.org/10.3390/jcm9020495>
56. Shen, X. N., Niu, L. D., Wang, Y. J., Cao, X. P., Liu, Q., Tan, L., Zhang, C., & Yu, J. T. (2019). Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(5), 590–598
57. Su, C., Zhao, K., Xia, H., & Xu, Y. (2019). Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society*, 19(4), 300–309
58. Li, D., & Yu, F. (2017). Peripheral Inflammatory Biomarkers and Cognitive Decline in Older Adults With and Without Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Journal of Gerontological Nursing*, 43(12), 53–60. <https://doi.org/10.3928/00989134-20170519-01>
59. Singhrao, S. K., Harding, A., Poole, S., Kesavalu, L., & Crean, S. (2015). Porphyromonas gingivalis Periodontal Infection and Its Putative Links with Alzheimer's Disease. *Mediators of Inflammation*, 2015, 137357. <https://doi.org/10.1155/2015/137357>
60. Akram, Z., Abduljabbar, T., Abu Hassan, M. I., Javed, F., & Vohra, F. (2016). Cytokine Profile in Chronic Periodontitis Patients with and without Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Disease Markers*, 2016, 4801418. <https://doi.org/10.1155/2016/4801418>
61. Mootha, A., Malaiappan, S., Jayakumar, N. D., Varghese, S. S., & Toby Thomas, J. (2016). The Effect of Periodontitis on Expression of Interleukin-21: A Systematic Review. *International Journal of Inflammation*, 2016, 3507503. <https://doi.org/10.1155/2016/3507503>

62. Roe, K. (2020). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(2). <https://doi:10.1111/sji.12970>
63. Machado, V., Botelho, J., Escalda, C., Hussain, S. B., Luthra, S., Mascarenhas, P., Orlandi, M., Mendes, J. J., & D'Aiuto, F. (2021). Serum C-Reactive Protein and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in immunology*, 12, 706432. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706432>
64. Chen, Y., Liu, S., & Leng, S. X. (2019). Chronic Low-grade Inflammatory Phenotype (CLIP) and Senescent Immune Dysregulation. *Clinical Therapeutics*, 41(3), 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.02.001>).
65. Cecoro, Gennaro; Annunziata, Marco; Iuorio, Morena Tina; Natri, Livia; Guida, Luigi (2020). *Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review. Medicina*, 56(6), 272–. doi:10.3390/medicina56060272
66. Krabbe, K. S., Pedersen, M., & Bruunsgaard, H. (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental Gerontology*, 39(5), 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.01.009>
67. Emrani, S., Arain, H. A., DeMarshall, C., & Nuriel, T. (2020). APOE4 is associated with cognitive and pathological heterogeneity in patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00712-4>



**Universidad Autónoma De Yucatán  
Facultad de Odontología**

**Departamento de Especialización en  
Periodoncia**



Carta de consentimiento informado y voluntario.

Título del protocolo: **"ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y PERIODONTITIS"**

Investigador principal: C.D. LUIS DANIEL SANSORES ESPAÑA

El (la) participante (familiar o representado legal) con nombre:

El presente formulario corresponde a un Consentimiento Informado y Voluntario y se dirige a todo paciente candidato a participar en el proyecto de investigación titulado: Asociación entre enfermedad de Alzheimer y Periodontitis.

Dicho proyecto pretende conocer la relación clínica y molecular existente entre estas enfermedades, siendo ambas dos de las entidades más frecuentes en pacientes adultos mayores a nivel mundial, es de vital importancia conocer sus mecanismos de convergencia para así establecer estrategias de tratamiento para su control y así mejorar la calidad de vida de los sujetos que como usted (familiar/ representado legal) puedan padecerlas.

Esta investigación incluirá un mínimo de dos intervenciones en las cuales se recabarán datos clínicos consistentes en una exploración clínica para sondeo periodontal, aplicación de examen para determinar la severidad de la demencia, toma de muestra de líquido crevicular y toma de muestra de sangre, procedimientos que nos ayudarán a determinar la asociación clínica y molecular de ambas enfermedades.

Su participación (familiar / representado legal) en esta investigación será totalmente voluntaria y no recibirá remuneración económica por ello, puede libremente elegir participar o no hacerlo, en cualquiera de las dos circunstancias usted continuará recibiendo todos los servicios de esta clínica sin ninguna repercusión. Por igual usted (familiar/representado legal) puede aceptar y más tarde cambiar de idea y dejar de participar sin ninguna repercusión.

Todos los procedimientos clínicos que se realizarán como la exploración y el sondeo

periodontal son exámenes rutinarios para conocer el estado de salud gingivoperiodontal que usted (familiar/representado legal) presentan. El sondeo periodontal consiste en introducir un instrumento marcado en cada milímetro en 6 superficies de cada diente, registrando cantidad de sangrado y placa dentobacteriana. Con respecto a el procedimiento de la toma de muestra de líquido crevicular este se realiza introduciendo una tira absorbente dentro del surco gingival mediante un procedimiento estandarizado que ha sido avalado por instituciones de salud y que no genera ninguna lesión o trauma gingival. La toma de muestra de saliva será en a traves de una torunda de algodón para su posterior estudio.

Toda información solicitada durante este proyecto, será completamente confidencial y utilizada exclusivamente por los investigadores con fines de aprendizaje científico. Únicamente los datos generales, resultados del examen clínico y de laboratorio serán utilizados para fines de divulgación científica.

Este estudio será financiado por los investigadores, mas no habrá remuneración monetaria para los participantes. Usted (familiar/representado legal) no se encuentra obligado a participar en esta investigación si no desea hacerlo y el negarse a participar no repercutirá en la calidad de atención que recibirá.

En caso de surgir alguna duda durante la aplicación del estudio estará en toda libertad de preguntar y el investigador está obligado a resolver todas sus aquezas antes, durante y después del estudio.

**Expreso consentimiento para que el Cirujano Dentista Luis Daniel Sansores España realice en mi persona, dentro de los límites otorgados a sus aptitudes profesionales, la elaboración de cuestionarios, exploración clínica, así como toma de muestras.**

**He sido informado(a) convenientemente en forma detallada y suficiente, comprendiendo en su totalidad sobre el tipo de procedimiento a efectuarse en mí, habiéndome explicado detalladamente los objetivos de la investigación aceptando en su totalidad por mí parte la propuesta ofrecida.**

**Nombre del Participante o tutor** \_\_\_\_\_

**Firma del Participante o tutor** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_

ANEXO N°2

**MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)**  
(EVALUACIÓN COGNITIVA MONTREAL)

NOMBRE:  
Nivel de estudios:  
Sexo:

Fecha de nacimiento:  
FECHA:

<b>VISUOESPACIAL / EJECUTIVA</b>		Copiar el cubo					Dibujar un reloj (Once y diez) (3 puntos)	Puntos
							[ ] [ ] [ ] Contorno      Números      Agujas	___/5
<b>IDENTIFICACIÓN</b>								
								___/3
<b>MEMORIA</b>		Lea la lista de palabras, el paciente debe repetirlas. Haga dos intentos. Recuérdelas 5 minutos más tarde.					Sin puntos	
		ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO		
	1er intento							
	2º intento							
<b>ATENCIÓN</b>		Lea la serie de números (1 número/seg.) El paciente debe repetirla. [ ] 2 1 8 5 4 El paciente debe repetirla a la inversa. [ ] 7 4 2					___/2	
<b>MEMORIA</b>		Lea la serie de letras. El paciente debe dar un golpecito con la mano cada vez que se diga la letra A. No se asignan puntos si ≥ 2 errores. [ ] FBACMNAAJKLBAFAKDEAAAJAMOFAB					___/1	
<b>ATENCIÓN</b>		Restar de 7 en 7 empezando desde 100. [ ] 93 [ ] 86 [ ] 79 [ ] 72 [ ] 65 4 o 5 sustracciones correctas: 3 puntos, 2 o 3 correctas: 2 puntos, 1 correcta: 1 punto, 0 correctas: 0 puntos.					___/3	
<b>LENGUAJE</b>		Repetir: El gato se esconde bajo el sofá cuando los perros entran en la sala. [ ] Espero que él le entregue el mensaje una vez que ella se lo pida. [ ]					___/2	
<b>LENGUAJE</b>		Fluidez del lenguaje. Decir el mayor número posible de palabras que comiencen por la letra "P" en 1 min. [ ] ____ (N ≥ 11 palabras)					___/1	
<b>ABSTRACCIÓN</b>		Similitud entre p. ej. manzana-naranja = fruta [ ] tren-bicicleta [ ] reloj-regla					___/2	
<b>RECUERDO DIFERIDO</b>		ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	Puntos por recuerdos SIN PISTAS únicamente	
	Sin Pistas	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]		
<b>Optativo</b>		Pista de categoría [ ] Pista elección múltiple [ ]						
<b>ORIENTACIÓN</b>		[ ]	Día del mes (fecha)	[ ]	Mes	[ ]	Año	
		[ ]	Día de la semana	[ ]	Lugar	[ ]	Localidad	
							___/6	
© Z. Nasreddine MD Versión 07 noviembre 2004 <a href="http://www.mocatest.org">www.mocatest.org</a>							Normal ≥ 26 / 30	
<b>TOTAL</b>							___/30	
Añadir 1 punto si tiene ≤ 12 años de estudios								



**NOTIFICACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA**

**Título del proyecto:** Estudio de las mutaciones y de la expresión diferencial de los polimorfismos de los genes RANTES -28 C/G, -403 G/A, CCR5 G59029A y TNF-alpha G/A en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y periodontitis

**Patrocinador:** PAIFO.

**No. de registro del CEI:** FODO-2019-0001

**Investigador Responsable:** Víctor Manuel Martínez Aguilar.

**Recibido:** mayo 6, 2019.

**Fecha de notificación:** mayo 29, 2019.

El proyecto ha sido debidamente revisado por el Comité de Bioética del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", de la Universidad Autónoma de Yucatán, en cuanto a su valor social, científico, validez científica, relación riesgo-beneficio, hoja de información, competencia del personal responsable e infraestructura disponible. El investigador responsable se compromete a seguir los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial 1964, con las modificaciones realizadas en Tokio 1975, Venecia 1983, Hong Kong 1989, Sudáfrica 1996 y Edimburgo 2000, así como a lo establecido en el Artículo 7 del Convenio Internacional de Derechos Civiles y Políticos de La Asamblea General de las Naciones Unidas de 1986 y el Reglamento de la Ley General en Salud en Materia de Investigación para la salud publicado en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1987. Con base en todo lo anterior el presente proyecto queda **APROBADO**.

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Fernando J. Andrade-Narváez", is shown on a light-colored rectangular background.

Dr. Fernando J. Andrade-Narváez.  
Presidente del Comité de Bioética del CIR-UADY

ccp: Mtro. Efraín Poot Capetillo, Coordinador Académico del CIR, UADY.  
ccp: archivo del CEI-CIR-UADY

## CLINICAL RESEARCH

DOI: 10.15517/IJDS.2022.49232

Received: 6-X-2021  
 Accepted: 9-XI-2021  
 Published Online: 24-XI-2021

Gingival Crevicular Fluid as Biomarker's Source for Alzheimer's Disease

Fluido crevicular gingival como biomarcador de enfermedad de Alzheimer

Luis Daniel Sansores-España DDS<sup>1</sup>; Francisca Morales DDS<sup>2</sup>; Fabio Arriola-Pacheco DDS, MSc<sup>3</sup>; Jessica Astorga<sup>4</sup>; Andrea Paula-Lima PhD<sup>5</sup>; Arely Carrillo-Ávila DDS<sup>6</sup>; Samanta Melgar-Rodríguez DDS, MSc, PhD<sup>7</sup>; Víctor Martínez-Aguilar DDS, MSc, PhD<sup>8</sup>; Jaime Díaz-Zúñiga DDS, MSc, PhD<sup>9</sup>

1. Faculty of Dentistry, Autonomous University of Yucatán, Mérida, México. <https://orcid.org/0000-0002-7394-4411>
2. Periodontal Biology Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile. <https://orcid.org/0000-0001-7573-1359>
3. Faculty of Dentistry, Autonomous University of Yucatán, Mérida, México. <https://orcid.org/0000-0001-5858-1301>
4. Periodontal Biology Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile. <https://orcid.org/0000-0001-6605-3701>
5. Biomedical Neuroscience Institute, Faculty of Medicine, Institute for Research in Dental Sciences, Faculty of Dentistry, Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile. <https://orcid.org/0000-0002-0466-7561>
6. Faculty of Dentistry, Autonomous University of Yucatán, Mérida, México. <https://orcid.org/0000-0001-5894-4459>
7. Periodontal Biology Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile. <https://orcid.org/0000-0003-1480-5734>
8. Faculty of Dentistry, Autonomous University of Yucatán, Mérida, México. <https://orcid.org/0000-0003-2188-5293>
9. Periodontal Biology Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile. Department of Medicine, Faculty of Medicine, Atacama University, Copiapó, Chile. <https://orcid.org/0000-0003-2043-0000>

Correspondence to: Dr. Jaime Díaz-Zúñiga - [jdiaz@odontologia.uchile.cl](mailto:jdiaz@odontologia.uchile.cl)  
 Dr. Víctor Martínez-Aguilar - [victor.martinez@correo.uady.mx](mailto:victor.martinez@correo.uady.mx)

**ABSTRACT:** Periodontitis is a low-grade inflammatory disease caused by a subgingival dysbiotic microbiota. Multiple studies have determined the higher prevalence of tooth loss and poor oral hygiene in patients with Alzheimer's disease (AD). However, the periodontal diagnosis, periodontal bacteria or mediators has not been measured