



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INSTITUTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ÁREA DE BIOLOGÍA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Caracterización morfológica de la microglía y los astrocitos en respuesta al patógeno oral *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o a agregados del péptido beta-amiloide.

Ignacio Leopoldo Muñoz Bermúdez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL

Prof. Dra Andrea Paula-Lima

TUTORA ASOCIADA

Prof. Maria Isabel Behrens

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1190958

Santiago, Chile 2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Caracterización morfológica de la microglía y los astrocitos en respuesta al patógeno oral *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o a agregados del péptido beta-amiloide.

Ignacio Leopoldo Muñoz Bermúdez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL

Prof. Dra Andrea Paula-Lima

TUTORA ASOCIADA

Prof. Maria Isabel Behrens

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1190958

Santiago, Chile 2022

Dedicatoria:

Este trabajo te lo dedico a ti Ignacio del pasado, porque solo nosotros sabemos cuánto pasamos, lo bueno, lo malo, lo entretenido (porque fue demasiado entretenido), los miedos y lo lejano que se sentía este momento. Pero aquí estamos, lo logramos, siempre te dije que este momento llegaría, como dice mi mamá no hay plazo que no se cumpla.

Agradecimientos:

Habiendo recorrido este largo camino, le agradezco a cada una de las personas que me han acompañado y han sido mi soporte durante estos años. Empezando por mi mamá y mi papá que siempre me instaron comenzar y a avanzar en este proceso, a mi hermano y hermana que vieron lo que costó, los adoro. A mi tata que dio su apoyo con largas horas de conversaciones por teléfono. A mi amor que está al lado mío mientras escribo. A Seba, que es quien más me apuró (se que fue siempre con cariño). A los Trabajos Comunitarios de Odontología que vi nacer y nos vieron crecer. A mi tutora la Dra. Andrea Paula Lima por la paciencia y su apoyo y por supuesto no podía faltar Cristian, por todo lo que pasamos y lo que se viene, gracias por estar literalmente en todas, este camino lo hicimos juntos y agradezco que hayas aparecido para quedarte.

Ahora solo queda seguir caminando.

Los quiero, bai.

Índice

Dedicatoria:	3
Agradecimientos:	4
Resumen:	6
Introducción / Marco Teórico:	8
Enfermedad de Alzheimer	10
Periodontitis como factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer	13
Hipótesis y objetivos:	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL.	17
Materiales y métodos:	18
Cultivos primarios expuestos a factores de virulencia de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	18
Inmunofluorescencia:	20
Análisis morfométricos:	21
Análisis de datos	22
Resultados:	23
Perímetro celular:	23
Densidad celular:	25
Dimensión fractal:	27
En la figura 6a se muestra una representación binaria de una microglía control inmunomarcada con Iba-1. En la figura 6c, que muestra la cuantificación de la dimensión fractal tras los tratamientos, se observa que no ocurren cambios significativos en la dimensión fractal de la microglía expuesta a LPS de los serotipos A, B ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.	28
Lagunaridad:	28
Intersecciones máximas:	31
Radio crítico:	33
En la figura 12c se observa que no hay diferencias significativas en el radio crítico de la microglía expuesta a LPS de los serotipos A, B, ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.	34
Discusión:	35
Conclusiones:	39
Referencias bibliográficas:	40

Resumen:

Introducción: La periodontitis corresponde a una patología caracterizada por una inflamación mediada por el huésped asociada a **microbios**, que resulta en pérdida de inserción periodontal. Las bacterias asociadas en este proceso podrían generar bacteremias conllevando a patologías de tejidos específicos. Se ha evidenciado una relación entre periodontitis y otras patologías como la enfermedad de Alzheimer donde la periodontitis podría generar neuroinflamación. La *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) es uno de los periodontopatógenos más potentes y se ha asociado a enfermedades periodontales graves, agresivas y de inicio temprano. *Aa* es conocida por su capacidad de evadir la respuesta inmune. Sus lipopolisacáridos interfieren con las defensas del huésped y determinan diferentes serotipos bacterianos. De los siete serotipos de *Aa* identificados, a, b y c son los más frecuentes en la cavidad oral. El serotipo c se asocia más frecuentemente a sujetos sanos y el b, a mayor severidad en la patología oral. A pesar de que ya se ha reportado la presencia de *Aa* en abscesos cerebrales, poco se conoce de los efectos que esta bacteria puede causar sobre las neuronas y células de la glía. En nuestro laboratorio estudiamos los efectos de los serotipos a, b y c sobre cultivos primarios de hipocampo o corteza de rata, modelos experimentales utilizados para estudiar el funcionamiento de las células cerebrales tanto en contexto de salud, como de enfermedad. Nuestro grupo reportó que el serotipo b, así como en el contexto oral, es también el más agresivo para los cultivos hipocampales, **causando una severa reducción de las prolongaciones neuronales y secreción de moléculas pro-inflamatorias**. En el presente estudio el objetivo fue estudiar en detalle si los LPS de diferentes serotipos de *Aa* causan alteraciones a la morfología glial, comparando con los efectos causados por oligómeros del péptido beta-amiloide a estas células, que son agregados proteicos que funcionan como toxinas sinápticas en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, que afecta severamente a la función hipocampal. A pesar de que existen diversas estrategias para estudiar cambios en la morfología neuronal (como el análisis de Sholl), los cambios en glia han sido mucho menos estudiados, demandando el desarrollo y prueba de distintas estrategias para la observación y caracterización de cambios significativos en su morfología.

Materiales y métodos: Cultivos primarios de astrocitos y/o microglía de hipocampo o corteza de rata fueron obtenidos como descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio. Una vez aislados, los cultivos fueron tratados con 50 ug/mL de LPS de los serotipos a, b y c de *Aa* o con 500 nM de A β O (concentración subletal) por 48 h. Para los controles negativos se trataron las células con el vehículo del LPS bacteriano o de los A β O. Tras fijación con paraformaldehído 4%, los astrocitos fueron inmunomarcados con anticuerpos específicos contra la proteína ácida fibrilar glial y la microglía, con anticuerpos contra la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1. Para estudiar la morfología glial, se evaluó con el software ImageJ (NIH) parámetros que permiten obtener información morfológica a 2 dimensiones, como la dimensión fractal, la lagunaridad, la

densidad y el perímetro celulares. Asimismo, a través de la adaptación del análisis Sholl para células de la glía, se calcularon intersecciones máximas y el radio crítico de las células. **Resultados:** Con los análisis morfológicos que utilizamos para estudiar la morfología glial, solo observamos cambio significativo en uno de los parámetros utilizados, y bajo una única condición experimental. Observamos una disminución significativa de las intersecciones máximas de los astrocitos expuestos a los A β O, comparados con su respectivo control. En los demás parámetros, y bajo el estímulo de los diferentes serotipos de Aa, no se observan cambios significativos, al menos en los parámetros analizados. **Conclusiones:** La exposición de cultivos primarios de astrocitos y microglía de rata al LPS de diferentes serotipos de Aa no causa cambios significativos en la dimensión fractal, la lagunaridad, la densidad y el perímetro celulares. Asimismo, no se observaron cambios en las células de la glía cuando se calcularon las intersecciones máximas y el radio crítico utilizando una adaptación del análisis de Sholl para las células de la glía. Sin embargo, observamos que los A β O generan una disminución en la cantidad de intersecciones máximas en comparación a los astrocitos control. Así, con el estímulo neurotóxico de los A β O, la adaptación del análisis de Sholl para los astrocitos permitió detectar cambios morfológicos significativos al menos en uno de los parámetros estudiados.

Introducción / Marco Teórico:

La periodontitis corresponde a una patología que se caracteriza por una inflamación mediada por el huésped, asociada a **microbios**, que resulta en pérdida de inserción periodontal (Tonetti y cols., 2018). La evidencia sugiere que bacterias asociadas a periodontitis pueden penetrar el tejido gingival e ingresar al torrente sanguíneo durante la masticación, el cepillado o procedimientos odontológicos y podrían de esta manera inducir una bacteremia transitoria recurrente (Lockhart y cols., 2008). Así, las lesiones periodontales se reconocen como reservorios que se renuevan continuamente para la propagación de bacterias, antígenos y citoquinas junto a otros mediadores proinflamatorios. Una vez que la bacteria, sus factores de virulencia y/o mediadores inflamatorios entran en contacto con órganos distantes en el cuerpo, se ha postulado que ellos podrían inducir respuestas inflamatorias similares, resultando esto en patologías de tejidos específicos (Poole y cols., 2013). En relación con lo anterior, la periodontitis ha sido ligada a varias enfermedades sistémicas tales como enfermedad vascular aterosclerótica (Wu y cols., 2000), diabetes mellitus (Taylor y Borgnakke, 2008) y enfermedad de Alzheimer (Sparks y cols., 2007). La posible asociación entre la periodontitis y la enfermedad de Alzheimer se ha evidenciado en varios niveles, pero los mecanismos biológicos aún no son completamente claros (Martande et al., 2014, Wu and Nakanishi, 2014, Cestari et al., 2016, Pritchard et al., 2017, Teixeira et al., 2017, Aragón et al., 2018, Holmer et al., 2018).

En los últimos años se ha descrito la presencia de periodontopatógenos Gram negativo como *Porphyromonas gingivalis*, y *Treponema denticola*, en tejido cerebral humano post-mortem de sujetos que presentaron la enfermedad de Alzheimer durante su vida (Riviere y cols., 2002; Poole y cols., 2013). Además, existe evidencia que sugiere que la aplicación crónica oral de *Porphyromonas gingivalis* resulta en inflamación cerebral, neurodegeneración y acumulación excesiva de agregados del péptido β -amiloide incluyendo su presencia en neuronas, astrocitos y microglía hipocampales, pudiendo existir así, una posible traslocación bacteriana de periodontopatógenos al cerebro en modelos de periodontitis experimental en ratas (Ilievski y cols., 2018). Otros estudios han mostrado que la infección oral con esta

bacteria puede exacerbar las características patológicas en ratones transgénicos con enfermedad de Alzheimer (Ishida y cols., 2017). Esta evidencia acumulada sugiere que los patógenos periodontales, bacterias directamente relacionadas con la instalación y desarrollo de la periodontitis, pueden ser parte de las variables que influyen en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y provocar cambios a nivel tisular y celular.

En este grupo de bacterias, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) se destaca como uno de los periodontopatógenos más potentes. Es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo que ha sido implicado en enfermedades periodontales graves, agresivas y de inicio temprano (Slots y Ting, 1999). Se ha demostrado que Aa posee diversos factores de virulencia que mejoran su supervivencia en la cavidad oral y le permiten eludir las estrategias de protección del huésped; estos factores pueden agruparse en tres grupos: 1) Factores que promueven la colonización y persistencia en la cavidad oral (adhesinas e invasinas); 2) Factores que interfieren con las defensas del huésped [leucotoxina, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas inmunosupresoras] y 3) factores que destruyen los tejidos del huésped (citotoxinas y colagenasa). Estos factores les confieren a Aa una variedad de mecanismos de virulencia, que incluyen múltiples mecanismos de evasión inmune que se reflejan en la patología tisular local particularmente grave de las periodontitis agresivas (Malik y cols., 2015). La asociación de Aa con enfermedades sistémicas como endocarditis, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedad de Alzheimer y Artritis Reumatoide han sido reportadas y relacionadas con la capacidad de Aa de evadir la respuesta inmune del huésped (Oscarsson y cols., 2019).

Se han identificado siete serotipos específicos de Aa (denominados con las letras A a G) hasta la fecha (Malik y cols., 2015). Los serotipos A, B y C, son los más frecuentes en la cavidad oral. Los sujetos sanos con frecuencia portan cepas de serotipo C, y albergan los serotipos A y B con una prevalencia aproximadamente igual. Sin embargo, la presencia del serotipo B está aumentada en sujetos menores de 30 años afectados de periodontitis etapa III o IV, grado C (Malik y cols., 2015).

Se demostró previamente que el serotipo B de Aa posee una capacidad aumentada para inducir una respuesta inmune del tipo Th22 en ambas, células dendríticas y linfocitos T (Díaz-Zúñiga y cols., 2014, 2015). Resultados más recientes demostraron que los tejidos periodontales infectados con diferentes serotipos de Aa exhiben diferentes grados de resorción ósea alveolar y respuesta inmune distintas: el serotipo B provocó niveles significativamente más altos de resorción ósea e inflamación (Monasterio y cols., 2018). Interesantemente, un potencial efecto inmunoprotector por parte del serotipo a fue demostrado tras una co-infección de éste con el serotipo B en células dendríticas (Rojas y cols., 2018).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia entre las personas mayores (Organización Mundial de la Salud, 2015). La edad es el principal factor de riesgo en el desarrollo de esta patología neurodegenerativa. La degeneración afecta a regiones específicas del cerebro, privando a los pacientes de su memoria, una función cognitiva humana esencial. A pesar de que se haya estudiado en forma extensiva los mecanismos patogénicos que causan la EA desde su primera descripción en 1907 por Alois Alzheimer, aún no es posible prevenir o curar esta enfermedad. Así, comprender los mecanismos responsables de la pérdida de memoria en la EA sigue siendo un gran desafío para la neurociencia actual.

La hipótesis de la cascada de amiloide es la teoría más aceptada para explicar la patogénesis de la EA (Walsh y Selkoe, 2020). Según esta hipótesis, la acumulación del péptido A β en el cerebro es el primer paso de una cascada de eventos que altera la función neuronal, altera las conexiones sinápticas y culmina en la demencia. El A β es un péptido de 4,5 kDa generado en el cerebro durante la vida a través del procesamiento proteolítico por gamma y β -secretasas de la proteína precursora amiloide transmembrana (APP). Por mecanismos que permanecen sin resolver, el A β comienza a acumularse en el parénquima cerebral de algunos individuos de edad avanzada (Karran y cols., 2011), provocando una falla progresiva en la función

neuronal, con pérdida significativa de las sinapsis y, en última instancia, la muerte neuronal.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los péptidos A β , su acumulación favorece la agregación, dando lugar a la formación de diferentes estados conformacionales, que incluyen oligómeros A β solubles (A β Os) y fibrillas A β insolubles, entre otros agregados A β tóxicos (Reiss y cols., 2018). Los péptidos A β de 42 aminoácidos tienen una tendencia particularmente fuerte para formar A β Os y fibrillas. Aunque las fibrillas que componen las placas amiloides son neurotóxicas (Louzada y cols., 2001, 2005; Paula-Lima y cols., 2003, 2005, 2009, 2013), la presencia de A β Os se correlaciona mejor con la pérdida de sinapsis y los deterioros cognitivos que la aparición de fibrillas (Ferreira y cols., 2015). Es de destacar que recientemente se demostró que, si bien los A β Os intracelulares alteran la función sináptica, los A β Os extracelulares promueven un círculo vicioso que propaga la patología sináptica de neuronas enfermas a neuronas sanas, lo que corrobora la noción de que los A β Os son efectores fundamentales en la patogénesis de la EA (Rolland y cols., 2020).

Sin embargo, otros puntos de vista consideran que la EA es el resultado de patologías independientes pero cruzadas relacionadas con la edad que afligen al envejecimiento del cerebro humano (Tse y Herrup, 2017), muchas de las cuales se relacionan con la neuroinflamación. Se ha descrito también en la literatura que células de la microglía en la EA se activan frente a los A β Os y fibrillas insolubles de A β por medio de receptores celulares de superficie. La unión de A β con los receptores CD36, TLR4 y TLR6 resulta en la activación de la microglía, que comienza a producir citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Por otro lado, la delección genética *in vitro* de CD36, TLR4 y TLR6 reduce la producción de citoquinas inducida por A β y previene la acumulación de amiloide y la activación de complejos multiproteicos conocidos como inflamasomas (Heneka y cols., 2015). Junto a la microglía activada, astrocitos reactivos hipertróficos se acumulan alrededor de placas seniles y han sido vistas a menudo en tejido humano *post-mortem* de pacientes con EA y en modelos animales de la enfermedad. Por otro lado, en modelos animales de EA, la respuesta temprana está marcada por una atrofia astrogliar que podría tener efectos de largo alcance en la conectividad sináptica, debido a que los astrocitos son centrales para la mantención de la transmisión

sináptica contribuyendo así a los déficits cognitivos. Estas células además liberan citoquinas, interleuquinas, óxido nítrico y otras moléculas posiblemente citotóxicas luego de la exposición a A β , exacerbando la respuesta neuroinflamatoria. Adicionalmente los astrocitos tienen un rol potencial en la internalización y degradación de A β *in vivo*. Además, los astrocitos adultos tienen una mayor expresión de proteasas extracelulares que degradan A β . Junto a lo anterior, los astrocitos tienen un rol importante en el *clearance* de A β Os del parénquima a través de drenaje paravenoso (Heneka y cols., 2015).

El reconocimiento de patrones asociados a daño, como los A β Os y el LPS bacteriano, podrían asociarse a cambios morfológicos en las células de la glía en el cerebro. Recientemente se realizó un estudio muy detallado de los cambios morfológicos de los astrocitos y microglia en un modelo experimental de la enfermedad de Alzheimer, que consiste en ratones transgénicos APP / PS1. En este modelo se demostró que se observa un aumento en la expresión de la proteína acídica fibrilar glial, un marcador de astrocitos, en comparación a los cerebros de ratones tipo salvaje (ratones control). Sin embargo, se demostró que este aumento no se debe a una proliferación astrocitaria significativa, sino a cambios morfológicos en los cuales los astrocitos exhiben una característica hipertrófica activada, con cuerpos celulares agrandados y procesos gruesos. Por otro lado, se detectó marcada proliferación celular en células de la microglía en la corteza de los ratones APP / PS1, en comparación con los controles (Li et al., 2020).

Por décadas el foco de estudio mayoritario en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas ha sido el de los cambios morfológicos neuronales. Solamente en los últimos años, la atención de la comunidad científica se ha vuelto para los cambios morfológicos gliales, lo que se acompañó de un avance importante en los métodos de detección de cambios morfológicos en astrocitos y en células de la microglía (Fernández-Arjona y cols., 2017, Plata y cols., 2018, Li et al., 2020). En un estudio reciente, se describió una disminución de las ramificaciones distales de astrocitos seguido de daño neurodegenerativo en un modelo de *status epilepticus* en ratas, acompañado de microgliosis en las zonas afectadas del hipocampo (Plata y cols., 2018). Se evaluó la morfología de las células gliales evaluadas utilizando

parámetros como *dimensión fractal*, *lagunaridad*, *densidad* y *perímetro* (Fernández-Arjona y cols., 2017).

Periodontitis como factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer

En términos generales, las enfermedades inflamatorias crónicas podrían ser la causa de alteraciones neurológicas y, por lo tanto, asociarse con enfermedades neurodegenerativas (Heneka y cols., 2015; Román-Malo y Bullon, 2017). La EA, que es la principal causa de demencia y por lo tanto una de las patologías neurológicas de mayor importancia global, ha sido recientemente considerada como el resultado de varias patologías independientes pero cruzadas, relacionadas con la edad (Tse y Herrup, 2017). En la EA, la primera activación del sistema inmune sucede dentro del sistema límbico y, en particular, en la corteza entorrinal y el hipocampo (Sojkova y Resnick, 2011). Estas dos regiones son también las primeras en sufrir neurodegeneración en la EA. El hipocampo es la región responsable del procesamiento de la memoria en el cerebro, y la pérdida de esta función cognitiva es el principal síntoma de la EA.

Existe creciente evidencia clínica de que la periodontitis está estrechamente relacionada con la aparición y progresión de la EA. La tercera encuesta nacional de examen de salud y nutrición (NHANESIII) indica una asociación transversal entre un marcador serológico de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) y un deficiente rendimiento cognitivo en sujetos mayores de 60 años (Noble y cols., 2009). Además, los niveles séricos de anticuerpos contra Pg son incrementados significativamente en los participantes diagnosticados con EA en comparación con aquellos en controles sanos de edad similar (Sparks y cols., 2012). La presencia de las tres principales bacterias periodontales, que agrupadas en este contexto son conocidas como "El complejo rojo – The red complex", el cual incluye *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, y Pg, fue detectado en el tejido cerebral de individuos con y sin demencia (Poole y cols., 2013), pero sólo los niveles de los antígenos de Pg fueron significativamente más altos en el tejido cerebral de los casos de EA en comparación con los tejidos de controles sanos.

Si bien el cerebro está bien protegido contra la invasión microbiana por la barrera hematoencefálica, una variedad de microorganismos patógenos logra alcanzar al sistema nervioso central, y las infecciones resultantes pueden causar morbilidad y mortalidad significativas (Dando y cols., 2014). Los patógenos microbianos pueden acceder al cerebro (i) penetrando la barrera hematoencefálica o el líquido cerebroespinal o (ii) a través de los nervios olfativo, trigémino (Kristensson, 2011) y/o vago (Bolte, 1998). Se realizó un estudio en cerebros de pacientes con EA para identificar algunas de las principales bacterias de la enfermedad periodontal (*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*) y / o componentes bacterianos en el tejido cerebral a partir de 12 h *post-mortem*. El cual demostró, utilizando un anticuerpo monoclonal específico para LPS de *Pg*, que esta bacteria fue detectada en 4 de los 4 cerebros con EA, mientras que los 4 cerebros obtenidos de individuos no AD no presentaron inmunoreactividad (Poole y cols., 2013). Ratones infectados por vía oral con *Pg*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Fusobacterium nucleatum* como infecciones mono y polimicrobianas, sólo exhibieron *Pg* en el cerebro, y no las otras bacterias, demostrando que *Pg* tiene la capacidad de invadir el cerebro, al menos en condiciones patológicas como la EA (Poole y cols., 2014).

Una evidencia preclínica más reciente demuestra que la infección oral con *Pg* exagera el defecto en la memoria y las características histopatológicas de la EA, en ratones transgénicos que funcionan como modelos para la enfermedad neurodegenerativa (Ishida y cols., 2017). También se ha demostrado que esta bacteria induce deterioro de la memoria y neuroinflamación dependiente de la edad en ratones (Ding y cols., 2018). Además, la infección por *Pg* indujo la secreción de citoquinas proinflamatorias en el cerebro con defectos cognitivos (Wu y cols., 2017; Zhang y cols., 2018). Notablemente, la mono-infección oral por *Pg* promueve neurodegeneración y producción del péptido A β en ratones de tipo salvaje (Ilievski y cols., 2018).

A pesar de la implicancia conocida de *Aa* en las formas más severas de periodontitis y del vínculo clínico entre periodontitis y EA, el único artículo que hasta el momento sugiere posibles implicancias de *Aa* en la etiología de la EA es el que recientemente publicamos bajo el título “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?" (Díaz-Zúñiga y cols., 2019). En este estudio experimental *in vitro*, el objetivo fue determinar si las células cerebrales, que incluyen la microglía, células inmunes fagocíticas del cerebro, **son capaces de reconocer** la variabilidad en la conformación del LPS de los diferentes serotipos Aa. En el trabajo citado, **determinamos** los efectos del LPS purificado de los serotipos a, b o c de Aa sobre cultivos primarios de microglía o células mixtas del hipocampo. En este trabajo, nuestro grupo demostró que ambos tipos de cultivo exhiben niveles más altos de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) cuando tratados con el LPS del serotipo b, en comparación con el control, y con los otros serotipos a y c. Además, los cultivos tratados con LPS del serotipo a mostraron niveles aumentados de expresión de citoquinas IL-4 e IL-10. Los cultivos mixtos de hipocampo tratados con LPS del serotipo b exhibieron cambios morfológicos neuronales severos y niveles aumentados de péptido A β 1-42 secretado. Estos resultados indican que el LPS de diferentes serotipos Aa desencadenan respuestas inmunes discriminatorias, que afectan diferencialmente a las células primarias del hipocampo en el caso del desafío con el LPS del serotipo b en particular. En conjunto, los resultados publicados en este artículo revelan que el tratamiento con el LPS del serotipo b de Aa desencadena la secreción de citoquinas proinflamatorias por la microglía, induce la reducción de las neuritas y aumenta los niveles extracelulares de A β 1-42, todas las características anteriores se relacionan a la patología neurodegenerativa EA (Díaz-Zúñiga y cols., 2019).

Recientemente, se demostró que las células de la microglía, en condiciones inflamatorias, presentan morfologías diferentes en comparación con las células de la microglía en una situación de control (Fernández-Arjona y cols., 2017) y que estos cambios morfológicos están estrechamente relacionados con la función de estas células (Fernández-Arjona y cols., 2019). Además, se observa una heterogeneidad en los fenotipos de los astrocitos, así como se discute su posible impacto en la función cerebral durante el envejecimiento y las enfermedades neurales (Matías y cols., 2019,). Sin embargo, y a pesar de que se sabe que estas células responden de manera discriminatoria a diferentes serotipos de Aa (Díaz-Zúñiga y cols., 2019), hasta la fecha no existen reportes en que se haya comparado la morfología de las

células de la microglía y de los astrocitos en respuesta a factores de virulencia de diferentes periodontopatógenos y a agregados del péptido β -amiloide. Debido a esto, es necesario establecer los efectos que pudieran tener estos agentes a nivel de la morfología tanto de las células de la microglía y los astrocitos, con el fin de avanzar en el conocimiento de las consecuencias patológicas que subyacen a su presencia en el cerebro. También, sería interesante conocer si los posibles efectos provocados por estos agentes pudieran ser potenciados entre sí.

Hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS

Los factores de virulencia de los serotipos A, B y C de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y los oligómeros del péptido beta-amiloide afectan diferencialmente la morfología de la microglía y de los astrocitos en cultivos primarios de hipocampo de rata.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar los cambios morfológicos en la microglía y los astrocitos presentes en cultivos primarios de hipocampo de rata expuestos a factores de virulencia de diferentes serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y a los oligómeros del péptido beta-amiloide.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar grado de arborización, cambios en los parámetros morfológicos *dimensión fractal, lagunaridad, densidad y perímetro* de la microglía en cultivos primarios de hipocampo de rata expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
2. Determinar grado de arborización, cambios en los parámetros morfológicos *dimensión fractal, lagunaridad, densidad y perímetro* de astrocitos obtenidos de cultivos primarios de hipocampo de rata y expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
3. Determinar grado de arborización, cambios en los parámetros morfológicos *dimensión fractal, lagunaridad, densidad y perímetro* en astrocitos obtenidos de cultivos primarios de hipocampo de rata expuestos a A β O_s.

Materiales y métodos:

Cultivos primarios expuestos a factores de virulencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Obtención de LPS bacteriano:

Para este estudio se usó LPS purificado de cepas de Aa ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 43718™ (serotipo b) o ATCC® 43719™ (serotipo c) para tratar las células tal y como se describió previamente (Díaz-Zúñiga y cols., 2014; 2019). Se obtuvo LPS de Aa tal y como se describió previamente (Al-Qutub y cols., 2006, Díaz-Zúñiga et al., 2019). Brevemente, se resuspendió 1×10^{10} CFU/mL de Aa en Tris-reagent y se añadió cloroformo para incubar a temperatura ambiente por 15-30 minutos. Además, se obtuvo el sobrenadante por centrifugación por 10 minutos a $11.000 \times g$, el cual se purificó por liofilización durante la noche. Después, el LPS se resuspendió en 1 mL de $MgCl_2$ 0.375 M en 95% etanol y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, y después de completar la mezcla, la suspensión se centrifugó a $5.000 \times g$ por 5 min. Este paso se repitió dos veces. El segundo supernadante se decantó y se añadió 1 mL de etanol al 100% y la suspensión se centrifugó a $5.500 \times g$ por 5 min. El pellet final fue resuspendido en 0.1 mL de agua libre de endotoxina. El LPS se visualizó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% de sulfato de sodio y dodecilo (SDS-PAGE) y tinción periódica de ácido de plata como se ha descrito previamente (Tsai y Frasch, 1982).

Cultivos Primarios de Hipocampo:

El Comité de Bioética en Animales de Experimentación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile aprobó el protocolo bioético que se usó en este estudio (17085-ODOUCH Protocolo). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, USA. Los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* y se eutanasiaron bajo anestesia profunda para evitar el sufrimiento animal en cada etapa de los experimentos. Los cultivos se prepararon de embriones de 18 días de edad obtenidos de ratas Sprague–Dawley embarazadas como se ha descrito previamente (Paula-Lima y cols., 2005). Brevemente, después de la

remoción los cerebros fueron colocados en un plato con solución de glucosa de Hank y los hipocampos fueron disecados por disociación mecánica suave en solución de glucosa de Hank. La suspensión de células fue centrifugada y resuspendida en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de caballo al 10% y posicionado en placas tratadas con polilisina. Luego de 40 minutos, el DMEM se reemplazó por medio Neurobasal suplementado con B-27. Las células se mantuvieron *in vitro* por 18-21 días a 37°C en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5% preferente para manipulación experimental.

Cultivos Primarios de Microglía:

Se obtuvo microglía cortical de rata como se ha descrito previamente (Muñoz y cols., 2018; Diaz-Zúñiga et al., 2019). Brevemente, se disecó corteza cerebral de recién-natos de rata Sprague–Dawley macho o hembra de 1-3 días de edad en solución salina tamponada de Hank, con 0.25% de tripsina suplementada y 0.5 mg/mL DNase I. Los cultivos mixtos de astrocitos y microglía se incubaron en DMEM que contiene 10% de suero fetal bovino. Luego de 13 días en cultivo, las células se agitaron vigorosamente en una agitadora a 2 xg por 72 h para despegar las células microgliales. Las células microgliales se posicionaron en medio suplementado con DMEM hasta 80% de confluencia.

Cultivos Primarios de Astrocitos:

Después de agitar los cultivos mixtos de astrocitos y microglía como se describió en la sesión anterior, los astrocitos se tripsinizaron y se volvieron a sembrar en placas de 35 mm o placas P60, y crecido hasta la confluencia antes de su uso

Tratamientos:

Para evaluar si las células del hipocampo reconocen y responden diferenciadamente a la variabilidad estructural de LPS de diferentes serotipos de Aa y a los AβOs, se trataron células hipocampales mixtas o células corticales microgliales con 50 ng/mL de LPS de Aa o 500 nM AβOs por 48 h. Las células incubadas con 50 ng/mL de LPS de los serotipos a o c de Aa fueron consideradas como controles; para los controles negativos (no inducido, ni), los cultivos celulares

fueron suplementados con tampón fosfato salino (PBS)(1X), el vehículo del LPS, tal como se ha realizado previamente (Díaz-Zúñiga y cols., 2014).

Inmunofluorescencia:

Para analizar los efectos en la morfología celular en respuesta a los diferentes serotipos de *Aa* sobre los cultivos celulares, se marcaron astrocitos con anticuerpos específicos contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y la microglía con anticuerpos contra la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1). Se evaluó la morfología celular por medio de inmunofluorescencia. Después de la estimulación con LPS, los cultivos primarios fueron fijados en paraformaldehído al 4%, se bloqueó y permeabilizó por 2 h con BSA al 2.5% y Triton X-100 al 0.3% en PBS. Las células de hipocampo fueron entonces incubadas durante la noche con los anticuerpos primarios anti-GFAP monoclonal de ratón (Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA) a 1:300 o con anti-Iba1 policlonal de conejo (Abcam®, Cambridge, MA, USA) a 1:100 diluido en solución de bloqueo, y lavado 3 veces con PBS. Las células microgliales fueron incubadas durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-Iba1, diluido en solución bloqueadora a 1:300, y lavada tres veces con PBS. Más tarde, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra (Alexa Fluor® 633, Abcam®) a 1:2000 o anticuerpo anti-conejo (Alexa Fluor® 488) y anti-ratón (Alexa Fluor® 635, Thermo Fisher Scientific) ambos a 1:2000 diluido en solución bloqueadora y se añadió a las células de acuerdo con el protocolo previamente descrito (Paula-Lima y cols., 2011). Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron tres veces con PBS y se montaron en medio con DAPI (Abcam®) para poder visualizar los núcleos. Las células fueron examinadas con un microscopio espectral confocal C2 Plus (Nikon, USA) y las imágenes fueron procesadas usando el software Image J (NIH, MD, USA). Las imágenes fueron obtenidas de al menos cinco campos elegidos de manera aleatoria por cubreobjetos, de al menos tres cubreobjetos por cada cultivo. La proporción de células marcadas fue determinada contando las células positivamente teñidas por el anticuerpo primario en relación con el total de células teñidas con DAPI. Se realizó análisis Sholl usando el software Image J. Tres a cinco

experimentos independientes se realizaron con cultivos obtenidos de embriones de diferentes ratas.

Análisis morfométricos:

Estos análisis se realizaron tanto para la microglía y astrocitos de cerebros de roedores expuestos a LPS de *Aa* como para los astrocitos de los cultivos celulares tratados con oligómeros del péptido beta-amiloide. Se midieron 6 parámetros utilizando el software gratuito FracLac para ImageJ (Karperien, A., FracLac for ImageJ1 1999–2013; disponible en el sitio web de ImageJ, National Institutes of Health; Karperien et al., 2013) como se ha descrito previamente (Fernández-Arjona, 2017):

1. Dimensión Fractal (D): Un D más alto significa un patrón de mayor complejidad. Se definió un acercamiento matemático para definir patrones fractales, donde D es el exponente que indica la escala a la cual (ϵ) es elevado para obtener el número de idénticas partes de sí mismo (N_ϵ ; Ecuación 1). Por lo tanto, D puede ser calculado de la relación entre $\ln N_\epsilon$ y $\ln \epsilon$ dentro de una estructura (ecuación 2) como la pendiente de una regresión lineal simple entre los datos de $\ln N_\epsilon$ frente a los datos de $\ln \epsilon$.

$$N_\epsilon = \epsilon^D \quad (1)$$

$$D = \ln N_\epsilon / \ln \epsilon \quad (2)$$

El software de conteo de cajas se utilizó para contar el número de cajas que contuviera cualquier píxel en primer plano de las imágenes procesadas en grillas de calibres sucesivamente más pequeños. La escala del tamaño de caja se obtuvo como una serie de potencias, lo que significa que la base se eleva al exponente agregado para realizar tamaños sucesivos. La pendiente obtenida finalmente para cada imagen fue el promedio de 12 medidas con posicionamientos de la grilla diferentes y aleatorios.

2. Lagunaridad (Λ): El valor de Λ obtenido calculado con el contador de cuadros del software FracLac es el coeficiente de variación expresado como densidad de pixel por cuadro como una función del tamaño del cuadro. Para evitar parcialidad en los resultados de la Λ , el promedio de distribución de masa por escala de series de potencia y también con 12 locaciones de cuadrícula fueron calculados (Karperien y cols., 2015).
3. Área: El número total de píxeles presentes en la forma llena de la imagen celular, transformado a micrómetros cuadrados (área de pixel = 0.013 μm^2).
4. Área del casco convexo (CHA): Donde el casco convexo es el polígono convexo más pequeño (aquel con todos los ángulos interiores menores a 180°) conteniendo la forma celular completa.
5. Densidad: Se calcula dividiendo el área de la célula por su CHA.
6. Perímetro: Se mide basado en el contorno único de la forma celular como el número de píxeles expresado en micrones (lado de pixel = 0.115 μm).

De los 6 parámetros anteriormente mencionados el área y el CHA se calcularon para poder obtener la densidad. También se realizó el análisis Sholl con el software Image J. De este se obtuvieron la cantidad de intersecciones máximas y el radio crítico, este último corresponde a la distancia de la prolongación más larga de la célula.

Análisis de datos

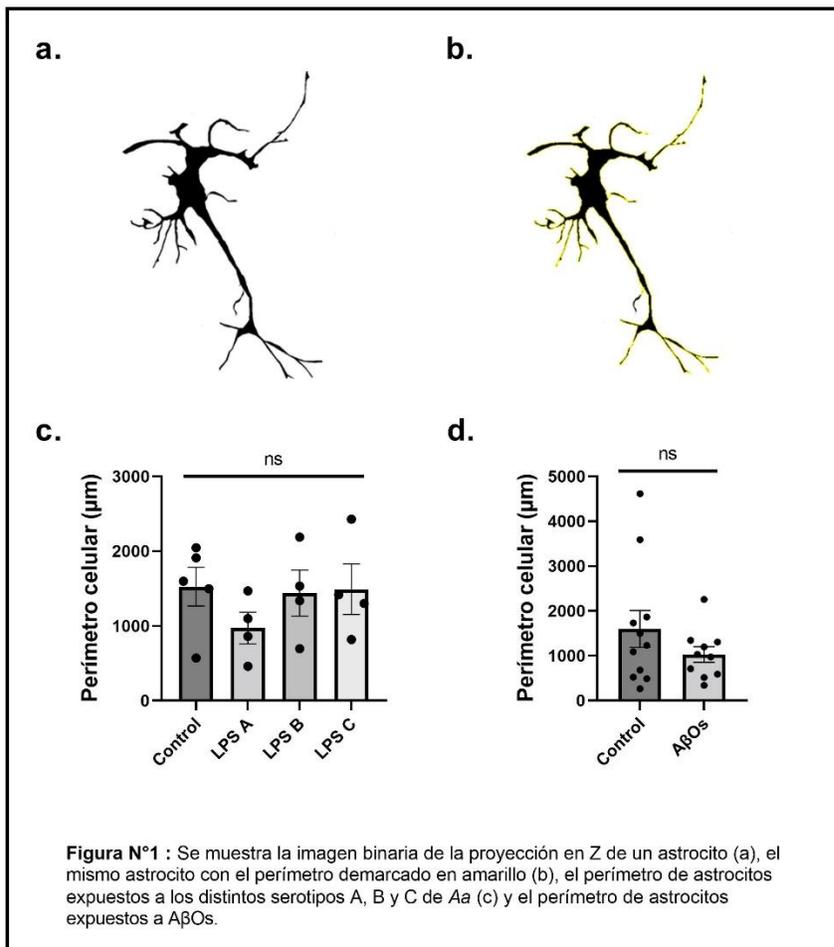
Los datos fueron estadísticamente analizados usando el software GraphPad de Prism. La distribución normal de los datos fue determinada usando el test Shapiro-Wilk. Diferencias entre grupos y comparaciones múltiples fueron analizadas con los test ANOVA-Tukey o Kruskal Wallis-Dunn para distribución paramétrica o no paramétrica, respectivamente. Diferencias entre dos grupos fueron analizadas con test-t de student para distribución paramétrica y con el test Mann Whitney para distribución no paramétrica. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

Resultados:

Se muestran los parámetros morfológicos perímetro celular, densidad celular, dimensión fractal, lagunaridad, intersecciones máximas y radio crítico evaluados en microglía y astrocitos hipocampales de cultivos primarios expuestos a LPS de distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y en astrocitos expuestos a 500 uM de agregados del péptido beta amiloide (AbOs). Se compararon las distintas muestras expuestas a los LPS A, B y C con sus respectivos controles y entre ellas mismas. Además, se realizó la comparación de los astrocitos expuestos a agregados del péptido beta amiloide con sus controles.

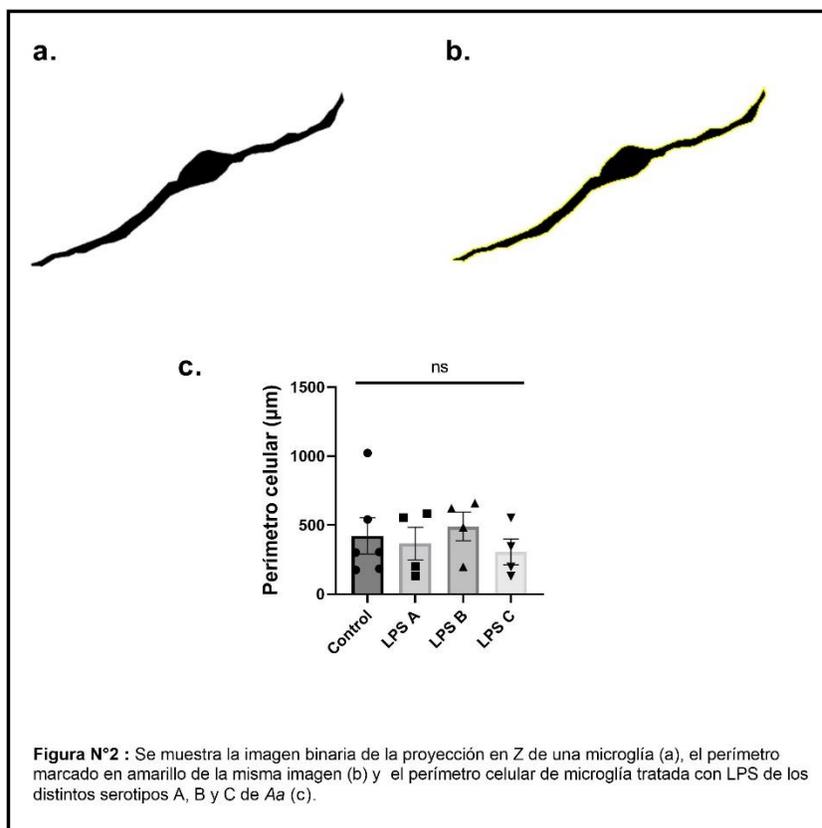
Perímetro celular:

Se midió el perímetro celular de cada astrocito (figura 1 a) basado en el contorno único de la forma celular como el número de píxeles expresado en micrones (lado de pixel = 0.115 μm) utilizando el software ImageJ, como indicado en la figura 1 b.



Tras 48 h de tratamiento con 50 ug/mL de LPS de los serotipos a, b y c de Aa (figura 1c) o, con 500 nM AβOs (figura 1 d) se realizó la cuantificación del perímetro celular en cada condición experimental. Como se observa en la figura 1c el perímetro celular de los astrocitos expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de Aa no sufrió cambios significativos respecto a su control ni entre estos mismos. Esto también se

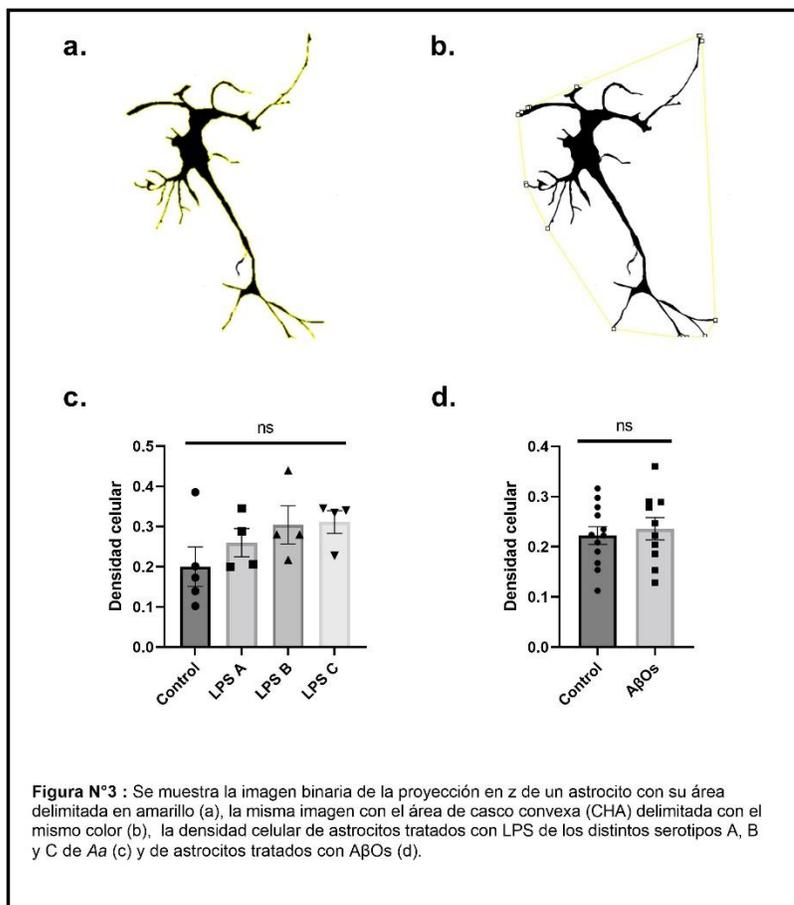
ve en la figura 1d donde los astrocitos expuestos a A β O_s tampoco tuvieron cambios significativos en este parámetro comparados con su control.



En la figura 2 a se observa la representación de una microglia marcada con Iba-1, y en la figura 2 b, se indica el perímetro en amarillo obtenido a través del software Image J. En la figura 2c se muestra la cuantificación del perímetro tras el tratamiento de la microglía con los diferentes serotipos de Aa. **L**No se observan cambios significativos en el perímetro de la microglía expuesta a LPS de los serotipos A, B ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.

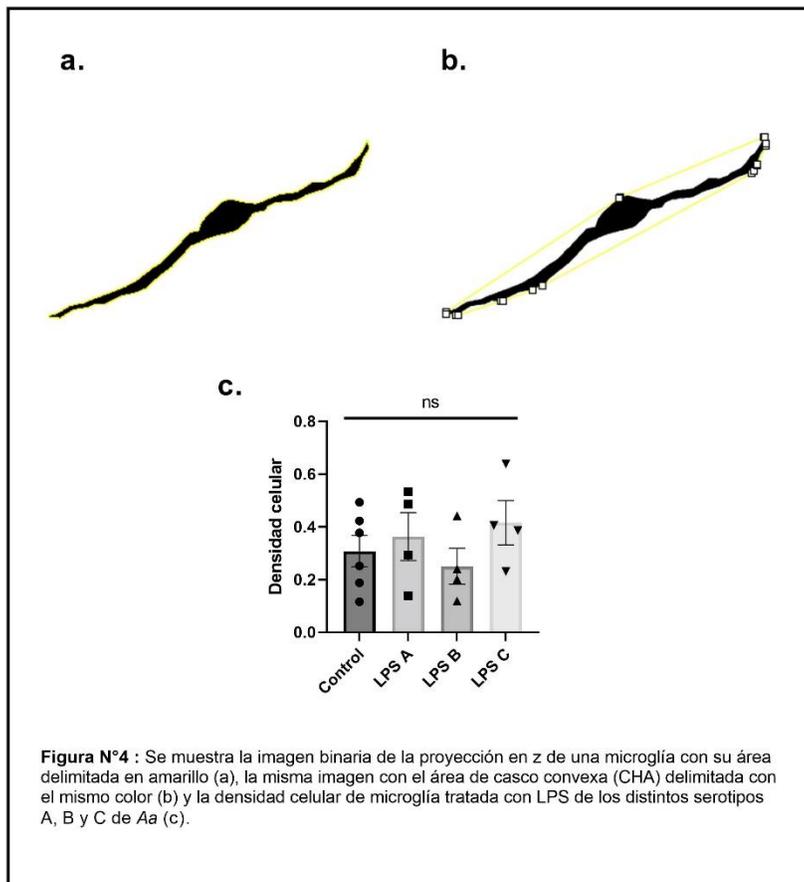
Densidad celular:

Se cuantificó el área celular como el número total de píxeles presentes en la forma llena de la imagen celular que luego se transformó a micrómetros cuadrados (área de pixel = 0.013 μm^2). Posteriormente se calculó el CHA, que corresponde al polígono convexo más pequeño (aquel con todos los ángulos interiores menores a 180°) conteniendo la forma celular completa. Finalmente se cuantificó la densidad celular dividiendo el área de la célula por su CHA.



En la figura 3a se muestra la representación binaria de un astrocito marcado con GFAP control y su perímetro en amarillo. En la figura 3b se observa el CHA para esta célula, obtenido a través del software image J. En la figura 3c, que muestra la cuantificación de la densidad celular luego del tratamiento con los diferentes serotipos de Aa. Se puede observar que la densidad celular de los astrocitos expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de Aa no sufrió cambios significativos respecto a su

control ni entre estos mismos. Esto también se ve en la figura 3d donde los astrocitos expuestos a AβOs tampoco tuvieron cambios significativos en este parámetro comparados con su control.

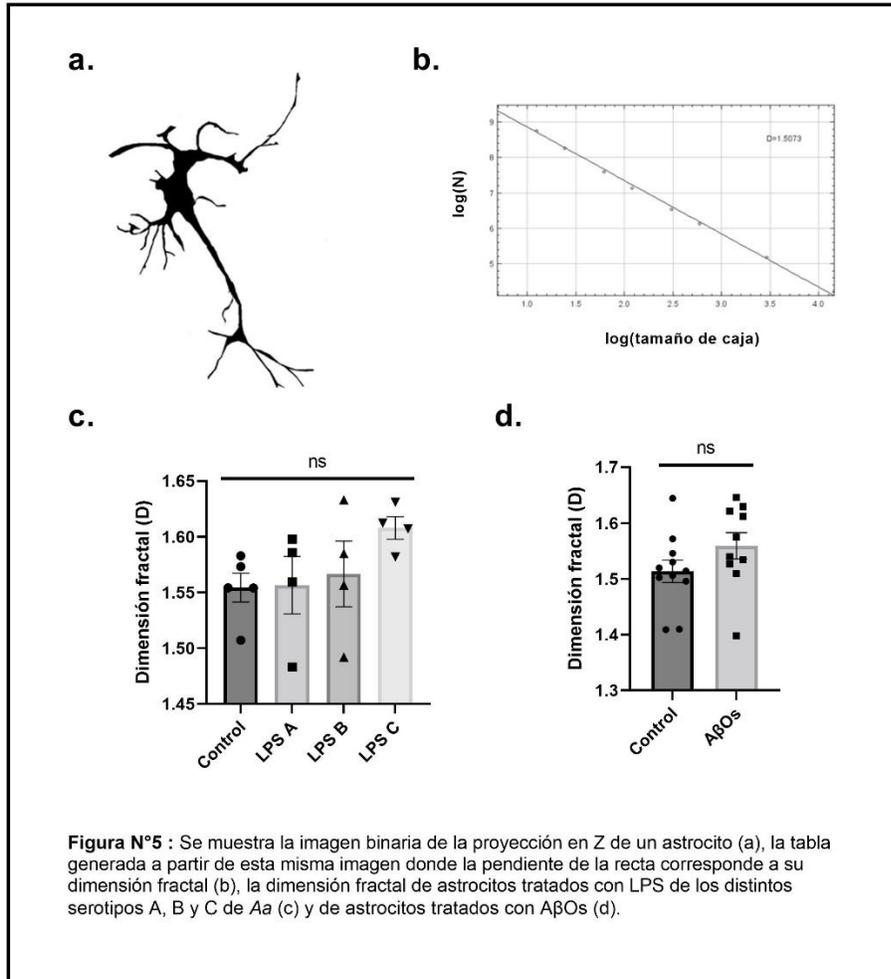


B ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.

En la figura 4a se observa la representación binaria de una microglía control marcada con Iba-1 y en la figura 4b, el CHA para la misma célula. En la figura 4c se muestra la cuantificación de la densidad celular luego del tratamiento de la microglía con el LPS de los diferentes serotipos de Aa. No se observan cambios significativos en la densidad celular de la microglía expuesta a LPS de los serotipos A,

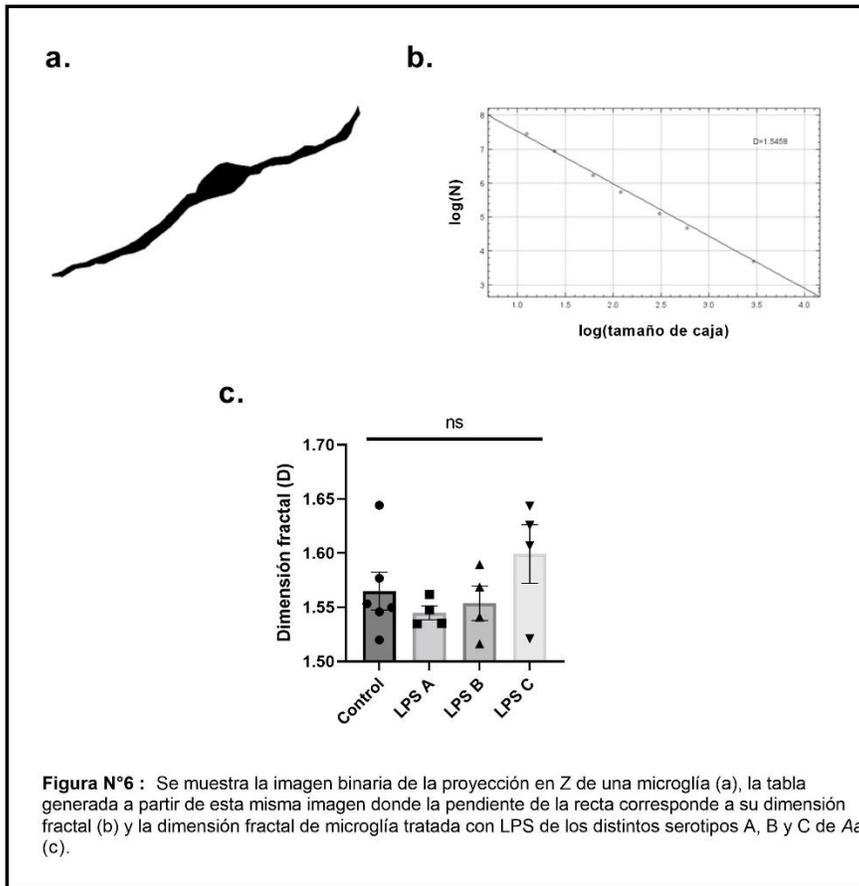
Dimensión fractal:

Se calculó la dimensión fractal con el software FracLac de Image J.



En la figura 5a se muestra una representación binaria de un astrocito control inmunomarcado con GFAP. Como se puede observar en la figura 5c, la cuantificación de la dimensión fractal de los astrocitos expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de Aa no sufrió cambios significativos respecto a su control ni entre estos mismos. En la figura 5d tampoco se observan cambios significativos para la dimensión fractal de los astrocitos expuestos a

los A β Os comparados con su control.



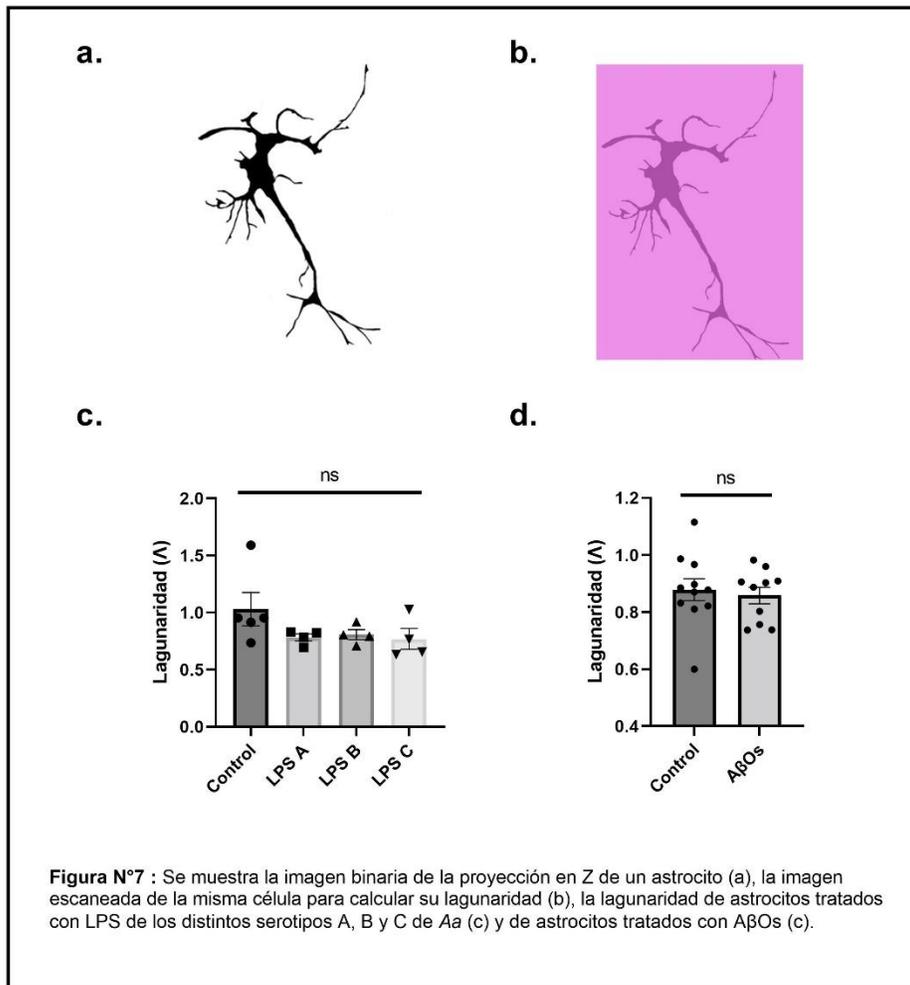
En la figura 6a se muestra una representación binaria de una microglía control inmunomarcada con Iba-1. En la figura 6c, que muestra la cuantificación de la dimensión fractal tras los tratamientos, se observa que no ocurren cambios significativos en la dimensión fractal de la microglía expuesta a LPS de los serotipos A, B ni C de Aa

respecto al control ni tampoco entre estos mismos.

Lagunaridad:

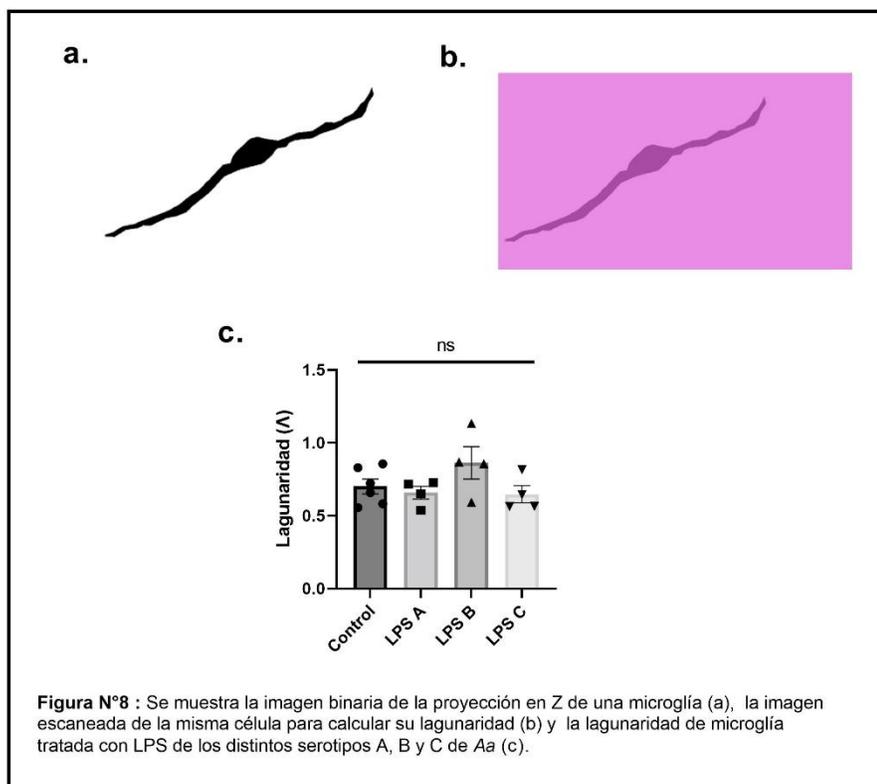
Se calculó la lagunaridad con el contador de cuadros del software FracLac, este es el coeficiente de variación expresado como densidad de pixel por cuadro como una función del tamaño del cuadro. Para evitar parcialidad en los resultados de Λ , el

promedio de distribución de masa por escala de series de potencia y también con 12 locaciones de cuadrícula se calcularon (Karperien y cols., 2015).



En la figura 7a se muestra una representación binaria de un astrocito control inmunomarcado con GFAP. Podemos observar en la cuantificación mostrada en la figura 7c que la lagunaridad de los astrocitos expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de Aa no sufrió cambios significativos

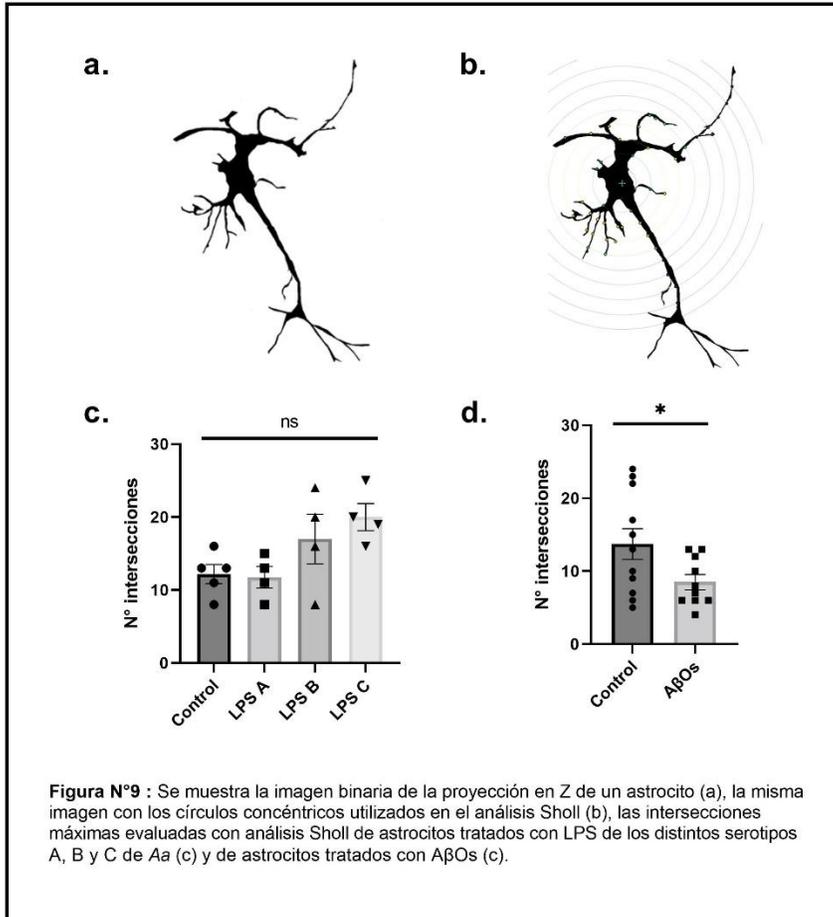
respecto a su control ni entre estos mismos. Esto también se ve en la figura 7d donde los astrocitos expuestos a AβOs tampoco sufrieron cambios significativos en este parámetro comparados con su control.



En la figura 8a se muestra una representación binaria de una microglía control inmunomarcada con Iba-1. La cuantificación mostrada en la figura 8c revela que no existen cambios significativos en la lagunaridad de la microglía

expuesta a LPS de los serotipos A, B ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.

Intersecciones máximas:

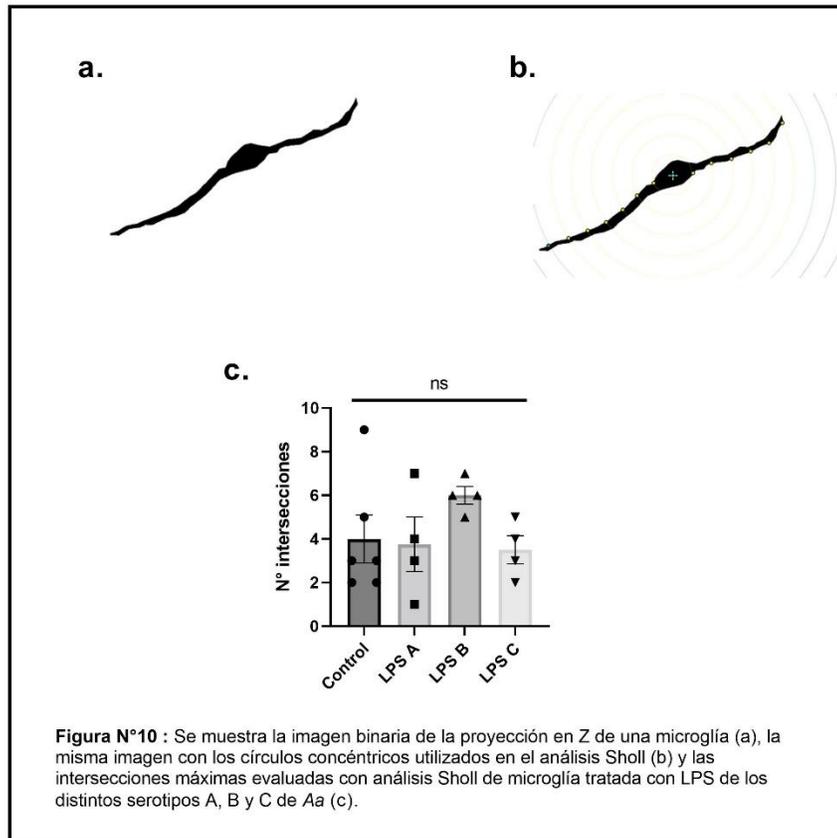


Con una adaptación del análisis Sholl para los astrocitos, se obtuvo la cantidad máxima de intersecciones para este tipo celular.

En la figura 9a se observa la representación binaria de un astrocito control marcado con GFAP, mientras que en la figura 9b se muestran los círculos concéntricos que se determinan durante el

análisis de Sholl para una célula como esta. En la figura 9c se puede observar la cuantificación de las intersecciones máximas de los astrocitos expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de Aa. Esta figura muestra que los astrocitos no sufrieron cambios significativos respecto a su control ni entre estos mismos. Sin embargo, observamos que sí ocurre una disminución significativa de las intersecciones máximas de los astrocitos expuestos a AβOs comparados con su control (figura 9d).

En la figura 10a se observa la representación binaria de una microglía control marcada con Iba-1, y en la figura 10 b se muestran los círculos concéntricos que se

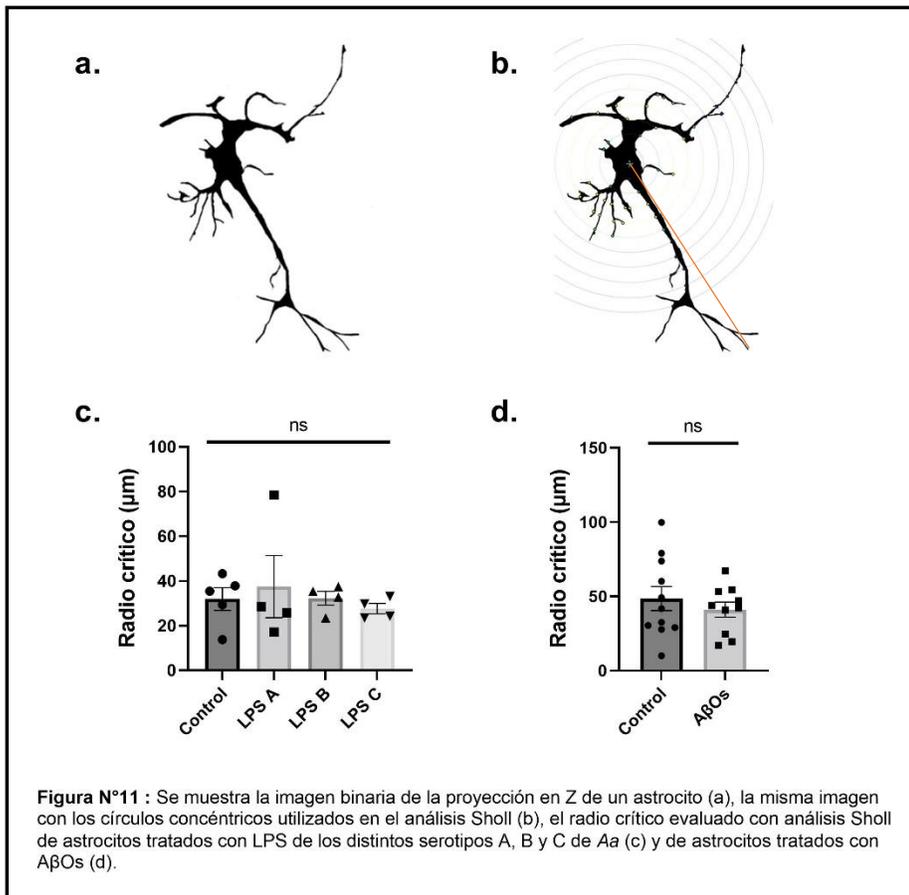


determinaron durante el análisis de Sholl para una célula como esta. En la figura 10c se puede observar la cuantificación de las intersecciones máximas de las microglías expuestas al LPS de los diferentes serotipos de Aa. Los resultados indican que no ocurren cambios

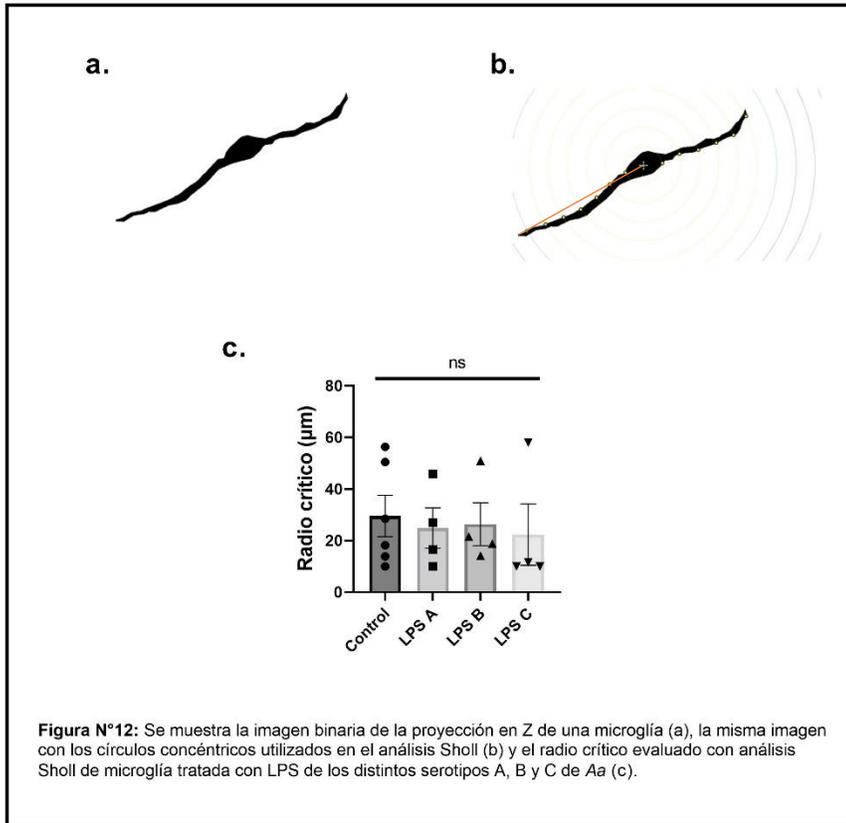
significativos en las intersecciones máximas de la microglía expuesta a LPS de los serotipos A, B ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.

Radio crítico:

Se calculó el radio crítico de las células. Este concepto se refiere a la distancia de la prolongación celular más larga. Para esto se realizó el análisis Sholl con el software Image J. La figura 11a muestra la representación binaria de un astrocito control inmunomarcado con GFAP. En la figura 11 b se muestran los círculos concéntricos que se establecen para este tipo celular con el análisis de Sholl y se ejemplifica el radio crítico con una línea roja. La figura 11c muestra que el radio crítico de los astrocitos expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de *Aa* no sufrió cambios significativos respecto a su control ni entre estos mismos. Esto también se ve en la figura 11d, en la cual los astrocitos expuestos a A β O_s tampoco tuvieron cambios significativos en este parámetro comparados con su control.



En la figura 12a se observa la representación binaria de una microglía control marcada con Iba-1, y en la figura 12b se muestran los círculos concéntricos que se determinaron durante el análisis de Sholl para una célula como esta, marcando en rojo su radio crítico evaluado.



En la figura 12c se puede observar la cuantificación de las intersecciones máximas de las microglías expuestas al LPS de los diferentes serotipos de Aa.

En la figura 12c se observa que no hay diferencias significativas en el radio crítico de la

microglía expuesta a LPS de los serotipos A, B, ni C de Aa respecto al control ni tampoco entre estos mismos.

Discusión:

Para poder comprender los factores de riesgo y causas de la EA se han realizado estudios de genoma completo de la EA que han descubierto que diversas variaciones de alelos en lugares específicos están asociadas con un aumento o una disminución del riesgo del inicio tardío de la EA (Villegas-Llerena et al., 2016). La mayoría de estos genes identificados en los lugares de riesgo están muy implicados en las funciones del sistema inmune y de la microglía (Harold et al., 2009).

Es conocido que la morfología y función de la microglía están estrechamente relacionadas con los cambios que se producen durante eventos neuroinflamatorios.

Estas células son fagocitos del cerebro cuya activación crónica de TLR2 y TLR4 lleva a una respuesta secretora y a una diferenciación fenotípica proinflamatoria conocida como M1 (Block and Hong, 2005). Por otro lado, en respuesta a una inflamación cerebral aguda se activa el fenotipo inmunoregulador de la microglía conocido como M2 (Block y Hong, 2005). Así, un aumento de citoquinas proinflamatorias y la respuesta de la microglía inducen un ambiente de inflamación crónica en el cerebro que desencadena la generación y acumulación de péptido A β (Fang et al. 2016), lo que se considera tiene un rol fundamental en la patogénesis de la EA (Ferreira et ali, 2015; Paula-Lima 2013).

Bajo condiciones fisiológicas la microglía está en un estado de “vigilancia” en el cual adquieren un fenotipo con una morfología ramificada (Mecca, 2018). Bajo una injuria aguda, adquieren un estado “activado” y experimentan un cambio fenotípico a una morfología amebode; producen una liberación diferente de moléculas inflamatorias, tales como citoquinas (IL-1 β , TNF- α) o especies oxidantes como óxido nítrico (NO), el cual puede ser tóxico, pero también se requiere para combatir la injuria (Hickman y cols., 2018). Sin embargo, con el envejecimiento, las células de la microglía experimentan un cambio en su fenotipo a un estado activado constante, conocido como microglía “cebada”, creando un círculo de retroalimentación y promoción de la atrofia del tejido, neurotoxicidad y deterioro cognitivo (Mecca, 2018; Norden y cols., 2016; Valles y cols., 2019).

En relación a esta neuroinflamación, se ha descrito en la literatura una disminución en el valor de la dimensión fractal, lagunaridad y perímetro junto a un aumento en el valor de la densidad celular de la microglía de cerebros de ratas expuestos a una neuroinflamación aséptica generada por inyección intracerebral de neuraminidasa (Fernández-Arjona y cols., 2017). Los resultados del presente estudio, sin embargo, no han mostrado diferencias significativas para estos mismos parámetros en cultivos primarios de astrocitos y microglía tratados con diferentes serotipos de Aa y sólo en las intersecciones máximas evaluadas a través del análisis de Sholl fue posible detectar diferencias significativas en los astrocitos tratados con A β O $_2$ en comparación con los controles.

En una investigación realizada anteriormente en nuestro laboratorio para determinar si las células cerebrales son capaces de reconocer los distintos serotipos de Aa, se midió la secreción de mediadores proinflamatorios, la acumulación extracelular de A β 1-42 y la morfología celular. Para ello se trataron cultivos mixtos hipocampales de ratas Sprague–Dawley con LPS A, B y C de Aa y se observó un aumento de la expresión de mRNA de IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α en células tratadas con LPS del serotipo B comparadas con los controles no inducidos y con aquellas células tratadas con LPS de serotipos A y C. Cuando las células se expusieron al serotipo A, se detectó un incremento de los niveles de expresión de IL-4 e IL-10 al compararlos con los controles y con las células tratadas con serotipos B o C. Además, se observaron niveles de expresión de mRNA TLR2 más altos en microglía tratada con LPS de serotipos A o B comparados con los controles no inducidos. También se detectaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de TLR 2 cuando las células se expusieron a LPS del serotipo B comparadas con las expuestas al LPS de serotipos A o C. Por el contrario, niveles de expresión más altos fueron detectados para mRNA de TLR4 cuando las células se expusieron a todos los serotipos comparados con los controles no inducidos. Una diferencia significativa fue detectada en los niveles de mRNA de TLR4 de células tratadas con LPS de serotipo a comparadas con las tratadas con el serotipo c (Díaz-Zúñiga et al., 2019). Todo esto nos hacía pensar que encontraríamos diferencias fenotípicas significativas expresadas en la morfología de las células de los cultivos primarios evaluados similares a las reportadas anteriormente en ambientes con gran cantidad

de citoquinas proinflamatorias e inmunoregulatoras. Sin embargo, al menos con las técnicas utilizadas para analizar la morfología de los astrocitos y microglía utilizados en el presente estudio, no encontramos diferencias significativas en la morfología de microglía ni de astrocitos tratados con los LPS de serotipos A, B ni C de Aa.

Los datos sugieren, por lo tanto, que a pesar de la respuesta diferencial que las células de la glía tienen en relación al patrón de citoquinas liberado en respuesta a los LPS oriundos de diferentes serotipos de Aa, no se reflejan cambios morfológicos significativos tras estos estímulos. Sin embargo, considerando que las técnicas de análisis de la morfología glial no son tan desarrolladas como las utilizadas para determinar la morfología neuronal, es posible también discutir que necesitamos emplear metodologías alternativas de determinación de la morfología glial, incluyendo análisis en tres dimensiones (3D) y otros marcadores celulares que pudiesen entregar información más detallada acerca de la morfología de estas células y que respondan más sensiblemente a eventuales cambios que estas puedan sufrir en respuesta a estímulos. De lo anterior, destacamos que en una tesis realizada en nuestro laboratorio se observaron cambios significativos al realizar el análisis en 3 D Skeleton de Image J de astrocitos expuestos con otro periodontopatógeno involucrado en la periodontitis, la *Porphyromonas gingivalis* (Moscoso, V y cols, 2021). Cabe resaltar que en dicha tesis, se observaron los cambios morfológicos, realizando el análisis 3D skeleton en el tejido hipocampal de las ratas modelo de periodontitis experimental. Los análisis expuestos en la presente investigación trabajo, en cambio, fueron llevados a cabo en imágenes de 2D en cultivos primarios tratados *in vitro*, por lo que no podemos descartar que ciertas variaciones morfológicas en las células podrían no haber sido percibidas con el método aquí utilizado, requiriendo indagar más profundamente en la investigación.

Como otra posible explicación para no haber notado diferencias significativas en la morfología de los astrocitos, es interesante notar que la proteína GFAP marca solo las ramificaciones principales de los astrocitos, y que las más pequeñas no son reactivas a esta proteína. Se reconoce que estas últimas tienen mayor cantidad de mitocondrias con respecto a las otras ramificaciones, de modo que el metabolismo

oxidativo es parte importante para el metabolismo energético de los astrocitos (Matyash y Kettenmann, 2010) y, por lo tanto, eventualmente éstas podrían estar sufriendo cambios que no estaríamos pudiendo detectar con la técnica de marcaje utilizada. Asimismo, los parámetros utilizados en esta tesis con base en un trabajo realizado en cortes de tejido y no en cultivos celulares (Fernández-Arjona y cols., 2017), es decir, la dimensión fractal, la lagunaridad, el área, el área del casco convexo, la densidad y el perímetro, pueden no ser adecuadas para medir cambios morfológicos tras estimulación con el LPS de Aa. Esta hipótesis gana fuerza cuando se analizan los resultados obtenidos con las células estimuladas con A β Os, que tampoco muestran cambios morfológicos significativos, aunque los efectos de los A β Os ya hayan sido reportados en estas células (Hickman y cols., 2018).

Otro factor a considerar es que el número de células que pudimos evaluar en este trabajo no fue tan alto, pero a pesar de ello se puede ver cierta tendencia en algunos parámetros por lo que creemos que sería de gran utilidad aumentar la cantidad de células analizadas y así probar si se pueden encontrar cambios fenotípicos significativos.

Por lo tanto, considerando las limitaciones de las técnicas utilizadas, rechazamos la hipótesis planteada inicialmente en esta tesis, sin desconocer que es necesario seguir probando técnicas que nos permitan distinguir variaciones morfológicas más sutiles de la microglía y astrocitos y así poder evaluar con más detalle los posibles cambios morfológicos de estas células en respuesta a diversos estímulos bacterianos y agregados proteicos tóxicos como son los A β Os.

Conclusiones:

- 1.- No se observan cambios estadísticamente significativos en las intersecciones máximas y radio crítico evaluados mediante análisis Sholl ni en los parámetros morfológicos dimensión fractal, lagunaridad, densidad celular y perímetro de microglía y astrocitos en cultivos primarios de hipocampo de rata expuestos a LPS de los serotipos A, B y C de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- 2.- No se observan cambios estadísticamente significativos en el radio crítico evaluado mediante análisis Sholl ni en los parámetros morfológicos dimensión fractal, lagunaridad, densidad celular y perímetro de astrocitos en cultivos primarios de hipocampo de rata expuestos a A β Os.
- 3.- Existe una disminución significativa en el número de intersecciones máximas evaluadas mediante análisis Sholl de astrocitos en cultivos primarios de hipocampo de rata expuestos a A β Os.

Referencias bibliográficas:

1. Al-Qutub, M. N., Braham, P. H., Karimi-Naser, L. M., Liu, X., Genco, C. A., & Darveau, R. P. (2006). Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, *74*(8), 4474–4485. <https://doi.org/10.1128/IAI.01924-05>
2. Aragón, F., Zea-Sevilla, M. A., Montero, J., Sancho, P., Corral, R., Tejedor, C., Frades-Payo, B., Paredes-Gallardo, V., & Albaladejo, A. (2018). Oral health in Alzheimer's disease: a multicenter case-control study. *Clinical Oral Investigations*, *22*(9), 3061–3070. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2396-z>
3. Association, A. (2015). Alzheimer's Association Report 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, *11*(3), 332–384. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.02.003>
4. Barker, W. W., Luis, C. A., Kashuba, A., Luis, M., Harwood, D. G., Loewenstein, D., Waters, C., Jimison, P., Shepherd, E., Sevush, S., Graff-radford, N., Newland, D., Todd, M., Miller, B., Gold, M., Heilman, K., Doty, L., Goodman, I., Robinson, B., ... Duara, R. (2002). Relative Frequencies of Alzheimer Disease, Lewy Body, Vascular and Frontotemporal Dementia, and Hippocampal Sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, *16*(4), 203–212.
5. Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K. T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, *89*(February), S313–S318. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739>
6. Bolte, E. R. (1998). Autism and clostridium tetani. *Medical Hypotheses*, *51*(2), 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90107-4](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90107-4)

7. Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89(March), 1–8. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.18.2749>
8. Cestari, J. A. F., Fabri, G. M. C., Kalil, J., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., De Siqueira, J. T. T., & Siqueira, S. R. D. T. (2016). Oral Infections and Cytokine Levels in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Controls. *Journal of Alzheimer's Disease*, 52(4), 1479–1485. <https://doi.org/10.3233/JAD-160212>
9. Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(December 2017), S74–S84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>
10. Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St. John, J. A., Ekberg, J. A. K., Batzloff, M., Ulett, G. C., & Beacham, I. R. (2014). Pathogens penetrating the central nervous system: Infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 691–726. <https://doi.org/10.1128/CMR.00118-13>
11. Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., Ciuchi, P., Díaz, C., Mardones, J., Escobar, A., Sanz, M., & Vernal, R. (2015). T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *Journal of Periodontal Research*, 50(6), 824–835. <https://doi.org/10.1111/jre.12270>

12. Díaz-Zúñiga, J., Muñoz, Y., Melgar-Rodríguez, S., More, J., Bruna, B., Lobos, P., Monasterio, G., Vernal, R., & 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), 1–11. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1586423>
13. Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M., Sanz, M., & Vernal, R. (2014). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology*, *41*(3), 242–251. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12205>
14. 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 and Ageing*, *15*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0110-7>
15. Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(August), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>
16. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(MAY), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>
17. Heller, J. P., & Rusakov, D. A. (2015). Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment. *Glia*, *63*(12), 2133–2151. <https://doi.org/10.1002/glia.22821>
18. Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A.,

- Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
19. Herbert, B. A., Novince, C. M., & Kirkwood, K. L. (2016). Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Molecular Oral Microbiology*, *31*(3), 207–227. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.18.2749>.
20. Holmer, J., Eriksson, M., Schultzberg, M., Pussinen, P. J., & Buhlin, K. (2018). Association between periodontitis and risk of Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and subjective cognitive decline: A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*, *45*(11), 1287–1298. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13016>
21. Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E., Le, K., Aljewari, H. W., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C., & Watanabe, K. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS ONE*, *13*(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>
22. Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y., Hagiwara, M., Ferdous, T., Abdullah, M., Mitani, A., Michikawa, M., & Matsushita, K. (2017). Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, *3*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.18.2749>
23. Karperien, A. L., & Jelinek, H. F. (2015). Fractal, multifractal, and lacunarity analysis of microglia in tissue engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *3*, 51. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00051>
24. Karperien, A., H. Ahammer, and H. F. Jelinek (2013). Quantitating the Subtleties of Microglial Morphology with Fractal Analysis". *Frontiers in cellular neuroscience*. **7**:3.

25. Kristensson, K. (2011). Microbes' roadmap to neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(6), 345–357. <https://doi.org/10.1038/nrn3029>
26. LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends in Molecular Medicine*, 11(4), 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.009>
27. Langhammer, C. G., Previtara, M. L., Sweet, E. S., Sran, S. S., Chen, M., & Firestein, B. L. (2010). Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales: Whole-cell Sholl analysis vs. Sholl analysis of arbor sub-regions. *Journal of Quantitative Cell Science*, 77(12), 1160–1168. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
28. Li, K-Y., Gong, P-F., Li, J-T., Xu, N-J., Q. Song. (2020) Morphological and molecular alterations of reactive astrocytes without proliferation in cerebral cortex of an APP/PS1 transgenic mouse model and Alzheimer's patients. *Glia*, 68, 2361–2376. <https://doi.org/10.1002/glia.23845>
29. Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Sasser, H. C., Fox, P. C., Paster, B. J., & Bahrani-Mougeot, F. K. (2008). Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 117(24), 3118–3125. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758524>
30. Malik, R., Changela, R., Krishan, P., Gugnani, S., & Bali, D. (2015). Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A status update. *Journal of the International Clinical Dental Research Organization*, 7(2), 137–145. <https://doi.org/10.4103/2231-0754.164390>
31. Martande, S. S., Pradeep, A. R., Singh, S. P., Kumari, M., Suke, D. K., Raju, A. P., Naik, S. B., Singh, P., Guruprasad, C. N., & Chatterji, A. (2014). Periodontal health condition in patients with Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 29(6), 498–502. <https://doi.org/10.1177/1533317514549650>

32. Monasterio, G., Castillo, F., Ibarra, J. P., Guevara, J., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, B., Agüero, A., Betancur, D., & Vernal, R. (2018). Alveolar bone resorption and TH1/TH17-associated immune response triggered during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis are serotype-dependent. *Journal of Periodontology*, *89*(10), 1249–1261. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0563>
33. 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>
34. Noble, J. M., Borrell, L. N., Papapanou, P. N., Elkind, M. S. V., Scarmeas, N., & Wright, C. B. (2009). Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: Analysis of NHANES-III. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *80*(11), 1206–1211. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.174029>
35. Oscarsson, J., Claesson, R., Lindholm, M., Höglund Åberg, C., & Johansson, A. (2019). Tools of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to Evade the Host Response. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/jcm8071079>
36. Paula-Lima, A. C., Adasme, T., Sanmartín, C., Sebollela, A., Hetz, C., Carrasco, M. A., Ferreira, S. T., & Hidalgo, C. (2011). Amyloid β -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca^{2+} release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(7), 1209–1223. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3287>
37. Paula-Lima, A. C., Brito-Moreira, J., & Ferreira, S. T. (2013). Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *126*(2), 191–202. <https://doi.org/10.1111/jnc.12304>

38. Paula-Lima, A. C., De Felice, F. G., Brito-Moreira, J., & Ferreira, S. T. (2005). Activation of GABAA receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of β -amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, *49*(8), 1140–1148. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.06.015>
39. Plata, A., Lebedeva, A., Denisov, P., Nosova, O., Postnikova, T. Y., Pimashkin, A., Brazhe, A., Zaitsev, A. V., Rusakov, D. A., & Semyanov, A. (2018). Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(June), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00215>
40. Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., Kesavalu, L., & Crean, S. (2014). Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brains. *Journal of Alzheimer's Disease*, *43*(1), 67–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-140315>
41. Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A., & Crean, S. J. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease*, *36*(4), 665–677. <https://doi.org/10.3233/JAD-121918>
42. Pritchard, A. B., Crean, S. J., Olsen, I., & Singhrao, S. K. (2017). Periodontitis, microbiomes and their role in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00336>
43. 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>
44. Rojas, L., Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Monasterio, G., Rojas, C., Carvajal, P., & Vernal, R. (2018). Serotype a of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* down-regulates the increased serotype b-induced cytokine and chemokine production in dendritic cells. *Archives of Oral Biology*,

93(September 2017), 155–162.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.06.010>

45. Román-Malo, L., & Bullon, P. (2017). Influence of the periodontal disease, the most prevalent inflammatory event, in peroxisome proliferator-activated receptors linking nutrition and energy metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1438. <https://doi.org/10.3390/ijms18071438>
46. Slots, J., & Ting, M. (1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: Occurrence and treatment. *Periodontology 2000*, 20(1), 82–121. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00159.x>
47. Sojkova, J., & Resnick, S. (2011). In Vivo Human Amyloid Imaging. *Current Alzheimer Research*, 8(4), 366–372. <https://doi.org/10.2174/1567211212225932050>
48. Sosulina, L., Mittag, M., Geis, H.-R., Hoffmann, K., Klyubin, I., Qi, Y., Steffen, J., Friedrichs, D., Henneberg, N., Fuhrmann, F., Justus, D., Keppler, K., Cuello, A. C., Rowan, M., Fuhrmann, M., & Remy, S. (2020). Hippocampal hyperactivity in a rat model of Alzheimer's disease. *BioRxiv Neuroscience*, 2020.06.09.141598. <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.141598>
49. Sparks Stein, P., Steffen, M. J., Smith, C., Jicha, G., Ebersole, J. L., Abner, E., & Dawson, D. (2012). Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 8(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.04.006>
50. Sparks, P., Desrosiers, M., Donegan, S. J., Yepes, J. F., & Kryscio, R. J. (2007). Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun Study ABSTRACT. *Journal of American Dental Association*, 138(10), 1314–1322.
51. Stanko, J. P., Easterling, M. R., & Fenton, S. E. (2015). Application of Sholl Analysis to Quantify Changes in Growth and Development in Rat Mammary

- Gland Whole Mounts. *Reproductive Toxicology*, 54(0), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
52. Tanzi, R. E., & Bertram, L. (2001). New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron*, 32(2), 181–184. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00476-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00476-7)
53. Taylor, G. W., & Borgnakke, W. S. (2008). Periodontal disease: Associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Diseases*, 14(3), 191–203. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.18.2749>
54. Teixeira, F. B., Saito, M. T., Matheus, F. C., Prediger, R. D., Yamada, E. S., Maia, C. S. F., & Lima, R. R. (2017). Periodontitis and alzheimer's disease: A possible comorbidity between oral chronic inflammatory condition and neuroinflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00327>
55. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89(February), S159–S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
56. Tsai, C.-M., & Frasch, C. E. (1982). A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 119(1), 115–119. https://ac.els-cdn.com/000326978290673X/1-s2.0-000326978290673X-main.pdf?_tid=bf086faa-13e2-4036-a390-82b83207b4a1&acdnat=1548773814_ffae24506c70807a1b7185ec355a3d5a
57. Tse, K.-H., & Herrup, K. (2017). Re-imagining Alzheimer's disease – the diminishing importance of amyloid and a glimpse of what lies ahead. *Journal of Neurochemistry*, 143(4), 432–444. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
58. Wu, T., Trevisan, M., Genco, R. J., Dorn, J. P., Falkner, K. L., & Sempos, C. T. (2000). Periodontal Disease and Risk of Cerebrovascular Disease. *Archives of*

Internal Medicine, 160(18), 2749–2755.
<https://doi.org/10.1001/archinte.160.18.2749>

59. Wu, Z., & Nakanishi, H. (2014). Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: Possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 126(1), 8–13.
<https://doi.org/10.1254/jphs.14R11CP>
60. Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F., Collicutt, A., Ibbett, P., & 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>
61. Zhang, J., Yu, C., Zhang, X., Chen, H., Dong, J., Lu, W., Song, Z., & Zhou, W. (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(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12974-017-1052-x>
62. Villegas-Llerena, C., Phillips, A., Garcia-Reitboeck, P., Hardy, J., & Pocock, J. M. (2016). Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Current opinion in neurobiology*, 36, 74–81.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.10.004>
63. Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(10), 1088–1093.
<https://doi.org/10.1038/ng.440>

64. Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology*, *76*(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
65. Fang, Y., Yao, L., Li, C., Wang, J., Wang, J., Chen, S., Zhou, X. F., & Liao, H. (2016). The blockage of the Nogo/NgR signal pathway in microglia alleviates the formation of A β plaques and tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of neuroinflammation*, *13*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0522-x>
66. Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews*, *63*(1-2), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>
67. Díaz-Zúñiga, J., More, J., Melgar-Rodríguez, S., Jiménez-Unión, M., Villalobos-Orchard, F., Muñoz-Manríquez, C., Monasterio, G., Valdés, J. L., Vernal, R., & Paula-Lima, A. (2020). Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Frontiers in immunology*, *11*, 588036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588036>
68. Mecca, C., Giambanco, I., Donato, R., & Arcuri, C. (2018). Microglia and Aging: The Role of the TREM2-DAP12 and CX3CL1-CX3CR1 Axes. *International journal of molecular sciences*, *19*(1), 318. <https://doi.org/10.3390/ijms19010318>
69. Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature neuroscience*, *21*(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
70. Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Walker, F. R., & Godbout, J. P. (2016). Insensitivity of astrocytes to interleukin 10 signaling following peripheral immune challenge results in prolonged microglial activation in the aged brain. *Neurobiology of aging*, *44*, 22–41. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.04.014>

71. Valles, S. L., Iradi, A., Aldasoro, M., Vila, J. M., Aldasoro, C., de la Torre, J., Campos-Campos, J., & Jorda, A. (2019). Function of Glia in Aging and the Brain Diseases. *International journal of medical sciences*, 16(11), 1473–1479. <https://doi.org/10.7150/ijms.37769>
72. Moscoso, V. (2021) *Cambios morfológicos en astrocitos producidos por la periodontitis experimental inducida por Porphyromonas gingivalis en ratas* [Tesis de pregrado, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile]. Repositorio académico – Universidad de Chile.

