



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA

Efecto de la periodontitis experimental inducida por el serotipo K1 o la cepa no capsulada K⁻ de *Porphyromonas gingivalis* en el aprendizaje y memoria espacial en ratas.

Francisca Valentina Villalobos Orchard

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. Dr. Rolando Vernal Astudillo

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1150736, FONDECYT 1181780, FIOUCH
17/019, RDP-IADR.**

Santiago – Chile

2019

Agradecimientos

Quiero agradecer de corazón a todas las personas que me han acompañado de una u otra forma en este camino.

A mis tutores, el Dr. Jaime Díaz, la Dra. Andrea Paula-Lima y el Dr. Vernal, por la buena voluntad y paciencia que tuvieron. Por la pedagogía con que aterrizaron el mundo de la investigación, de forma exigente, pero motivante.

A mis papás, Ellen y Andrés, por criarme y educarme como lo hicieron. Gracias a mi mamá por dedicar su vida a nosotras. Por su amor y cariño infinito e incondicional, por sus consejos y por sus retos, que me ayudaron a crecer. Por enseñarme a ser responsable y a crearme capaz. Gracias, además, por el apoyo en el día a día, escuchándome, aguantándome, respetando demasiado mi ambiente de estudio y eximiéndome de cualquier otra responsabilidad aparte de la U. Fuiste y serás siempre mi pilar y ejemplo a seguir. Gracias a mi papá, por inculcarme valores como la lealtad, el respeto, y a valorar las cosas realmente importantes. Gracias por enseñarme que no sirve quedarse llorando, sino que hay que enfrentar y resolver las cosas; por impulsarme a pensar más allá, a analizar. Gracias por tu compañía y tu amor, que me permitieron seguir adelante en la U y en la vida. Papás, faltó vida para agradecerles, pero atesoro su amor y sus enseñanzas y sé que me servirán para seguir creciendo en todo ámbito de mi vida. Los llevo siempre conmigo y los amaré eternamente.

A mi hermana, mi gordis, por ser mi maestra, por incentivarme a informarme, formarme una opinión y defenderla. Gracias por tu fortaleza, que me fortaleció a mí también. Gracias por demostrarme que, a pesar del estrés y la carga académica, hay que quererse, cuidarse, hacer cosas que te gusten y disfrutarlas. Gracias por aportarle tanto amor y ternura a mis días. Gracias a la vida por tenerte de hermana. Te admiro y te quiero muchísimo, y estaré para ti siempre.

Al Gianfranco, por estar en todas y ser un gran apoyo en nuestra familia. Eres un ejemplo para mí, como persona y como estudiante. Te quiero mucho, cuñadín.

A mis padrinos, a mi huela y a todos mis tíos, por su cariño acogedor, su preocupación y el amor. Por enseñarme que la vida tiene cosas buenas y malas, y que así hay que aceptarla y disfrutarla. A mis primas y primos, por escucharme,

darme buenas energías y ayudarme a pensar positivo. Los amo, y agradezco haber nacido en esta familia loca y hermosa.

A Nelly, principalmente por acompañarme y preocuparse por mí. Por facilitarme la vida. Ha sido un gran apoyo todos estos años.

A las chiquillas, Vale, Sofi, Dani y Makis, por nuestra amistad valiosa y duradera, por compartir los logros, alegrías y fails, por el amor, la paciencia (ji) y el apoyo incondicional. Las quiero muchísimo. Gracias a sus hermosas familias, junto con quienes formamos la “familia elegida” (casi patentado ya jajaj), porque son un regalo en mi vida. Gracias por estar siempre presentes, celebrando en las buenas y apañando con todo en las malas. Por apoyarme como lo hacen los papás y por hacerme sentir feliz y en familia.

A mi Lumpen (no confundir con el que culpan por todo en el país jajaj), Cata, Clau, Diego, Mery, Nati, Nico, Pala y Pitu, porque son un tesoro para mí. Me siento inmensamente agradecida de haberlos conocido y de nuestra amistad. Gracias a cada uno por todo lo que me han ayudado, tanto en la U como en la vida; por todos los momentos que hemos compartido, por preocuparse y apoyarme en los fracasos, y por alegrarse con mis logros como si fueran propios. Hicieron que este camino fuera no sólo llevadero, sino que motivante y hermoso!

Al Choclón, por el cariño, el apoyo, por hacerme ver el lado positivo, por demostrarme que hay que preocuparse menos y ocuparse más, y por transformar los momentos más simples en momentos grandes.

A mis Amiwos de “atletismo”, por el apoyo, la preocupación, por todos los momentos que hemos compartido y, especialmente, a la Vale y Diani, por su sinceridad, sus consejos sabios y todo el cariño que me dan.

Al Telepollo, por su permanente buena disposición, por enseñarme a enfrentar las cosas con más calma y por compartir la idea de que hay que disfrutar el camino, no sólo al llegar a la meta.

A los chiquillos de salsa, Feña, Salo, Sergio y Mauri, por la gran amistad que hemos formado, por su honestidad, su cariño, su constante preocupación y todo el apañe. Gracias a la salsa que unió nuestros caminos!

A mi compañero de tesis, Mati, por su buena disposición y compañerismo en todo este proceso.

Finalmente, gracias a muchos funcionarios de la U, Glorita, Consu, las tías del aseo, Luchito, David, tío Ricardo, don Víctor, Patito, y muchos otros. Su empatía, buena voluntad y ayuda fue fundamental a lo largo de la carrera (sobre todo para mí que siempre era la última en ordenar y salir de la clínica jajajaj).

Muchas gracias!!

ÍNDICE

I. RESUMEN	
II. MARCO TEÓRICO/ INTRODUCCIÓN	1
II.1. Enfermedad periodontal	1
II.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	1
II.3. Enfermedad de Alzheimer	3
II.3.1. Microglías y astrocitos	4
II.4. Planteamiento del problema	6
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
III.1. Hipótesis	8
III.2. Objetivo general	8
III.3. Objetivos específicos	8
IV. METODOLOGÍA	9
IV.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano	9
IV.2. Animales de experimentación	9
IV.3. <i>OASIS Maze</i>	10
IV.4. Extracción de muestras biológicas: Líquido cerebro-espinal (LCE), suero, cerebro y tejido periodontal	10
IV.5. Cuantificación de secreción de moléculas proinflamatorias mediante ELISA	11
IV.6. Cuantificación de A β en hipocampo y LCE	12
IV.7. Obtención de muestras biológicas para análisis mediante inmunofluorescencia	12
IV.8. Análisis de los datos	12
V. RESULTADOS	14
V.1. Evaluación de aprendizaje y memoria espacial	14
V.2. Cuantificación de secreción de moléculas pro-inflamatorias en hipocampo y LCE	15
V.3. Cuantificación de secreción de A β 1-42 en hipocampo y LCE	17
V.4. Análisis histológico	18
VI. DISCUSIÓN	21
VII. CONCLUSIONES	26
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
IX. ANEXOS	41

ANEXO N°1: Certificado Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.....	41
ANEXO N°2.....	42
1. Curva de crecimiento bacteriano	42
2. Purificación del mRNA total de muestras biológicas y expresión de moléculas mediante qPCR.....	42
3. Detección de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	43
ANEXO N°3: Modelo de infección periodontal experimental y detección de <i>P. gingivalis</i>	45

I. RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria causada por la disbiosis del microbioma subgingival, siendo *Porphyromonas gingivalis* una de las bacterias clave en el establecimiento de esta disbiosis. Entre sus factores de virulencia se encuentran los polisacáridos capsulares, que se clasifican en 6 serotipos (K), designados K1 a K6, además de la cepa no encapsulada K⁻, siendo el serotipo K1 el más patogénico. Recientemente se ha detectado en distintos modelos de periodontitis experimental inducida por *P. gingivalis*, neuroinflamación y posibles alteraciones en el aprendizaje. Además, en sujetos fallecidos con enfermedad de Alzheimer (EA), se detectó la presencia de factores de virulencia y marcadores genéticos de *P. gingivalis* en distintas estructuras cerebrales. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la periodontitis experimental inducida por una cepa *P. gingivalis* serotipo K1 o una cepa carente de cápsula K⁻ en el aprendizaje y memoria espacial en ratas *wild-type*.

Metodología: En ratas Sprague-Dawley macho de 4 a 6 semanas de edad, se indujo periodontitis experimental por inoculación en la mucosa palatina de la cepa W50 (serotipo K1) y la cepa mutante carente de cápsula, GPA (K⁻) de *P. gingivalis*, repitiéndose 7 días después (6 ratas por grupo). Como control se utilizaron animales inyectados con medio de transporte de bacterias (6 ratas, *sham*). Luego de 45 días, se evaluó el aprendizaje y memoria espacial mediante el *OASIS Maze*. Una vez finalizada la tarea de *OASIS Maze*, las ratas se eutanasiaron y extrajeron los tejidos para detectar las distintas moléculas mediante citometría de flujo, qPCR, ELISA o inmunofluorescencia.

Resultados: Luego de 55 días, las ratas inoculadas con el serotipo K1 presentaron mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias, mayores niveles extracelulares de A β 1-42, astrogliosis, mayor razón de proteína Tau fosforilada/Tau total y menor desempeño en el *OASIS Maze*, en comparación con las ratas *sham* o a las inoculadas con la cepa no encapsulada K⁻.

Conclusión: Las ratas infectadas con el serotipo K1 inducen alteraciones de la memoria espacial, neuroinflamación y presencia de marcadores de EA en ratas *wild-type*.

II. MARCO TEÓRICO/ INTRODUCCIÓN

II.1. Enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales son un grupo de condiciones inflamatorias de etiología multifactorial, que afectan al tejido gingival o a las estructuras de protección o soporte dentario (Offenbacher, 1996; Pihlstrom y cols., 2005). En particular, en la periodontitis se produce la destrucción de los tejidos de soporte del diente, conduciendo en última instancia, a su pérdida (Offenbacher, 1996; Kinane, 2001; Albandar, 2002). En términos generales, constituye la patología ósea de mayor prevalencia a nivel nacional (Gamonal y cols., 2010). La causa principal de la periodontitis es la presencia de un microbioma subgingival disbiótico, que desencadena el inicio de la enfermedad inflamatoria (Hajishengallis y cols., 2012; Hajishengallis, 2014a). Entre las bacterias más comúnmente asociadas a la disbiosis se describen *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, siendo *P. gingivalis* una de las más prevalentes (Socransky y cols., 1998; Herrera y cols., 2008; Cortelli y cols., 2010; Abusleme y cols., 2013; Hajishengallis, 2014b; Hajishengallis, 2015).

II.2. *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis es un cocobacilo Gram negativo, pigmentado de negro, anaerobio estricto, no móvil y asacrolítico que se caracteriza por expresar diversos factores de virulencia que determinan su patogenicidad y se reconoce como un *keystone pathogen* en la disbiosis del microbioma subgingival (Holt y cols., 1999; Hajishengallis y cols., 2012; Hajishengallis, 2014b). Entre los factores de virulencia se describen la fimbria, el lipopolisacárido (LPS), las enzimas proteolíticas (gingipaínas) y los polisacáridos capsulares (Holt y cols., 1999; Yoshino y cols., 2007; Bostanci y Belibasakis, 2012).

La cápsula de *P. gingivalis* está constituida por polisacáridos capsulares cargados negativamente, que cumplen un rol en la estabilidad estructural de la célula y el reconocimiento e interacción con el hospedero, además de entregar mecanismos de sobrevivencia, evasión de la respuesta inmune e invasión de células y tejidos (Holt y cols., 1999; Vernal y cols., 2009; Bostanci y Belibasakis, 2012; Díaz-Zúñiga y cols., 2012). La composición química de los polisacáridos

capsulares difiere entre distintas cepas y se compone principalmente de glucosa, glucosamina, galactosamina, y ácido galactosaminurónico, galactosa, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosa, ácidos manurónico, glucorónico y galacturónico (Schifferle y cols., 1989; Farquharson y cols., 2000). En modelos animales, las cepas de *P. gingivalis* capsuladas son más virulentas, poseen mayor resistencia a la fagocitosis por neutrófilos y resistencia a las proteínas séricas, causando infecciones más invasivas y severas que las cepas no capsuladas (Sundqvist y cols., 1991; Laine y Van Winkelhoff, 1998; Holt y cols., 1999). Sobre la base de la antigenicidad de los polisacáridos capsulares, en *P. gingivalis* se describen 6 serotipos capsulares (K), designados K1 a K6, además de cepas no encapsuladas (K⁻) y, recientemente, se ha sugerido un nuevo serotipo K7 (Van Winkelhoff y cols., 1993; Laine y cols., 1996; D'Empaire y cols., 2006; Brunner y cols., 2010).

El serotipo capsular infectante tiene una influencia significativa en las interacciones con el hospedero durante la infección e inducen respuestas inmunes cualitativamente distintas que se podrían asociar a una variable patogenicidad y podrían determinar las características clínicas de la enfermedad (Vernal y cols., 2009; Díaz-Zúñiga y cols., 2012). Así, las cepas bacterianas pertenecientes al serotipo K1 se asocian a una mayor expresión de quimioquinas en macrófagos y a una mayor migración de neutrófilos (D'Empaire y cols., 2006). Los serotipos K1 y K2 poseen mayor capacidad de inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, tales como interleuquina (IL)-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , y de quimioquinas en células dendríticas, mayor diferenciación de linfocitos TCD4⁺ hacia los fenotipos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th)1 y Th17, con mayor secreción del ligando del receptor del factor nuclear- κ B (del inglés *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*, RANKL) y mayor número de osteoclastos activos y, en pacientes con periodontitis, una mayor frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria, evidenciando una exposición previa a estos serotipos bacterianos y sugiriendo su asociación con la enfermedad (Vernal y cols., 2009; Melgar-Rodríguez, 2014; Vernal y cols., 2014a; Vernal y cols., 2014b; Díaz-Zúñiga y cols., 2015). Contrariamente, los serotipos K3, K4, K5 inducen una respuesta moduladora en células dendríticas y mayor diferenciación de linfocitos Th2, y la cepa no capsulada (K⁻), una mayor diferenciación de linfocitos T reguladores (Treg) (Vernal y cols., 2014b). En conjunto, el serotipo K4 y la cepa no capsulada K⁻ inducen una

mayor frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria en sujetos sanos en comparación con pacientes afectados de periodontitis, lo que sugiere su asociación con la salud periodontal (Vernal y cols., 2009; Melgar-Rodríguez, 2014; Vernal y cols., 2014b). En términos generales, el serotipo K1 es el serotipo más inmunogénico y virulento, y se asocia a un incremento en la respuesta proinflamatoria y pro-destructiva de los tejidos periodontales durante la periodontitis (Vernal y cols., 2014a).

Diversos estudios han demostrado que *P. gingivalis* o sus factores de virulencia pueden difundir a otros tejidos y producir un daño directo y, al mismo tiempo, la bacteria, sus factores de virulencia, o los mediadores inflamatorios generados por la respuesta inmune inducida ante ellos, pueden generar una respuesta inflamatoria sistémica crónica (Gurav, 2014; Singh Rao y cols., 2015). De esta forma, la periodontitis se asocia con otras enfermedades o eventos extraorales, tales como la aterosclerosis, infarto agudo al miocardio y accidente vascular encefálico, riesgo de parto prematuro y bajo peso al nacer, pobre control de la diabetes, y, recientemente, con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Preshaw y cols., 2012; Poole y cols., 2013; Tonetti y Van Dyke, 2013; Corbella y cols., 2016; Ryden y cols., 2016; Bozoglan y cols., 2017; Hamilton y cols., 2017; Leira y cols., 2017; Aragón y cols., 2018; Puertas y cols., 2018).

II.3. Enfermedad de Alzheimer

Las demencias son un conjunto de patologías caracterizadas por el deterioro cognitivo o conductual, con una prevalencia que puede alcanzar el 30% en la población mayor de 60 años (Crooks y Geldmacher, 2004). La EA es la forma más común de demencia, representando entre un 60 y 70% de estas (Prince y cols., 2015). La EA se caracteriza por la pérdida progresiva de funciones cognitivas dependientes del hipocampo, principalmente la memoria y el aprendizaje, acompañado de alteraciones del comportamiento (Glass y cols., 2010; Prince y cols., 2015). Histológicamente, se caracteriza por presentar placas seniles compuestas mayoritariamente de agregados insolubles de péptidos de Amiloide- β (A β) y ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína Tau hiperfosforilada (Glass y cols., 2010; Olsen y Singh Rao, 2015; Wu y cols., 2017).

De ambos marcadores histopatológicos, el A β es un péptido derivado de la proteína precursora amiloide (del inglés *Amyloid Precursor Protein*, APP), una proteína transmembrana que se expresa tanto en las células neuronales como no neuronales, por clivajes secuenciales de las enzimas β -secretasa (del inglés *β -site APP-cleaving enzyme*, BACE) y γ -secretasa, generándose péptidos de 38, 40 o 42 aminoácidos (Haass, 2004; Haass y Selkoe, 2007). La proteína Tau es una proteína citoplasmática que estabiliza los microtúbulos en las neuronas y, mediante su unión a la dineína y kinesina, participa en el transporte vesicular desde el soma neuronal a la terminación sináptica (Dixit y cols., 2008; Chaudhary y cols., 2018). Al hiperfosforilarse, se disocia del citoesqueleto y forma complejos con otras proteínas Tau hiperfosforiladas, los que se acumulan en la neurona en forma de filamentos helicoidales insolubles llamados ovillos neurofibrilares, los que conducen a la disfunción sináptica (Hardy y Selkoe, 2002; Haass y Selkoe, 2007).

Aunque los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la etiología y patogénesis de la EA no están completamente dilucidados, se especula que su origen se asocia con la inflamación cerebral crónica (Kamer y cols., 2008a; Kamer y cols., 2008b). La teoría de la neuroinflamación como potencial factor iniciador de la EA establece que la exposición sostenida a mediadores pro-inflamatorios en el cerebro puede desencadenar una inflamación progresiva autoperpetuante, que culmina en daño neuronal y neurodegeneración, como consecuencia de la alteración funcional de las microglías y astrocitos (Kamer y cols., 2008a).

II.3.1. Microglías y astrocitos

Las microglías constituyen la principal célula del sistema inmune residente en el cerebro (Glass y cols., 2010; Heneka y cols., 2014). Corresponden a fagocitos mononucleares que, en condiciones fisiológicas, presentan un fenotipo protector con un rol importante en la mantención de la homeostasis, remodelación de las sinapsis y secreción de factores neurotróficos. Las microglías expresan diversos receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern Recognition Receptor*, PRR) que reconocen las señales moleculares asociadas a patógenos (del inglés *Pathogens-Associated Molecular Pattern*, PAMPs) o asociadas a daño (del inglés *Damage-Associated Molecular Pattern*, DAMPs) (Heneka y cols., 2014). De forma

interesante, estas células se activan y diferencian a un fenotipo M2 ante diversos estímulos inflamatorios, estableciendo una respuesta moduladora caracterizada por la secreción de las citoquinas moduladoras IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 (Hanisch, 2002). La respuesta de la microglia M2 es generalmente autolimitante, y finaliza una vez resuelto el evento que la originó. Tras el primer contacto con PAMPs o DAMPs, las microglias sufren un proceso denominado *priming*, que se manifiesta como una mayor sensibilidad ante estímulos inflamatorios (Perry y Teeling, 2013; Heneka y cols., 2015a; Varatharaj y Galea, 2017). De este modo, si el estímulo inflamatorio persiste, se desencadena su activación y diferenciación a un perfil de microglia inflamatoria o M1, la que incrementa la síntesis de citoquinas inflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y de factores neurotóxicos, como especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*, ROS) o de nitrógeno (del inglés *reactive nitrogen species*, RNS) (Akiyama y cols., 2000; Heneka y cols., 2015b; Lively y Schlichter, 2018). Así, las microglias M1 y sus citoquinas son capaces de inducir la activación de los astrocitos (Glass y cols., 2010).

Los astrocitos son el tipo de célula glial más abundante, responsables de múltiples funciones esenciales para la homeostasis cerebral al mantener el metabolismo neuronal, regular la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal. En condiciones inflamatorias sufren un proceso llamado Astrogliosis, donde modifican su fenotipo actuando de forma sinérgica con las microglias M1, como astrocitos reactivos (Birch, 2014; Cai y cols., 2017). Este proceso se caracteriza por una mayor proliferación, cambios morfológicos, mayor secreción de moléculas inflamatorias, producción de metaloproteinasas de matriz (del inglés *Matrix Metalloproteinases*, MMP) 2 y 9 y ROS/RNS, y mayor producción de A β (Glass y cols., 2010; Birch, 2014; Heneka y cols., 2015a; 2015b; Cai y cols., 2017; Muñoz y cols., 2018). Como consecuencia de la respuesta M1 y la presencia de astrocitos reactivos, se estimula el procesamiento anormal de la APP en las neuronas, generando péptidos A β 40, principalmente, que se acumulan en el cerebro formando distintas estructuras, las cuales a su vez, inducen una mayor respuesta inflamatoria microglial y astrocitaria, estableciendo así, la cronicidad de la inflamación cerebral (Akiyama y cols., 2000;

Haass y Selkoe, 2007; Paula-Lima y cols., 2011; SanMartín y cols., 2012; SanMartín y cols., 2017; Muñoz y cols., 2018).

II.4. Planteamiento del problema

Las bacterias periodonto-patógenas, sus factores de virulencia o los mediadores inflamatorios podrían causar neuroinflamación a través de distintos mecanismos (Forner y cols., 2006; Miklossy, 2011; Poole y cols., 2013). Diversos estudios han demostrado que bacterias orales podrían colonizar el cerebro mediante diseminación por la circulación periférica o mediante la migración retrógrada vía nervio trigémino u olfatorio (Lacroix y cols., 1998; Boggian y cols., 2000; Valyi-Nagy y cols., 2000; Riviere y cols., 2002; Olsen y Singhrao, 2015). En efecto, se han detectado factores de virulencia y marcadores genéticos de *P. gingivalis* y *Treponema denticola* en el ganglio trigeminal, hipocampo, corteza cerebral, ventrículo lateral o líquido cerebro-espinal (LCE) de pacientes afectados o no de EA (Riviere y cols., 2002; Poole y cols., 2013; Dominy y cols., 2019). Así, ha surgido una nueva hipótesis etiológica de la EA en individuos con enfermedades crónicas no transmisibles, que considera la contribución de microorganismos que participan en enfermedades causadas por cambios disbióticos, como la periodontitis.

P. gingivalis, al ser una de las bacterias orales más prevalentes y patogénicas, ha sido estudiada en modelos experimentales con el objetivo de evaluar su potencial rol en la neuroinflamación. Así, recientemente, se demostró que la aplicación oral de homogenizados de *P. gingivalis* serotipo K1 se asocia con neuroinflamación, neurodegeneración, astrogliosis y formación de placas de A β y ovillos neurofibrilares (Ilievski y cols., 2018). Además, se ha demostrado que la cepa *P. gingivalis* ATCC[®]33277TM, no capsulada K⁻, genera un incremento en los niveles de producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , mayor secreción de A β -40 y A β -42 en suero, astrogliosis y alteraciones en tareas de comportamiento (Ishida y cols., 2017; Wu y cols., 2017; Ding y cols., 2018; Zhang y cols., 2018; Dominy y cols., 2019). Contrariamente, en modelos *in vitro* y experimentales de periodontitis, las cepas no capsuladas son capaces de inducir una respuesta T reguladora y asociarse a salud periodontal (Laine y Van Winkelhoff, 1998; Vernal y cols., 2009; Monasterio y cols., 2018). Sin embargo, estos estudios utilizan distintas formas para inducir la

respuesta inflamatoria ante *P. gingivalis*, como *oral gavage* (administración oral) o inyección intraperitoneal, y no evalúan el signo de resorción ósea, necesario para validar el modelo de periodontitis experimental. Además, gran parte de los estudios no realizan la detección de marcadores de la bacteria en cerebro, por lo que no se puede determinar si los resultados se deben a la migración de la bacteria o a efectos desencadenados por la vía de administración oral o intraperitoneal, como una disbiosis intestinal y/o inflamación sistémica, respectivamente. En términos generales, si bien existe evidencia que asocia a *P. gingivalis* con neuroinflamación o deterioro cognitivo, hasta ahora no existe un estudio que evalúe el efecto de la periodontitis experimental en ratas *wild-type*. Así, resulta relevante determinar si, en un modelo de periodontitis experimental validado mediante la evaluación de resorción ósea y mediadores inflamatorios, una cepa *P. gingivalis* del serotipo capsular más virulento K1 es capaz de generar una respuesta inflamatoria cerebral y alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial, y compararlo con el efecto de una cepa no capsulada.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1. Hipótesis

En un modelo de periodontitis experimental, una cepa *Porphyromonas gingivalis* serotipo K1 induce mayores alteraciones cerebrales, cognitivas o conductuales asociadas a la enfermedad de Alzheimer, en comparación a una cepa no capsulada K⁻ o ratas *sham*.

III.2. Objetivo general

Determinar el efecto de *Porphyromonas gingivalis* serotipos K1 o K⁻ sobre los niveles de mediadores pro-inflamatorios, la presencia del marcador histopatológico Amiloide- β 1-42 y la memoria espacial dependiente de hipocampo en ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis experimental.

III.3. Objetivos específicos

1. Evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en un modelo de periodontitis en ratas Sprague-Dawley inducido por una cepa *P. gingivalis* serotipo K1 (W50) y una cepa no capsulada K⁻ (GPA).
2. Cuantificar los niveles secretados de IL-1 β , IL-6, TNF- α en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley en un modelo de periodontitis inducido por una cepa *P. gingivalis* serotipo K1 (W50) y una cepa no capsulada K⁻ (GPA).
3. Cuantificar los marcadores histopatológicos asociados a la EA en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley en un modelo de periodontitis inducido por una cepa *P. gingivalis* serotipo K1 (W50) y una cepa no capsulada K⁻ (GPA).

IV. METODOLOGÍA.

IV.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

La cepa capsulada *Porphyromonas gingivalis* W50 (serotipo K1) y una cepa W50 en que se deleccionaron los genes que codifican para las enzimas que permiten la síntesis de la cápsula para generar la mutante GPA (Δ PG0116- PG0120), de fenotipo no capsulado (K^-), descritas en estudios previos, se cultivaron en BHI suplementado con 5mg/L de hemina y 1mg/L de menadiona, a 37 °C, bajo condiciones capnofílicas en una cámara de anaerobiosis, y se utilizaron en el presente estudio para inducir las infecciones periodontales experimentales (Aduse-Opoku y cols., 2006; Monasterio y cols., 2018). La curva de crecimiento bacteriano se realizó tal como se describió previamente (Vernal y cols., 2008) (Anexo N° 2).

IV.2. Animales de experimentación

Los grupos experimentales y control (*sham*) se conformaron por 6 ratas Sprague-Dawley macho de 4 a 6 semanas de edad cada uno (18 animales en total), obtenidos a partir del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales fueron alojados en la Unidad de Mantenición de Animales del Pabellón H de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en jaulas separadas, con filtros de aire y mantenidos en condiciones estándar bajo un ciclo invertido 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 y el cual fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado de Animales (CICUA, Protocolo N° 17085-ODO-UCH, Anexo N°1). La periodontitis experimental inducida por mono-infección se realizó bajo anestesia general con isoflurano 2% y tal como se describió previamente (More y cols., 2018a). Brevemente, se realizó una inyección en la mucosa palatina de los animales que contenía *P. gingivalis* serotipo K1 o la cepa no capsulada K^- en un volumen de 100 μL a una concentración de 1×10^{10} UFC/mL, repitiéndose una segunda inyección 7 días después de la primera (Monasterio y cols., 2018). Como control se utilizaron ratas inyectadas con medio de transporte de bacterias (*sham*). La parte experimental fue realizada en el Pabellón G de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El modelo de periodontitis experimental se evaluó mediante la presencia de inflamación en

muestras de mucosa palatina y suero, y la cuantificación de la resorción ósea maxilar (Supl. 3, Anexo 3).

IV.3. OASIS Maze

Para todos los animales inoculados con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y las ratas *sham*, se procedió a evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente de hipocampo, mediante el *OASIS Maze*. Luego de 45 días desde la primera inyección de bacterias en la mucosa palatina las ratas iniciaron el *OASIS Maze* siguiendo las especificaciones de Clark y cols., 2005, con algunas modificaciones menores (Martínez y cols., 2016; J. More y cols., 2018b). Brevemente, todos los animales realizaron el test de ansiedad para evaluar el estrés, 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 y durante los 3 días siguientes se realizó el pre-entrenamiento, consistente en 10 min de actividad dentro de la arena con 21 pocillos con agua y una clave visual. Finalmente, se realizó el entrenamiento, consistente en 6 días en los cuales los animales fueron dispuestos en la arena, registrando 15 ensayos por día de 1 min de duración o hasta que el animal encontrara la recompensa. Para cada animal, la recompensa se ubicaba en un solo pocillo sin modificar su ubicación durante los 15 ensayos, cambiando su ubicación durante los 6 días, siempre colocándolo en una posición de partida distinta dentro del *OASIS Maze*.

Cada ensayo fue registrado con una cámara en posición cenital (enfocada desde superior) y, posteriormente, se reconstruyó el recorrido del animal mediante la técnica de *videotracking* y analizó, utilizando el software MatLab (MathWorks, MITRE, MA, USA), para obtener la latencia o tiempo de duración de cada ensayo (s), la tasa de éxito (n° de aciertos/ n° ensayos) y la razón de distancia observada/esperada. Se registró la distancia total recorrida y la velocidad en actividad, para constatar que los animales no presentaran diferencias en sus capacidades motoras.

IV.4. Extracción de muestras biológicas: Líquido cerebro-espinal (LCE), suero, cerebro y tejido periodontal

Una hora después de finalizado el *OASIS Maze*, las ratas se anestesiaron con Isoflurano al 2% y posicionaron en el esterotáxico para extraer aproximadamente

200-250 μL de líquido cerebro-espinal (LCE), según el protocolo descrito anteriormente (Liu y Duff, 2008; Nirogi y cols., 2009; Mahat y cols., 2012). Luego y bajo los efectos anestésicos se extrajeron de 2,5 a 3,5 mL de sangre periférica mediante punción cardíaca y se continuó con la eutanasia mediante dislocación cervical. La sangre se traspasó a un tubo Falcon de 50 mL e incubó durante 30 min a 60°C , seguido de 5 min a 4°C y centrifugó a 3.000 g por 5 min para obtener el suero. El LCE y el suero obtenido se almacenaron a -80°C . Inmediatamente después de ser eutanasiadas, el cerebro *ad integrum* se extrajo y mantuvo en una solución de disección, compuesta por KCl_3 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, NaHCO_3 mM, suplementado con Sacarosa 7,28%, dextrosa 0,18%, 2 mL de MgCl_2 1M, 100 μL de CaCl_2 1M y 1 mL de Piruvato 0,3 mM. De cada cerebro se aisló el hipocampo y almacenó a -80°C .

Finalmente, se extrajeron los huesos maxilares y la mucosa palatina. Los maxilares se mantuvieron 2 horas en etanol 70%, 2 horas en etanol 80% y luego, fueron traspasados y almacenados en etanol 100%. La mucosa palatina se mantuvo en *RNA safer*, almacenada a -80°C hasta su procesamiento.

IV.5. Cuantificación de secreción de moléculas proinflamatorias mediante ELISA

Para la cuantificación de las moléculas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , cada hipocampo se homogenizó según el siguiente protocolo. Cada hipocampo se descongeló y disgregó en una solución que contiene Tris-HCl 0,5M, NaCl 2M, CaCl_2 250 mM, Tx100 25% e inhibidor de proteasas. Luego, cada hipocampo se lavó con 1 mL de NaCl 0,9% 3 veces, para posteriormente agregar 10 μL de buffer por cada mg de peso de la muestra, y se desintegró con un homogenizador eléctrico para luego centrifugar a 10.000 xg durante 5 min a 4°C . Posteriormente, se recuperó el sobrenadante en agua milliQ, se midió la concentración en un espectrofotómetro (Bio-Tek) y se almacenaron en alícuotas de 200 μL a -80°C .

A partir de 100 μL de suero, hipocampo y LCE, se cuantificó la secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). La

cuantificación de la secreción de moléculas en suero se realizó como parte de la evaluación del modelo de periodontitis experimental (Anexo N°3).

IV.6. Cuantificación de A β en hipocampo y LCE

A partir de 100 μ L de hipocampo y LCE, se cuantificó la secreción del marcador de enfermedad de Alzheimer A β 1-42, mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

IV.7. Obtención de muestras biológicas para análisis mediante 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 h en PFA 4% y posteriormente, en solución de sacarosa 30% con Azida. Posteriormente se obtuvieron cortes de 10 μ m de grosor en criostato y almacenaron en PBS 1X a 4°C hasta su uso.

Para las inmunofluorescencias se utilizaron anticuerpos primarios anti-TubIII (Abcam, Ab18207), anti-GFAP (Abcam, ab10062), anti-phosphoTau (Phospho S404, Abcam, ab64193) y anti-Tau (Abcam, ab64193), 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 softwares NIS Elements Viewer (Nikon Instruments Inc., Mitsubishi, JPY) e ImageJ 5.0 (NIH, MD, USA).

IV.8. Análisis de los datos

Los datos de los niveles de secreción de citoquinas se expresaron como los valores promedio de la concentración (pg/mL) \pm desviación estándar. Los datos del *OASIS Maze* se representaron en unidades de tiempo (s), además de tasa de éxito y razón entre distancia observada/ esperada, como valores promedio \pm desviación estándar. La normalidad de distribución de los datos se determinó usando la prueba de

Shapiro-Wilk y los datos se analizaron utilizando la prueba ANOVA-Tukey o Kruskal Wallis-Dunn. 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 $p\text{-value} < 0,05$.

V. RESULTADOS

Inicialmente, se evaluó la presencia de periodontitis experimental en todas las ratas experimentales y controles (Anexo N°3). Luego de 55 días, las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 presentaron mayor resorción ósea y mayores niveles de expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias en mucosa palatina y suero, en comparación con las ratas inoculadas con la cepa no capsulada o las ratas *sham*.

V.1. Evaluación de aprendizaje y memoria espacial

Para todos los animales inoculados con la cepa de *P. gingivalis* serotipo K1 o la cepa no capsulada K⁻ y las ratas *sham*, se procedió a realizar la prueba del OASIS Maze, la que permite evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente de hipocampo.

A partir de la etapa de entrenamiento, consistente en 6 días o sesiones, se evaluó la tasa de éxito, la latencia del ensayo y la razón distancia observada/esperada. No hubo diferencias en la distancia total recorrida y la velocidad en actividad entre los animales, por lo que se confirmó que estos no presentaban diferencias en sus capacidades motoras (datos no mostrados).

La Figura 1 representa la tasa de éxito, la latencia y la razón de distancias observadas en los distintos grupos el último día del ensayo, día 6. Al evaluar la tasa de éxito se logra detectar que las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 presentan una menor tasa en comparación con las ratas *sham*, y una tendencia a una menor tasa en comparación con las inoculadas con la cepa no capsulada K⁻. Al evaluar la latencia, las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 presentan una mayor latencia, en comparación con las ratas *sham* y las inoculadas con la cepa no capsulada K⁻. Finalmente, para la razón de distancia observada/esperada, se observa que las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 presentan una mayor razón de distancias en comparación con las ratas *sham* y las inoculadas con la cepa no capsulada K⁻.

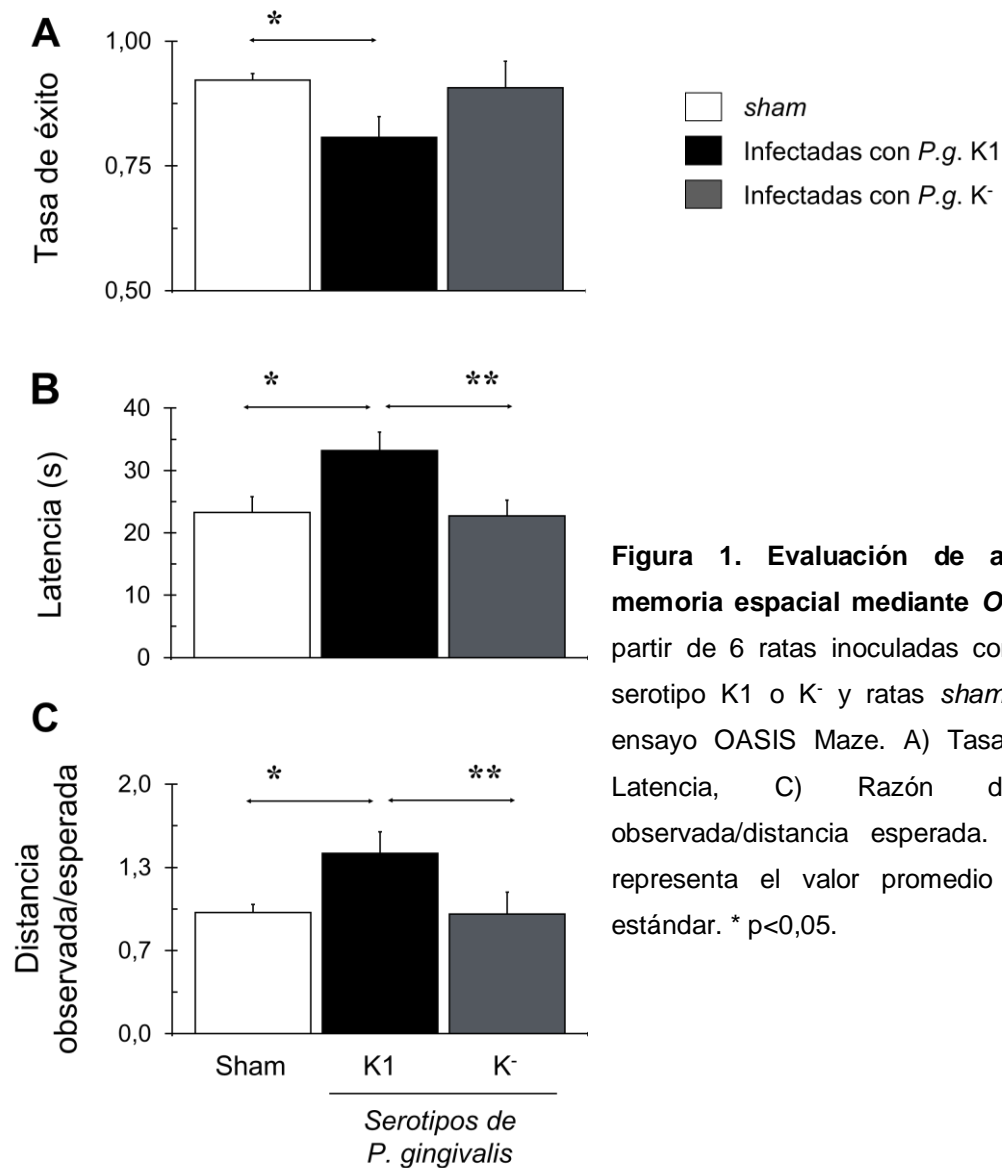


Figura 1. Evaluación de aprendizaje y memoria espacial mediante OASIS Maze. A partir de 6 ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas sham se realizó el ensayo OASIS Maze. A) Tasa de éxito, B) Latencia, C) Razón de distancia observada/distancia esperada. Cada gráfica representa el valor promedio \pm desviación estándar. * $p < 0,05$.

V.2. Cuantificación de secreción de moléculas pro-inflamatorias en hipocampo y LCE

Para determinar si la inoculación de *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ en la mucosa palatina induce alteraciones pro-inflamatorias a nivel de hipocampo y LCE, se cuantificaron los niveles de secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α . En las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 se detectaron mayores niveles de secreción, tanto en hipocampo como en LCE, de IL-1 β e IL-6, en comparación con las ratas sham o a las inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K⁻. Además, en el

hipocampo y LCE de las ratas inoculadas con el serotipo K1, se detectaron mayores niveles de secreción de TNF- α , con respecto a las inoculadas con la cepa serotipo K⁻ (Fig. 2).

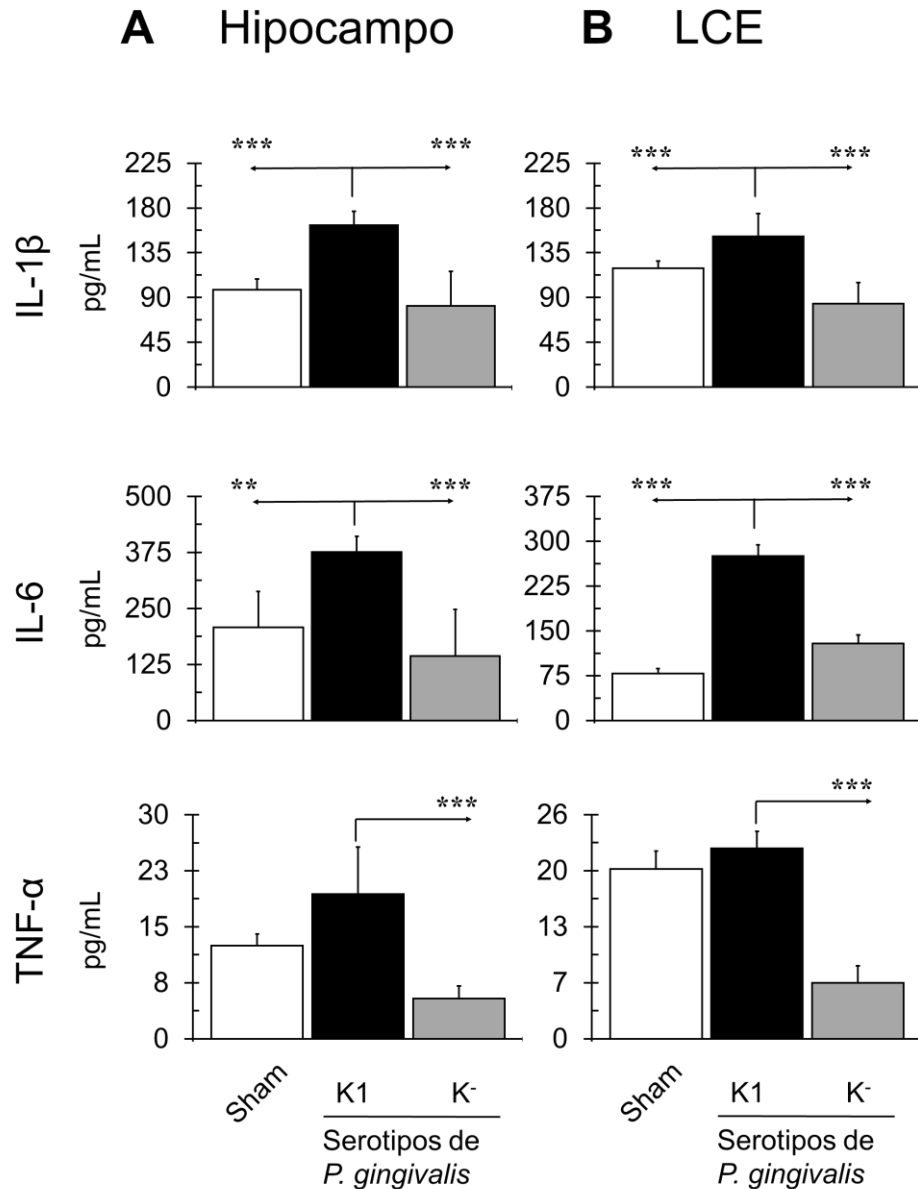


Figura 2. Cuantificación de secreción de moléculas pro-inflamatorias en hipocampo y LCE en ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas sham. A partir de 4 ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas sham se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en hipocampo y LCE. Las gráficas representan el valor promedio \pm desviación estándar. IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, pg: picogramos. *** $p < 0,001$.

V.3. Cuantificación de secreción de A β 1-42 en hipocampo y LCE

Para determinar el efecto de la inoculación de la cepa serotipo K1 o la no capsulada K⁻ en el marcador histopatológico de la EA, A β 1-42, se cuantificó su nivel de producción en hipocampo y LCE. En hipocampo, las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 presentaron mayores niveles de A β 1-42, en comparación con las ratas *sham* o inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K⁻. En el LCE, las ratas *sham* presentaron los mayores niveles de A β 1-42, en comparación con las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o la cepa no capsulada K⁻.

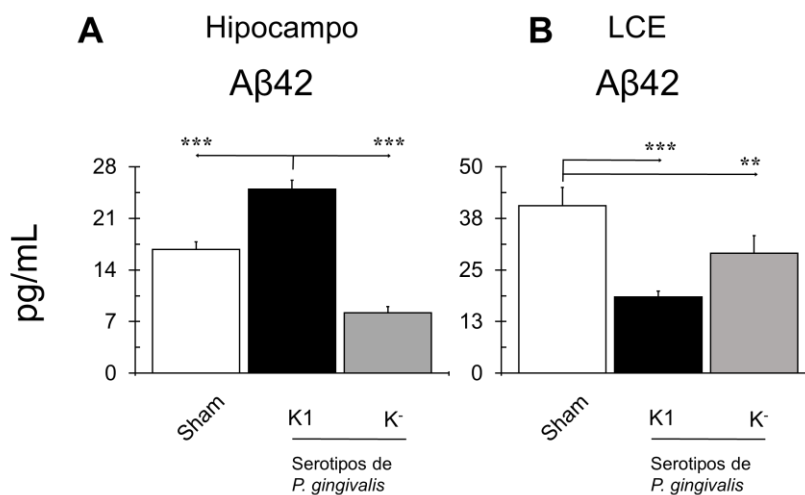


Figura 3. Cuantificación de A β 1-42 en hipocampo y LCE. A partir de homogenizado de hipocampo y muestras de LCE de 4 ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1, 4 inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K⁻ y 4 ratas *sham*, se cuantificaron los niveles secretados del marcador histopatológico

A β 42. Las gráficas representan el valor promedio \pm desviación estándar. A β 42: Amiloide- β 1-42, LCE: Líquido cerebro-espal, pg: picogramos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Al evaluar la razón de A β 1-42 hipocampo/LCE, se observó que existe una mayor razón en las ratas inoculadas con la cepa serotipo K1, en comparación con las otras condiciones (Fig. 4).

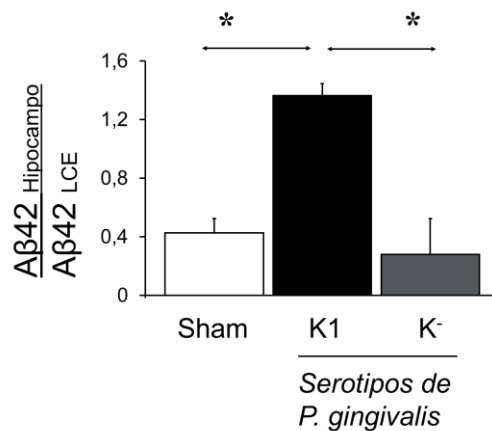


Figura 4. Razón de A β 1-42 Hipocampo/LCE. A partir de los niveles secretados de A β 42 en hipocampo y LCE se calculó la razón. Las gráficas representan el valor promedio \pm desviación estándar. A β 42: Amiloide- β 1-42. * $p < 0,05$.

V.4. Análisis histológico

Para determinar la presencia de astrocitos y neuronas, en los cortes de hipocampo obtenidos de las ratas tras su eutanasia, se realizó detección inmunohistoquímica de Tubulina-III, una proteína exclusivamente presente en neuronas, y de la proteína acídica fibrilar glia (GFAP), para identificar a los astrocitos (Fig. 5).

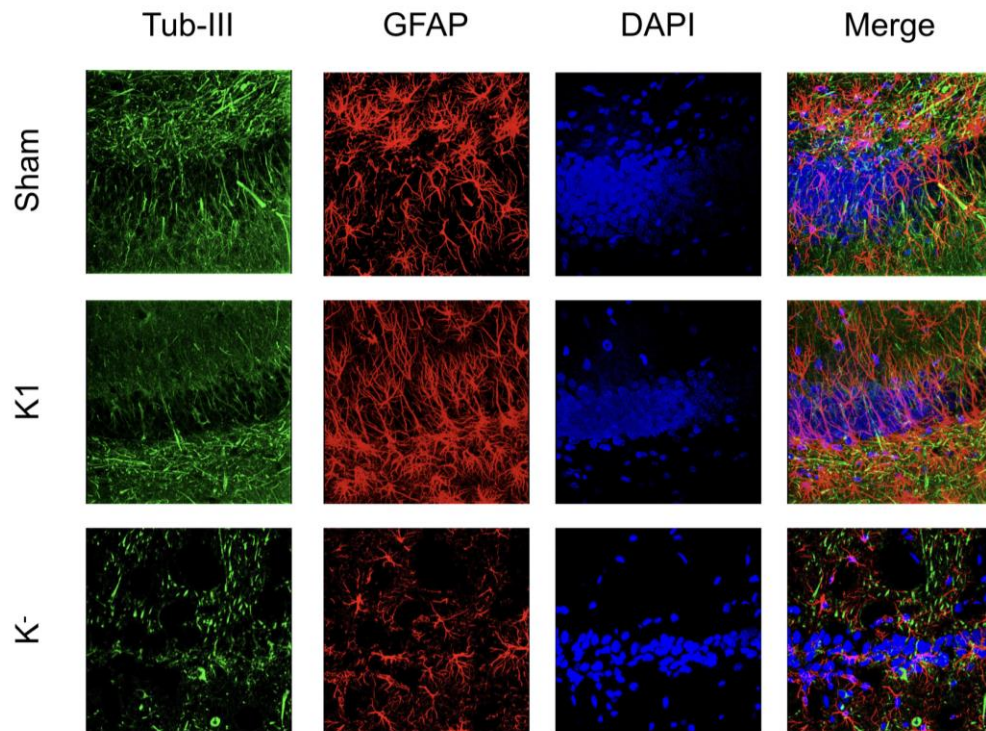


Figura 5. Inmuno-fluorescencia de hipocampo en ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas *sham*. Imágenes obtenidas de la región CA1 de hipocampos de ratas infectadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o no capsulada K⁻ y ratas *sham*. En verde Tub-III (neuronas), en rojo GFAP (astrocitos) y en azul los núcleos de las células (DAPI).

Para determinar el número de astrocitos y neuronas, se hizo el recuento total de núcleos teñidos con DAPI en muestras de hipocampo, para su normalización (Fig. 6). Al cuantificar el número de astrocitos, se detectó que no existen diferencias en el número de astrocitos en los hipocampos de las distintas condiciones.

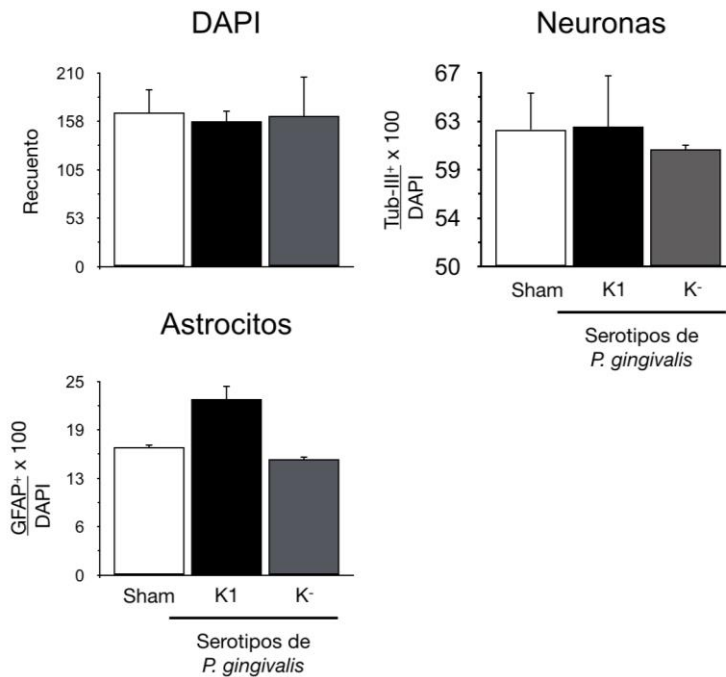


Figura 6. Cuantificación DAPI, microglías y astrocitos. Recuento del número total de DAPI, astrocitos y neuronas en los cortes histológicos de la región CA1 de los hipocampos de ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1, no capsulada K⁻ o ratas sham. * p<0,05.

Luego, mediante inmunofluorescencia se evaluó la presencia de la proteína Tau total y Tau hiperfosforilada en muestras de hipocampo (Fig. 7). Posteriormente, se cuantificó la razón de proteína Tau hiperfosforilada respecto de la proteína Tau total (Fig. 8) donde se detectó un incremento de la razón en la región CA1 del hipocampo de las ratas inoculadas con la cepa serotipo K1, en comparación con las otras condiciones experimentales.

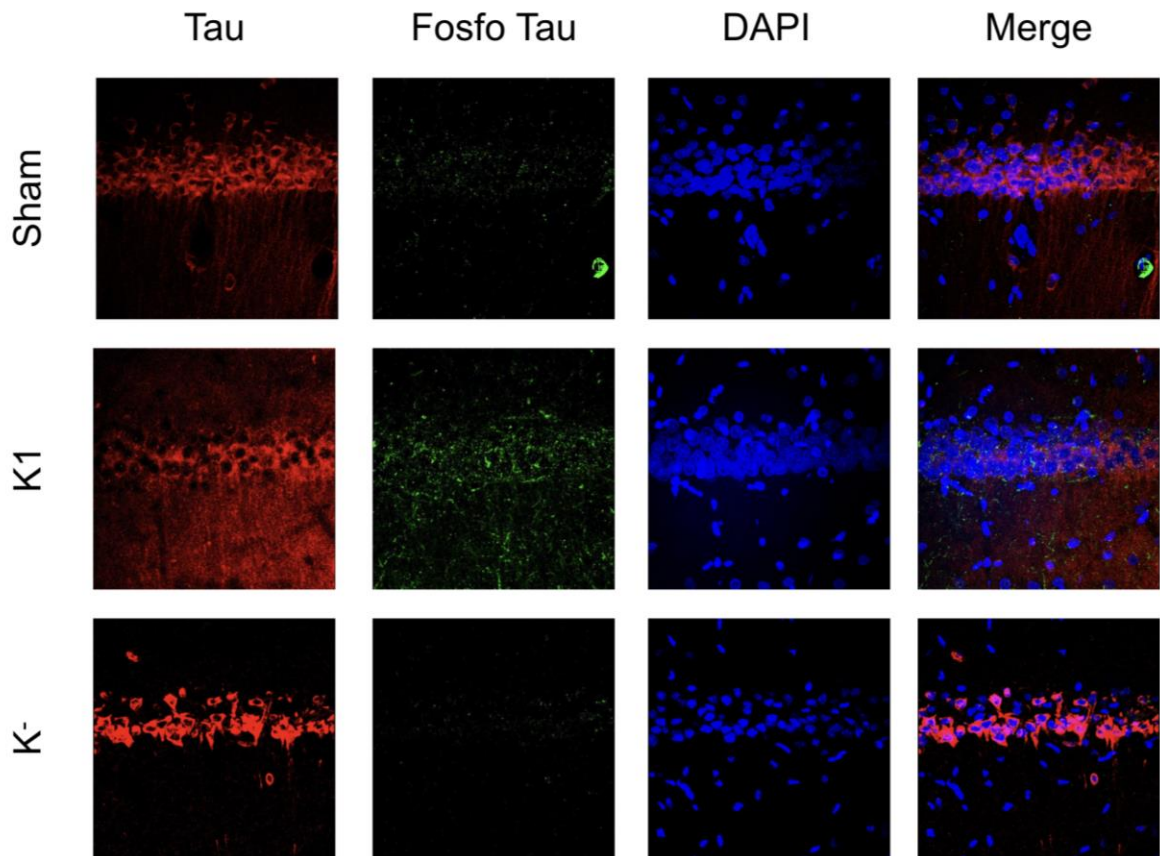


Figura 7. Inmunofluorescencia de tau y fosfo tau en hipocampos de ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas sham. Imágenes obtenidas de la región CA1 de hipocampos de ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o la cepa no capsulada K⁻ y ratas sham. En rojo proteína tau, en verde proteína tau fosforilada y en azul los núcleos de las células (DAPI).

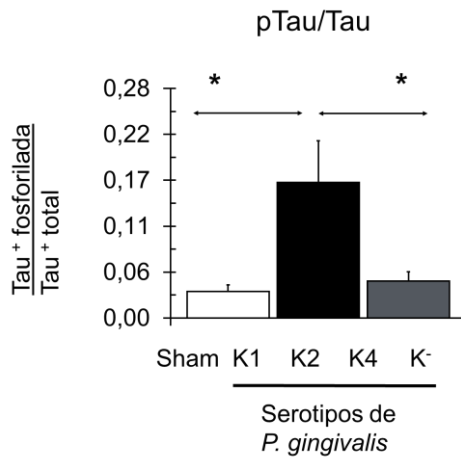


Figura 8. Razón de proteína Tau fosforilada (pTau)/Tau total. A partir de las células Tau⁺/DAPI y pTau⁺/DAPI se determinó la razón pTau/Tau. La gráfica representa el valor promedio ± desviación estándar. * p < 0,05.

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó un modelo de periodontitis experimental que consistió en la inoculación palatina de la cepa de *P. gingivalis* W50 de serotipo capsular K1 y la cepa mutante GPA no capsulada K⁻ en ratas Sprague-Dawley, el cual fue validado por la presencia de inflamación y resorción ósea en el grupo inoculado con *P. gingivalis* serotipo K1 (Suplementaria 3, Anexo 3). Luego, se evaluó el efecto de *P. gingivalis* serotipo K1 o la cepa no capsulada K⁻ en el aprendizaje y memoria espacial. Luego de 55 días en ambos grupos experimentales se logró detectar la presencia de factores de virulencia y marcadores genéticos de *P. gingivalis* en hipocampo y LCE (Supl. 4). La presencia de estos marcadores de la bacteria en el hipocampo de las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 pudo asociarse a mayores niveles de producción de citoquinas pro-inflamatorias y A β 1-42, astrogliosis, mayor razón de proteína Tau fosforilada/Tau total y menor desempeño en el *OASIS Maze*, en comparación con las ratas *sham* o con las inoculadas con la cepa no capsulada K⁻.

Actualmente, se reconoce que las cepas capsuladas de *P. gingivalis* presentan una mayor virulencia que las no capsuladas (Laine y Van Winkelhoff, 1998; Melgar-Rodríguez, 2014). Diversos estudios *in vitro* en distintas células inflamatorias han concluido que el serotipo capsular K1 es el más inmunogénico, estimulando una mayor producción de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias en comparación con los serotipos capsulares K3, K4, K5 o K6 y las cepas no capsuladas en macrófagos, monocitos, células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ (D'Empaire y cols., 2006; Vernal y cols., 2009; Kunnen y cols., 2012; Vernal y cols, 2014b; Díaz-Zúñiga y cols., 2015). En efecto, las células dendríticas son capaces de reconocer los polisacáridos capsulares mediante el receptor tipo Toll (del inglés *Toll like receptor*, TLR)-4 y activar la señalización intracelular que determina la respuesta inflamatoria o moduladora, dependiendo del serotipo infectante (Díaz-Zúñiga y cols., 2015). Las células dendríticas comparten la misma línea celular de origen que las microglías y se describe que las microglías reconocen los agregados de A β mediante TLR-4 y establecen la respuesta inflamatoria que origina el fenómeno neuroinflamatorio (Walter y cols., 2007; Reed-Geaghan y cols., 2009). Además, las microglías poseen la capacidad de reconocer a *P. gingivalis* y activarse a un fenotipo M1. Actualmente,

se plantea que la infección por *P. gingivalis* puede causar deterioro de la memoria a través de la inducción de una respuesta neuroinflamatoria mediada por la liberación de citoquinas proinflamatorias, en distintos modelos animales de EA (Ishida y cols., 2017; Ding y cols., 2018). Así, se propone que una infección periodontal por *P. gingivalis* serotipo K1 induce una mayor activación de microglías, lo que explicaría, al menos en parte, la mayor secreción de citoquinas proinflamatorias, en comparación con la infección por una cepa no capsulada. Se sugiere que esta distinta capacidad inmuno-estimuladora entre los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* podría deberse a diferencias en la composición y estructura de los polisacáridos capsulares (Schifferle y cols., 1989; Farquharson y cols., 2000; Vernal y cols., 2009; Monasterio y cols., 2018).

Recientemente, en un modelo experimental de EA se realizó la administración oral de *P. gingivalis* serotipo K1 en ratones de 8 semanas, 3 veces a la semana, por 22 semanas, detectándose un elevado nivel de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , un mayor número de microglías activas, astrogliosis, mayores niveles de A β 1-42, proteína Tau fosforilada y ovillos neurofibrilares en hipocampo, en comparación con las ratas control (Ilievski y cols., 2018). Contrariamente, algunos estudios han encontrado que la cepa *P. gingivalis* (ATCC[®]33277[™]) no capsulada (K⁻) produciría neuroinflamación, mayores niveles de A β 1-40 y A β 1-42, deterioro cognitivo y lesiones características de la EA, con respecto al control (Poole y cols., 2015; Ishida y cols., 2017; Ding y cols., 2018; Zhang y cols., 2018; Dominy y cols., 2019; Leira y cols., 2019). Al evaluar los distintos modelos utilizados para inducir la periodontitis experimental, todos los estudios lo realizan de una manera diferente y no todos evalúan el signo de resorción ósea. En efecto, la inyección de LPS intraperitoneal o la administración de bacterias mediante *oral gavage* no constituyen *per se* un modelo de periodontitis. El *gold standard* lo constituye la aplicación de ligaduras que inducen resorción ósea e inflamación entre el día 10 y 15 posterior a su instalación, o la inyección en la mucosa palatina, cuando se quiere evaluar el efecto de una bacteria o factor de virulencia en particular (Garlet, 2010). Recientemente, nuestro grupo de investigación logró demostrar que, en un modelo de periodontitis experimental en ratones, la cepa W50 (serotipo K1) y la cepa mutante GPA (no capsulada K⁻) son capaces de inducir una respuesta inmune

diferente posterior a la inoculación en la mucosa palatina de la bacteria *ad integrum* (Monasterio y cols., 2018). En términos generales, los estudios existentes no logran demostrar la presencia de periodontitis, por lo que los efectos cerebrales descritos podrían ser consecuencia de una disbiosis intestinal o de una inflamación sistémica.

La presencia de inflamación en el hipocampo incrementa los niveles de expresión de APP y BACE y, como consecuencia, aumentan los niveles secretados de A β 1-40 o A β 1-42 (Heneka y cols., 2015a; Frost y Li, 2017). Las principales células responsables de la secreción de A β son las neuronas y los astrocitos reactivos (Birch, 2014). En efecto, las ratas enfrentadas a *P. gingivalis* serotipo K1 presentaron mayores niveles de A β 1-42 en comparación al control y a las ratas inoculadas con la cepa no capsulada. No obstante los astrocitos reactivos son capaces de secretar mayores niveles A β 1-42 que las neuronas, las neuronas secretan 7 veces más A β 1-40 (Frost y Li, 2017). Sin embargo, el A β 1-42 secretado por los astrocitos reactivos tiene mayores modificaciones no enzimáticas que lo transforman en un péptido insoluble y permiten la conformación de placas seniles, las que mantienen una activación permanente de las microglías (Frost y Li, 2017). Así, para poder determinar si los niveles de A β son capaces de asociarse al deterioro cognitivo, se debe establecer la razón A β 1-42/A β 1-40 (Birch, 2014). En este sentido, la mantención de las funciones fisiológicas de las microglías y astrocitos es fundamental para la eliminación del A β 1-42 (Heneka y cols., 2015a; Cai y cols., 2017). En términos generales, los astrocitos reactivos presentes en las ratas enfrentadas a *P. gingivalis* serotipo K1 contribuyen a un incremento en la producción de A β 1-42 y a una posible disminución en su eliminación, lo que conduce a su acumulación cerebral y potencial formación de placas de A β 1-42, datos que aún no han sido demostrados.

Además, en condiciones neuroinflamatorias, como ocurre en el grupo inoculado con *P. gingivalis* serotipo K1, los mecanismos de eliminación de A β 1-42 podrían alterarse, por lo que gran parte del A β 1-42 se acumularía en el espacio perivascular de la barrera-hematoencefálica (Varatharaj y Galea, 2017). Esto permite explicar la mayor razón hipocampo/LCE de A β 1-42 en el grupo inoculado con *P. gingivalis* serotipo K1, en comparación con los demás grupos. En efecto, la menor detección de A β 1-42 en LCE de personas afectadas de EA es un marcador de progresión de

la enfermedad, puesto que es un dato sugerente de mayor acumulación cerebral y, por tanto, de una posible mayor neuroinflamación (Counts y cols., 2017; Pawlowski y cols., 2017; Molinuevo y cols., 2018). Al mismo tiempo, el ambiente neuroinflamatorio, oxidativo y la alteración de la homeostasis cerebral afectan el metabolismo y función de las neuronas hipocampales, alterando, en consecuencia, la función cognitiva (Cai y cols., 2017). Por lo tanto, la mayor neuroinflamación, astrogliosis, producción de A β 1-42 y proteína tau fosforilada producida ante *P. gingivalis* serotipo K1, explicarían el peor desempeño de estos animales en el *OASIS Maze*.

A partir de la detección de *P. gingivalis* o sus factores de virulencia en el cerebro, se puede especular que *P. gingivalis* o sus factores de virulencia difunden desde el sitio de inoculación a distintos tejidos u órganos del hospedero. Sin embargo, en este estudio no se pudo determinar si el transporte de las bacterias o sus factores de virulencia ocurrió desde la circulación periférica hacia el cerebro, o desde los tejidos periodontales hacia el cerebro por vía nerviosa. Recientemente, se ha propuesto la teoría del neurobioma que explica la migración de microorganismos desde la mucosa respiratoria o periodontal hacia el cerebro vía nervios olfatorio o trigémino (Miklossy, 2011; Olsen y Singhrao, 2015). Una vez en el cerebro, los microorganismos serían capaces de activar a las microglías a un fenotipo M1, que secretarán citoquinas pro-inflamatorias y MMP2 y 9. Las MMP2 y 9 serían capaces de degradar al colágeno tipo IV, claudinas, ocludinas y β -dístroglicanos, proteínas que permiten la conformación de la barrera hemato-encefálica (Agrawal y cols., 2006; Yang y cols., 2007). Así, una vez permeabilizada la barrera, las bacterias, sus factores de virulencia y los mediadores inflamatorios originados ante ellas, podrían difundir desde el cerebro hacia la circulación y, las bacterias, los factores de virulencia o los mediadores inflamatorios originados en los tejidos periodontales podrían ingresar en mayor medida al cerebro por esta vía. En este estudio se logró comprobar esta hipótesis parcialmente, ya que se detectó a *P. gingivalis* en hipocampo, suero y LCE, pero no es posible determinar la dirección en que esta bacteria migró. Sería adecuado un estudio que incluya la cuantificación de MMP-2 y MMP-9 en el hipocampo de ambos grupos experimentales, ya que estas MMPs están involucradas en varios de los mecanismos que generan cambios disruptivos

en la barrera hemato-encefálica durante la inflamación (Yang y cols., 2007; Varatharaj y Galea, 2017). De esta forma, un aumento de estas MMP permitiría inferir que hay una mayor difusión de mediadores inflamatorios y, posiblemente, de las bacterias o sus factores de virulencia desde la circulación periférica hacia el cerebro y, así, conocer la contribución de esta vía en este modelo de periodontitis.

Resulta importante resaltar que los roedores son un modelo que no desarrolla EA ni periodontitis de forma natural. En este contexto, el uso de modelos de animales transgénicos puede ser aplicado a las causas genéticas de la EA que constituyen cerca del 5%, sin embargo, el 95% de las causas son enfermedades crónicas no transmisibles, hábitos, estilos de vida, nutrición, entre otras variables (Kamer y cols., 2008a; Harding y cols., 2017). El uso de ratas *wild-type* en este estudio permite demostrar el efecto real de la periodontitis experimental inducida por una bacteria *keystone*. Así, la periodontitis inducida por *P. gingivalis* serotipo K1 se correlacionó inversamente con la capacidad de aprendizaje y memoria espacial. En comparación con la cepa no capsulada, los controles *sham* no presentaron diferencias. Por lo tanto, la presencia de cápsula K1 en *P. gingivalis* podría determinar una mayor virulencia de la bacteria y una mayor contribución a la inflamación cerebral, acumulación de marcadores de EA y deterioro cognitivo.

La EA es la forma más común de demencia y su manejo ha significado un gran desafío de políticas públicas de salud con un gasto financiero a nivel mundial que va en aumento. La prevención a través del manejo de factores modificables es una de las claves para evitar o desacelerar la progresión de la EA. En este sentido, comprender la contribución de la periodontitis y, específicamente, de *P. gingivalis* o sus factores de virulencia al desarrollo de la EA, es fundamental para el desarrollo de estrategias de intervención y opciones terapéuticas apropiadas para esta enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo se determinó que:

1. La periodontitis experimental inducida por *P. gingivalis* serotipo K1 se asoció a alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial, en comparación con la inoculación con la cepa no capsulada K⁻ y el control.
2. La periodontitis experimental inducida por la cepa *P. gingivalis* W50 (serotipo K1) se asoció a una mayor neuroinflamación en hipocampo, en comparación con las demás condiciones.
3. La periodontitis experimental inducida por la cepa *P. gingivalis* W50 (serotipo K1) se asoció a una mayor acumulación de los marcadores histopatológicos A β 1-42 y Tau hiperfosforilada, asociados a la EA, en hipocampo, en comparación con las demás condiciones.

Productividad.

Título del trabajo: "*Porphyromonas gingivalis* immune response affect rat's neurons and microglia behavior".

Autores: Díaz-Zúñiga, J., Villalobos, F., Jiménez, M., Melgar-Rodríguez, S., Vernal, R., Paula-Lima, A.

Congreso: XXX Reunión Anual de la IADR, División Chilena.

Premio: **Premio Curaprox a mejor presentación de póster, categoría pregrado.**

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abusleme, L., Blanc, V., León, R., Gamonal, J., & Silva, N. (2012). Genotipificación de los genes *rgpA* y *kgp* que codifican para las gingipaínas de *Porphyromonas gingivalis*. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 5(3), 135–138. doi:10.1016/s0718-5391(12)70108-8
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., ... 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. doi:10.1038/ismej.2012.174
- Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., Van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., & Sorokin, L. M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 1007–1019. https://doi.org/10.1084/jem.20051342
- Aduse-Opoku, J., Slaney, J. M., Hashim, A., Gallagher, A., Gallagher, R. P., Rangarajan, M., ... Curtis, M. A. (2006). Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*, 74(1), 449–460. doi:10.1128/IAI.74.1.449-460.2006
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., ... Wyss-Coray, T. (2000). *Inflammation and Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging* (Vol. 21).
- Albandar, J. M. (2002). Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 29, 177–206.
- Aragón, F., Zea-Sevilla, M. A., Montero, J., Sancho, P., Corral, R., Tejedor, C., ... 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
- Birch, A. M. (2014). The contribution of astrocytes to Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1316–1320. https://doi.org/10.1042/BST20140171

- Boggian, I., Buzzacaro, E., Calistri, A., Calvi, P., Cavaggioni, A., Mucignat-Caretta, C., & Palu, G. (2000). Asymptomatic herpes simplex type 1 virus infection of the mouse brain. *Journal of NeuroVirology*, *6*(4), 303–313.
<https://doi.org/10.3109/13550280009030756>
- Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2012). *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, *333*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x>
- Bozoglan, A., Ertugrul, A. S., Taspınar, M., & Yuzbasioglu, B. (2017). Determining the relationship between atherosclerosis and periodontopathogenic microorganisms in chronic periodontitis patients. *Acta Odontologica Scandinavica*, *75*(4), 233–242.
<https://doi.org/10.1080/00016357.2017.1280739>
- Brunner, J., Wittink, F. R. A., Jonker, M. J., De Jong, M., Breit, T. M., Laine, M. L., ... Crielaard, W. (2010). The core genome of the anaerobic oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*, *10*(252), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-252>
- Cai, Z., Wan, C. Q., & Liu, Z. (2017). Astrocyte and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology*, *264*(10), 2068–2074. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8593-x>
- Chaudhary, A. R., Berger, F., Berger, C. L., & Hendricks, A. G. (2018). Tau directs intracellular trafficking by regulating the forces exerted by kinesin and dynein teams. *Traffic*, *19*(2), 111–121. <https://doi.org/10.1111/tra.12537>
- 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>
- Corbella, S., Taschieri, S., Del Fabbro, M., Francetti, L., Weinstein, R., & Ferrazzi, E. (2016). Adverse pregnancy outcomes and periodontitis: A systematic review and meta-analysis exploring potential association. *Quintessence Int.*, *47*(3), 193–204. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a34980>
- Cortelli, J. R., Roman-Torres, C. V. G., Romeiro Aquino, D., Nobre Franco, G. C., Oliveira Costa, F., & Cavalca Cortelli, S. (2010). Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Brazilian Oral Research*, *24*(2), 217–223.
- Counts, S. E., Ikonovic, M. D., Mercado, N., Vega, I. E., & Mufson, E. J. (2017).

- Biomarkers for the early detection and progression of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 14(1), 35–53. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0481-z>
- Crooks, E. A., & Geldmacher, D. S. (2004). Interdisciplinary approaches to Alzheimer's disease management, 20, 121–139. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2003.11.004>
- D'Empaire, G., Baer, M. T., & Iii, F. C. G. (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>
- Díaz-Zúñiga, J. (2014). *Variabilidad de la respuesta de los linfocitos TCD4 + activados con distintos serotipos de Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., Ciuchi, P., ... 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>
- Díaz-Zúñiga, J., Muñoz, Y., Melgar-Rodríguez, S., More, J., Bruna, B., Lobos, P., ... Paula-Lima, A. (2019). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease? *Journal of oral microbiology*, 11(1), 1586423. doi:10.1080/20002297.2019.1586423
- Díaz Zúñiga, J., Yañez Figueroa, J., Melgar Rodríguez, S., Álvarez Rivas, C., Rojas Lagos, C., & Vernal Astudillo, R. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 5(1), 40–45. [https://doi.org/10.1016/S0718-5391\(12\)70090-3](https://doi.org/10.1016/S0718-5391(12)70090-3)
- 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*, 15(6), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0110-7>

- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. F. (2008). Differential regulation of Dynein and Kinesin motor proteins by Tau. *Science*, 319, 8–11. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1152993>
- 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), 1–22. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- Farquharson, S. I., Germaine, G. R., & Gray, G. R. (2000). Isolation and characterization of the cell-surface polysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 53978. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(3), 151–157. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2000.150302.x>
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M., & Holmstrup, P. (2006). Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(6), 401–407. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00924.x>
- Frost, G. R., & Li, Y. M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biology*, 7(12), 1–14. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>
- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., Aranda, W., ... Arteaga, O. (2010). Clinical Attachment Loss in Chilean Adult Population : First Chilean National dental examination survey. *Journal of Periodontology*, (October), 1403–1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>
- 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>
- 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>
- Gurav, A. N. (2014). Alzheimer's disease and periodontitis – an elusive link. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 60(2), 173–180.
- Haass, C. (2004). Take five-BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *The EMBO Journal*, 23(3), 483–

488. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600061>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hajishengallis, G. (2014a). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular Oral Microbiology*, 29(6), 248–257. <https://doi.org/10.1111/omi.12065>
- Hajishengallis, G. (2014b). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. doi:10.1016/j.it.2013.09.001
- Hajishengallis, G., Darveau, R., & Curtis, M. A. (2012). The Keystone pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>.
- Hamilton, J. A., Hasturk, H., Kantarci, A., Serhan, C. N., & Van Dyke, T. (2017). Atherosclerosis, Periodontal disease, and treatment with Resolvins. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(57). <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0696-4>
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), 140–155. <https://doi.org/10.1002/glia.10161>
- Harding, A., Gonder, U., Robinson, S. J., Crean, S. J., & Singhrao, S. K. (2017). Exploring the association between Alzheimer's disease, oral health, microbial endocrinology and nutrition. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00398>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14, 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229–236.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(July), 463–477.

<https://doi.org/10.1038/nri3705>

- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., ... León, R. (2008). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(2), 106–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01170.x>
- Holt, S. C., Kesaval, L., Walker, S., & Genco, C. A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 20, 168–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03920.x>
- Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E., Le, K., ... Watanabe, K. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *Public Library of Science One*, 13(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>
- Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-kato, Y., Hagiwara, 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), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0015-x>
- 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 and Dementia*, 4(4), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.08.004>
- Kamer, A. R., Dasanayake, A. P., Craig, R. G., Glodzik-Sobanska, L., Bry, M., & De Leon, M. J. (2008). Alzheimer's disease and peripheral infections: The possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis. *Advances in Alzheimer's Disease*, 5, 163–181. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3233/978-1-61499-706-1-163>
- Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 25(1), 8–20.
- Kunnen, A., Dekker, D. C., Van Pampus, M. G., Harmsen, H. J. M., Aarnoudse, J. G., Abbas, F., & Faas, M. M. (2012). Cytokine production induced by non-encapsulated and encapsulated *Porphyromonas gingivalis* strains. *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1558–1566.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.07.013>

- Lacroix, S., Feinstein, D., & Rivest, S. (1998). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathology*, *8*, 625–640.
- Laine, M. L., Appelmelk, B. J., & Van Winkelhoff, A. J. (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, *31*, 278–284.
- Laine, M. L., & Van Winkelhoff, A. J. (1998). Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1998.tb00714.x>
- Leira, Y., Iglesias-Rey, R., Gómez-Lado, N., Aguiar, P., Campos, F., D’Aiuto, F., ... Sobrino, T. (2019). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced periodontitis and serum amyloid-beta peptides. *Archives of Oral Biology*, *99*(January), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.008>
- Leira, Y., Seoane, J., Blanco, M., Rodríguez-Yáñez, M., Takkouche, B., Blanco, J., & Castillo, J. (2017). Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, *32*(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10654-016-0170-6>
- Liu, L., & Duff, K. (2008). A technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *Journal of Visualized Experiments*, *21*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.12.002>
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS , IFN γ + TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4 , IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(215), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>
- Mahat, M. Y. A., Fakrudeen Ali Ahamed, N., Chandrasekaran, S., Rajagopal, S., Narayanan, S., & Surendran, N. (2012). An improved method of transcutaneous cisterna magna puncture for cerebrospinal fluid sampling in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *211*(2), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.09.013>
- Martínez, G., Vidal, R. L., Mardones, P., Serrano, F. G., Ardiles, A. O., Wirth, C., ... Hetz, C. (2016). Regulation of memory formation by the Transcription Factor

- XBP1. *Cell Reports*, 14(6), 1382–1394.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.028>
- Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P., ... Vernal, R. (2016). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular Oral Microbiology*, 31(2), 162–174.
<https://doi.org/10.1111/omi.12112>
- Melgar Rodríguez, S. (2014). *Efecto de la estimulación con los distintos serotipos de Porphyromonas gingivalis y Aggregatibacter actinomycetemcomitans en la actividad de los linfocitos TCD4+ y la reabsorción ósea in vitro*. Universidad de Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/147391>
- Miklossy, J. (2011). Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13, 1–34.
<https://doi.org/10.1017/s1462399411002006>
- Molinuevo, J. L., Ayton, S., Batrla, R., Bednar, M. M., Bittner, T., Cummings, J., ... Blennow, K. (2018). Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathologica*, 136(6), 821–853. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1932-x>
- Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., ... Vernal, R. (2018). 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*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0079>
- More, J., Galusso, N., Veloso, P., Montecinos, L., Finkelstein, J. P., Sanchez, G., ... 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), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00399>
- More, J. Y., Bruna, B. A., Lobos, P. E., Galaz, J. L., Figueroa, P. L., Namias, S., ... Adasme, T. (2018). Calcium release mediated by redox-sensitive RyR2 channels has a central role in hippocampal structural plasticity and spatial memory. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(12), 1125–1146.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7277>

- Muñoz, Y., Paula-Lima, A. C., & Núñez, M. T. (2018). Reactive oxygen species released from astrocytes treated with amyloid beta oligomers elicit neuronal calcium signals that decrease phospho-Ser727-STAT3 nuclear content. *Free Radical Biology and Medicine*, *117*, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.006>
- Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K., Bhyrapuneni, G., Muddana, N., Saralaya, R., & Benade, V. (2009). A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *Journal of Neuroscience Methods*, *178*(1), 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.12.001>
- Offenbacher, S. (1996). Periodontal Diseases: Pathogenesis, *1*(1), 821–878.
- Olsen, I., & Singhrao, S. K. (2015). Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *Journal of Oral Microbiology*, *7*(1). <https://doi.org/10.3402/jom.v7.29143>
- Paula-Lima, A. C., Adasme, T., SanMartín, C., Sebollela, A., Hetz, C., Carrasco, M. A., ... 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>
- Pawlowski, M., Meuth, S. G., & Duning, T. (2017). Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's Disease—From brain starch to bench and bedside. *Diagnostics*, *7*(3), 42. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7030042>
- Perry, V. H., & Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration, 601–612. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0382-8>
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & W., J. N. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, *366*(20), 1809–1820.
- Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., Kesavalu, L., & Crean, S. J. (2015). Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brains. *Journal of Alzheimer's Disease*, *43*, 67–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-140315>

- 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*, *36*, 665–677. <https://doi.org/10.3233/JAD-121918>
- Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., & Taylor, R. (2012). Periodontitis and diabetes: A two-way relationship. *Diabetologia*, *55*(21), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2342-y>
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). *World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia*.
- Puertas, A., Magan-Fernandez, A., Blanc, V., Revelles, L., O'Valle, F., Pozo, E., ... Mesa, F. (2018). Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *31*(5), 597–602. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1293023>
- Reed-Geaghan, E. G., Savage, J. C., Hise, A. G., & Landreth, G. E. (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *Journal of Neuroscience*, *29*(38), 11982–11992. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3158-09.2009>
- Riviere, G., 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>
- Ryden, L., Buhlin, K., Ekstrand, E., De Faire, U., Gustafsson, A., Holmer, J., ... Klinge, B. (2016). Periodontitis increases the risk of a first myocardial infarction: A report from the PAROKRANK study. *Circulation*, *133*(6), 576–583. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020324>
- SanMartín, C. D., Paula-Lima, A. C., Hidalgo, C., & Núñez, M. T. (2012). Sub-lethal levels of amyloid β -peptide oligomers decrease non-transferrin-bound iron uptake and do not potentiate iron toxicity in primary hippocampal neurons. *BioMetals*, *25*(4), 805–813. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9545-7>
- SanMartín, C. D., Veloso, P., Adasme, T., Lobos, P., Bruna, B., Galaz, J., ... Paula-Lima, A. C. (2017). RyR2-mediated Ca²⁺ release and mitochondrial ROS generation partake in the synaptic dysfunction caused by Amyloid β Peptide oligomers. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(115), 1–17.

- <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00115>
- Schifferle, R. E., Reddy, M. S., Zambon, J. J., Genco, R. J., & Levine, M. J. (1989). Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *The Journal of Immunology*, *143*(9), 3035–3042.
- Singhraj, 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.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent Jr., R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque, *25*, 134–144.
- Sundqvist, G., Figdor, D., Hanstrom, L., Sorlin, S., & Sandstrom, G. (1991). Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, (8).
- Tonetti, M. S., & Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and systemic diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, *40*(14), 24–29. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12089>
- Valyi-Nagy, T., Olson, S. J., Valyi-Nagy, K., Montine, T. J., & Dermody, T. S. (2000). Herpes simplex virus type 1 latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons. *Virology*, *278*(2), 309–321. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0678>
- 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>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior and Immunity*, *60*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Vernal, R., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., & Garcia-Sanz, J. A. (2014). 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>
- Vernal, R., Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Pujol, M., Diaz-Guerra, E., Silva, A., ... Garcia-Sanz, J. A. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and

- memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(5), 451–459.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12236>
- Vernal, R., Leon, R., Herrera, D., Garcia-Sanz, J. A., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01073.x>
- 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>
- Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., ... Faßbender, K. (2007). Role of the Toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20, 947–956.
- Weller, R. O., Boche, D., & Nicoll, J. A. R. (2009). Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and their potential impact on therapy. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 87–102.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0498-z>
- Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F., Collcutt, A., ... Nakanishi, H. (2017). Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain Behavior and Immunity*, 65, 350–361.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.002>
- Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W., & Rosenberg, G. A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), 697–709. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375>
- Yoshino, T., Laine, M. L., Van Winkelhoff, A. J., & Dahlén, G. (2007). Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1),

75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00651.x>

Zhang, J., Yu, C., Zhang, X., Chen, H., Dong, J., Lu, W., & Song, Z. (2018). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroinflammation*, 15(37), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1052-x>

IX. ANEXOS

ANEXO Nº1:

Certificado Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile



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 de 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 Nº1150736, Fondecyt Nº1140904 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

ANEXO N°2

1. Curva de crecimiento bacteriano

Con el objetivo de obtener un número suficiente y reproducible de unidades formadoras de colonias (UFC) para la inducción de las infecciones periodontales, las curvas de crecimiento se obtuvieron tal y como se describió previamente (Vernal y cols., 2008). Brevemente, cada cepa bacteriana se inoculó en 10 mL de caldo de cultivo BHI suplementado con hemina y menadiona y mantuvieron en cámara de anaerobiosis hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 560 nm (Halo RB-10 UV-VIS Spectrophotometer, Dynamica, Germany). Lecturas de espectrofotómetro adicionales se realizaron en distintos tiempos hasta que el microorganismo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO, se tomó una muestra de 100 μ L, la que se diluyó de forma seriada (\log_{10}) en PBS y 100 μ L de cada dilución se sembró en BHI suplementado con hemina y menadiona. Luego de 5-7 días, el número de unidades formadoras de colonias se cuantificó y contrastó con las DO correspondientes. A partir de los datos obtenidos se graficaron las curvas DO versus tiempo y DO versus $\text{UFC} \times 10^6/\text{mL}$ para obtener un número conocido de UFC/mL en fase de crecimiento exponencial para realizar la inducción de la infección periodontal. Esto fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

2. Purificación del mRNA total de muestras biológicas y expresión de moléculas mediante qPCR.

La purificación del RNA total de las muestras de mucosa palatina y la síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente (Díaz-Zúñiga, 2014; Díaz-Zúñiga y cols., 2015; Melgar-Rodríguez y cols., 2016). La expresión de los RNA mensajeros de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α de mucosa palatina se analizó a partir de 50-200 ng de cDNA mediante qPCR utilizando partidores específicos (Tabla 1), un kit KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, EE. UU.) y como indica el fabricante.

3. Detección de *Porphyromonas gingivalis*

A partir de muestras hipocampo y LCE se purificó el DNA total para la cuantificación de la subunidad 16S y los genes *RgpA* y *Kgp*, siguiendo las instrucciones del fabricante (FavorPrep™ Tissue Genomic DNA extraction Mini Kit, Favorgen Biotech Corp.). Brevemente las muestras se incubaron en 200 µL de buffer FATG1 y 20 µL de proteinasa K y se incubaron a 60°C hasta lograr la lisis de las muestras. Luego de eluir, la muestra se incubó durante 2 min con 4 µL de RNAasa A, seguido de 200 µL de buffer FATG1 a 70°C durante 1 hr y posteriormente se agregaron 200 µL de etanol 100%. La columna con la muestra se insertó en un tubo de colección y centrifugó durante 1 min a 18.000 xg y luego se lavó la columna con 400 µL de buffer FATG. A continuación, se realizaron 2 lavados de la columna: 400 µL de buffer W1 y 1 min de centrifugación a 18.000 xg y 750 µL de buffer de lavado seguido de 1 min de centrifugación a 18.000 xg. Finalmente, la columna se incubó con 200 µL de buffer de elución (pH 7,5-9,0) durante 3 min y se centrifugó a velocidad máxima durante 2 min para eluir el DNA total. Las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro (Bio-Tek) y almacenaron a -80°C hasta la cuantificación absoluta mediante qPCR.

Para detectar la presencia de marcadores de *P. gingivalis* en LCE y homogenizado de hipocampo se cuantificó el número de copias del gen que codifica para subunidad 16S o las gingipaínas *RgpA* o *Kgp*. Brevemente, a partir de 50 ng de DNA obtenidos de hipocampo se cuantificaron los genes codificantes para *RgpA* y *Kgp* y a partir de DNA obtenido de hipocampo y LCE se cuantificó la subunidad ribosomal 16S mediante qPCR, utilizando partidores específicos para *P. gingivalis* (Tabla 1), un *kit* KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, USA), según las indicaciones del fabricante y, utilizando un equipo StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA), se realizó el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60° durante 30 segundos. Las UFC se calcularon de forma indirecta en base al número de copias del gen de la subunidad 16S de *P. gingivalis*.

Además, en hipocampo y LCE se detectó la presencia de la gingipaína *RgpA* mediante citometría de flujo. Brevemente, 100 µL de cada muestra se centrifugó a 2.000 xg durante 5 min a 4°C. Posteriormente, el *pellet* se resuspendió en 200 µL

de PBS 1X, 5% de suero bovino fetal y anti-RgpA (1:200, RgpA R1, Biorbyt, UK), incubó durante 30 min a 4°C y centrifugó a 2.000 xg durante 5 min a 4°C. Luego, el *pellet* se resuspendió en 200 µL de anticuerpo anti-rabbit (Alexa Fluor® 647) durante 30 min a 4°C y se centrifugó a 2.000 xg durante 5 min a 4°C. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 200 µL de PBS 1X y realizó la lectura en el citómetro de flujo (FACSCantoA, BD, Biosciences, NJ, USA). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo LLC, OR, USA).

Tabla N°1. Partidores utilizados para la detección de moléculas.

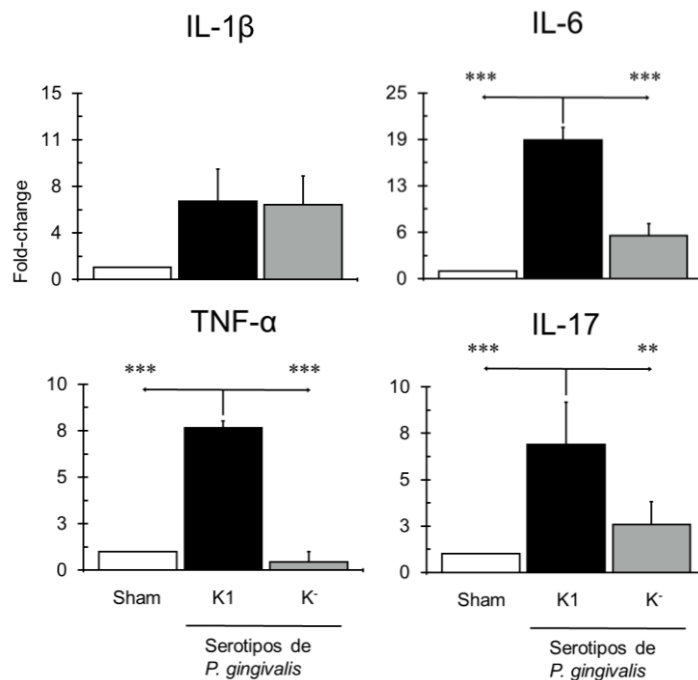
Molécula	Partidor <i>Forward</i>	Partidor <i>Reverse</i>	Referencias
IL-1β	5'tgtgatgaaagacggcacac3'	5'cttctcttgggtctttgttgg3'	Díaz-Zúñiga y cols., 2019
IL-6	5'cccttcaggaacagctatgaa3'	5'acaacatcagtccaagaagg3'	Díaz-Zúñiga y cols., 2019
TNF-α	5'gccagaccctcacactc3'	5'ccactccagctgctcctct3'	Díaz-Zúñiga y cols., 2019
16S	5'gcgctcaacgttcagcc3'	5'cacgaattccgcctgc3'	Ilievski y cols., 2018
RgpA	5'agtgagcgaaacttcggagc3'	5'ggatcactgggtataacctgtcc3'	Abusleme y cols., 2012
Kgp	5'gaactgacgaacatcattg3'	5'gctggcattagcaaacacctg3'	Abusleme y cols., 2012

ANEXO N°3:

Modelo de infección periodontal experimental y detección de *P. gingivalis*

Para determinar si la inoculación de *P. gingivalis* serotipo K1 o la cepa no capsulada K⁻ en la mucosa palatina es capaz de inducir inflamación y resorción ósea, a partir de muestras de mucosa palatina, suero y maxilares, se cuantificaron los niveles de expresión y secreción de moléculas pro-inflamatorias y la resorción ósea, respectivamente (Supl. 1).

En muestras de mucosa palatina de las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 se detectaron elevados niveles de expresión de IL-6, IL-17 y TNF- α en comparación con las ratas inoculadas con la cepa no capsulada K⁻ o ratas *sham*.

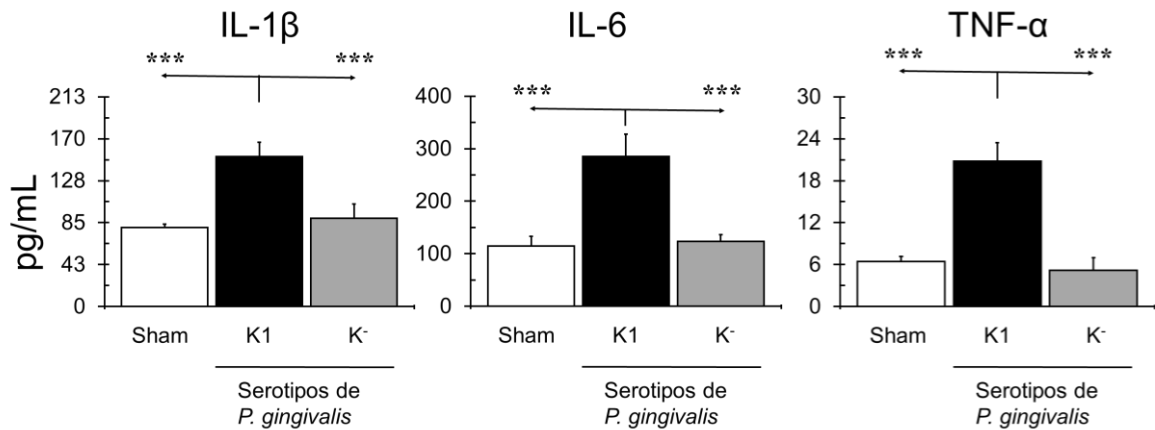


Suplementaria 1. Expresión de moléculas en mucosa palatina de ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas *sham*. A partir de mucosa palatina de 4 ratas por condición, se evaluaron los niveles de expresión de las moléculas pro-inflamatorias y pro-resortivas. Las gráficas representan el valor promedio \pm desviación estándar. IL: interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Luego, en muestras de suero, en las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 se observaron mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en comparación a las ratas inoculadas con la cepa no capsulada K⁻ o ratas *sham* (Supl. 2).

Además, en las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 se detectó mayor resorción ósea en los 1^o, 2^o y 3^o molares maxilares derechos e izquierdos, en

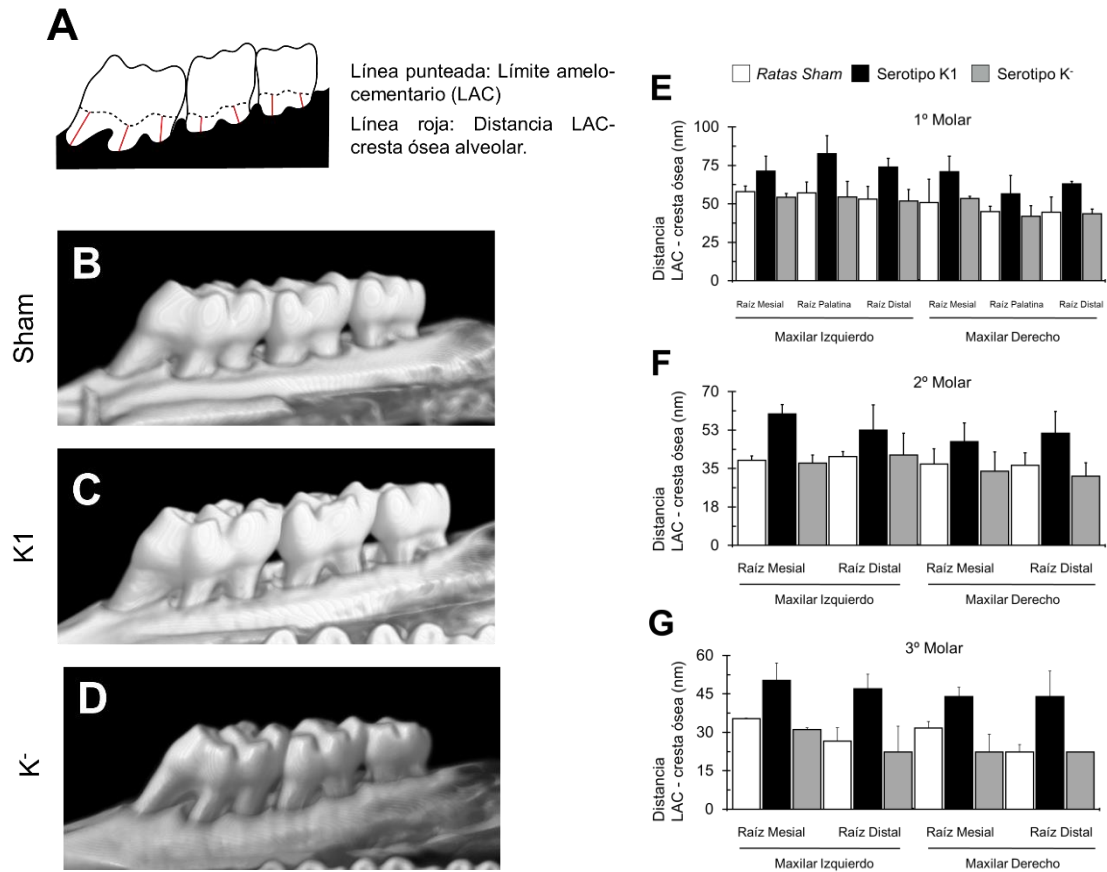
comparación con las ratas inoculadas con la cepa no capsulada K⁻ o ratas *sham* (Anexo N°2, Supl. 3).



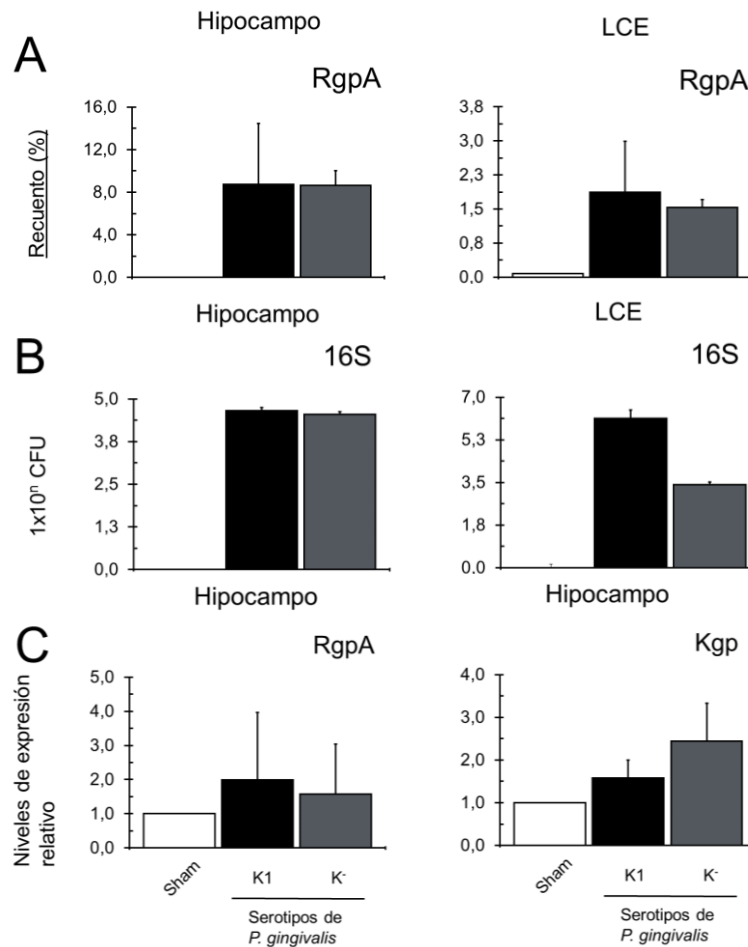
Suplementaria 2. Secreción de moléculas en suero de ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas *sham*. A partir de suero de 4 ratas por condición, se evaluaron los niveles de secreción de las moléculas pro-inflamatorias. Las gráficas representan el valor promedio \pm desviación estándar. IL: interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Finalmente, se detectó la presencia de marcadores genéticos y moleculares de *P. gingivalis* en hipocampo y LCE, mediante la cuantificación, con partidores específicos, de la subunidad 16S y de las gingipaínas RgpA y Kgp, por qPCR y citometría de flujo, respectivamente (Tabla 1). Para todas las muestras se detectó un incremento en la presencia de los marcadores de la bacteria tanto en las ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 como con la cepa no capsulada K⁻, en comparación con las ratas *sham* (Supl. 4).

En conjunto, estos datos nos permiten determinar que la inoculación palatina de *P. gingivalis* serotipo K1 en las ratas Sprague-Dawley induce mayor inflamación local, resorción ósea e inflamación sistémica que la cepa no capsulada (K⁻) y las ratas *sham*.



Suplementaria 3. Resorción ósea maxilar en ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K y ratas sham. A partir de imágenes de maxilares obtenidas mediante microCT se realizó la reconstrucción 3D y se cuantificó la pérdida ósea. A. Esquema de las medidas lineales utilizadas para la cuantificación de la resorción ósea. La línea negra punteada es el límite amelo-cementario (LAC), la línea inferior negra corresponde al hueso alveolar, la línea roja es la distancia entre el LAC y la cresta ósea. B a D) Reconstrucción 3D de hemimaxilares, E a G) Gráfica que representa el valor promedio \pm desviación estándar de la resorción ósea de los 1º, 2º y 3º molares. No se demuestran las diferencias estadísticas.



Suplementaria 4. Detección de marcadores genéticos y moleculares de *P. gingivalis* en hipocampo y LCE de ratas inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 o K⁻ y ratas sham.

A partir de muestras de hipocampo (4 por cada condición) o LCE (4 por cada condición) se detectó la presencia de los siguientes marcadores de *P. gingivalis*: A) Detección de la proteína RgpA mediante citometría de flujo, B) Cuantificación absoluta de una secuencia específica del gen de la subunidad 16S y C) Cuantificación de los niveles de expresión relativo de los genes *RgpA* y *Kgp* en hipocampos. Las gráficas representan el valor promedio \pm desviación estándar.