



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGIA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

**EFFECTO DE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL EN EL DESARROLLO DE
PAN-INFLAMACIÓN CEREBRAL**

Diego Ignacio Valdés Fernández

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociado Dr. Jaime Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asociada Dra. Andrea Paula-Lima

Prof. Asistente Samanta Melgar Rodríguez

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2020-2023.

Santiago – Chile

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

**EFECTO DE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL EN EL DESARROLLO DE
PAN-INFLAMACIÓN CEREBRAL**

Diego Ignacio Valdés Fernández

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociado Dr. Jaime Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asociada Dra. Andrea Paula-Lima

Prof. Asistente Samanta Melgar Rodríguez

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2020-2023.

Santiago – Chile

2022

Le dedico este trabajo a C. E. V. A. con quien me hubiese gustado compartir un poco más de tiempo...

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento al profesor Jaime Diaz-Zúñiga, con quien tuve la suerte de cruzarme en su camino y me permitiera trabajar en este hermoso proyecto científico, de una inteligencia y capacidad analítica, solamente superada por su calidad humana.

A mí Madre y hermanos por su incondicional apoyo, a la gran familia Sánchez Álvarez por todo su apoyo y cariño todos estos años.

A mí hermano de otra madre Héctor Díaz Leiva con quien iniciamos juntos la aventura de creer en uno mismo.

A todos mis amigos quienes me han acompañado durante mi vida, son la razón de mí alegría y el bálsamo en los momentos menos felices.

Por último, toda mi gratitud a mi compañera de vida Natita, sin su apoyo no hubiese llegado tan lejos...

PRODUCTIVIDAD

IADR Chile - XXXIV Reunión Anual 2022. Santiago, Chile: *“The experimental periodontitis triggers brain pan-inflammation”*. Valdés D, Melgar-Rodríguez S, Paula-Lima A, Díaz-Zúñiga J. Presentación Oral.

2022 IADR Divisional Hatton Award, Categoría Junior Ciencia Básica: *“The experimental periodontitis triggers brain pan-inflammation”*.
IADR Chile - XXXIV Reunión Anual 2022.

2023 IADR/LAR General Session & Exhibition with WCPD. Bogotá, Colombia: *“The experimental periodontitis triggers brain pan-inflammation”*. Valdés D, Melgar-Rodríguez S, Paula-Lima A, Díaz-Zúñiga J. Interactive Talk and Hatton competition.

ÍNDICE

1. Resumen.....	8
2. Marco teórico.....	10
2.1. Periodontitis.....	10
2.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
2.3. Polisacáridos Capsulares.....	11
2.4. Neuroinflamación.....	13
2.5. Planteamiento del problema científico.....	14
3. Hipótesis y Objetivos.....	15
3.1. Hipótesis.....	15
3.2. Objetivo general.....	15
3.3. Objetivos específicos.....	15
4. Metodología.....	16
4.1. Cultivo bacteriano y curva de crecimiento bacteriano.....	16
4.2. Modelo de infección periodontal.....	16
4.3. Obtención de muestras.....	17
4.4. Cuantificación de resorción ósea en modelos experimentales.....	17
4.5. Detección de moléculas mediante ELISA.....	18
4.6. Análisis de los datos.....	18
5. Resultados.....	19
5.1. Niveles de secreción de citoquinas proinflamatorias en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo.....	19
5.2. Niveles de secreción de citoquinas moduladoras en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo.....	21
6. Discusión.....	22

7. Conclusiones27

8. Antecedentes Bibliográficos.....28

9. Anexos.....34

 ANEXO 1:
 Certificado Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la
 Universidad de Chile.....34

 ANEXO 2:
 Cuantificación de reabsorción ósea en modelo de periodontitis experimental
 35

1. RESUMEN

Introducción: La respuesta inflamatoria producida por bacterias patógenas en individuos afectados por periodontitis podría ser un factor predisponente para la neuroinflamación. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es patógeno clave asociado a inicio y progresión de la periodontitis, y sus antígenos capsulares determinan los distintos serotipos bacterianos. Mientras que los serotipos K1 y K2 inducen una respuesta pro-inflamatoria asociado a las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , los serotipos K3 a K6 se asocian con IL-4, vinculándose con una respuesta moduladora y la cepa no encapsulada K⁻ con una respuesta reguladora, asociado a IL-10. Por su parte, la enfermedad neuroinflamatoria se produce por la presencia crónica de mediadores pro-inflamatorios producidos por una enfermedad inflamatoria crónica afectando la homeodinamia cerebral. Este estudio pretende determinar la presencia de citoquinas pro-inflamatorias a nivel cerebral en ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis experimental.

Metodología: En ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad se indujo periodontitis experimental mediante la inoculación en mucosa palatina del serotipo K1 de *P. gingivalis*. Como control, negativo se utilizaron ratas inyectadas con medio de cultivo bacteriano sin bacterias (*sham*). Luego de 55 días, las ratas se eutanasiaron y se obtuvieron las muestras biológicas de hipocampo, cerebelo, corteza y mesencéfalo. Finalmente, se cuantificaron los niveles de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 y TNF- α mediante ELISA.

Resultados: En las ratas afectadas por periodontitis se detectaron concentraciones significativamente mayores de IL-1 β y de IL-6 en el hipocampo, en comparación con el grupo *sham*. A su vez, se detectaron concentraciones significativamente bajas de IL-4 en el grupo de ratas con periodontitis experimental en comparación con el grupo control en el hipocampo. No se detectaron diferencias para los demás mediadores en los otros tejidos cerebrales.

Conclusiones: luego de 55 días la periodontitis experimental induce un aumento de mediadores pro-inflamatorios a nivel hipocampal y no en los demás tejidos cerebrales.

1. MARCO TEÓRICO

2.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible muy común en la población humana (Singh et al., 2015). Se origina por una disbiosis en la microbiota subgingival que induce una inflamación y destrucción de los tejidos de soporte del diente: ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (Singh et al., 2015; Papapanou et al., 2018, Caton et al., 2018). La destrucción de los tejidos periodontales es la manifestación principal de la periodontitis y, sin tratamiento, puede llevar a la pérdida de los dientes (Hernández et al., 2011). Cuando la periodontitis está establecida desencadena una respuesta inmune por parte de células del hospedero, tales como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) (Garlet et al., 2007; Hernández et al., 2011; Silva et al., 2015). Estas células pueden secretar citoquinas, quimioquinas, metaloproteinasas de matriz (del inglés *matrix metalloproteinases*, MMPs), factores de crecimiento y factores pro-resortivos en respuesta a ciertas bacterias que residen en la microbiota subgingival (D'Empaire et al., 2006; Díaz-Zúñiga et al., 2014, 2015; Laine et al., 1996; Soto et al., 2016; Vernal, Diaz-Guerra, et al., 2014; Vernal et al., 2009a). Entre las bacterias asociadas a la causa de la periodontitis, se encuentra *Porphyromonas gingivalis*, que se asocia tanto con el inicio y progresión de la periodontitis, como a efectos no deseados en otros tejidos u órganos.

2.2 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis es una bacteria Gram-negativo, anaerobia estricta, capnofílica, asacarolítica y es considerada un patógeno clave (*keystone pathogen*) de la periodontitis (Hajishengallis et al., 2012). *P. gingivalis* forma parte de la microbiota oral y, en condiciones disbióticas, puede invadir al hospedero, inducir una respuesta inmuno-inflamatoria local y destruir los tejidos periodontales. Además, puede ingresar a la circulación periférica e inducir la aterogénesis aórtica y coronaria, la secreción de proteína C reactiva (del inglés C reactive protein, CRP) e interleuquina (IL)-6 a nivel hepático y colonizar los vasos placentarios generando riesgo de parto

prematureo y bajo peso al nacer (López et al., 2002; Thanakun & Izumi, 2016).

P. gingivalis produce diversos mecanismos de patogenicidad, los que podrían tener un rol en los eventos inflamatorios y destructivos de la periodontitis (Holt, 1999). Entre los mecanismos de patogenicidad que *P. gingivalis* produce se destacan los lipopolisacáridos (LPS), la fimbria, las proteinasas específicas para arginina o lisina (Rgp o Kgp) y los polisacáridos capsulares (Holt, 1999). Los polisacáridos capsulares o antígenos K constituyen la principal macromolécula de la superficie celular de *P. gingivalis*. Si bien, el antígeno K no es la única macromolécula que constituye la membrana externa, es la responsable de la serotipificación, define la clasificación taxonómica y contribuye con la virulencia de *P. gingivalis* (Van Winkelhoff et al., 1993; Van Winkelhoff et al., 2002).

2.3 Polisacáridos capsulares

Sobre la base de la variabilidad estructural de los polisacáridos capsulares se identificaron distintos serotipos capsulares (de K1 a K6) y cepas no encapsuladas (K⁻). Al evaluar los efectos de los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* en células inmunes humanas, se observó una respuesta inmune diferencial. En particular, al diferenciar monocitos periféricos a células dendríticas inmaduras y estimularlas con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*, se detecta un incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias ante la presencia de los serotipos K1 o K2, una respuesta moduladora ante K3, K4, K5 o K6 y una respuesta reguladora ante K⁻ (Vernal, Díaz-Guerra, et al., 2014; Vernal, Díaz-Zúñiga, et al., 2014; Vernal et al., 2009b). Así, los serotipos K1 o K2 se asocian a inflamación y resorción ósea mediante una respuesta predominantemente de linfocitos Th17 y Th22, además de Th1 y Th9, en comparación con los otros serotipos capsulares que se asocian a una condición de salud o remisión de la enfermedad mediante la estimulación de una respuesta linfocitaria predominantemente Th2 o T reguladora (Treg) (Vernal, Díaz-Zúñiga, et al., 2014).

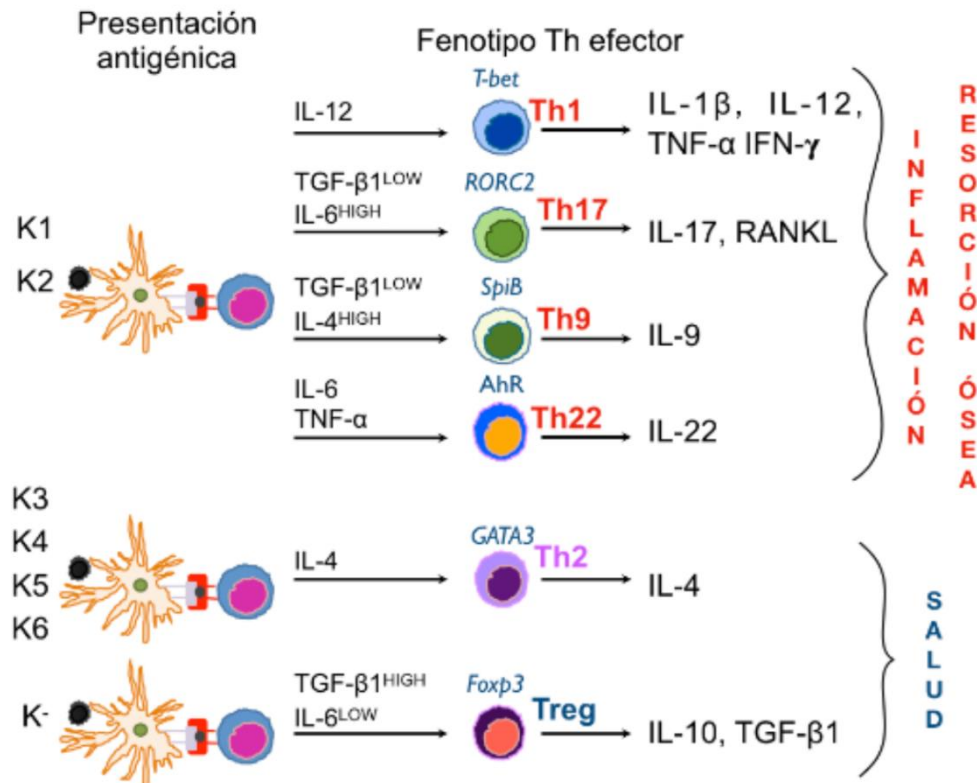


Figura 1. Esquema de los distintos serotipos capsulares y su respectiva respuesta inmune asociada a salud o enfermedad.

En roedores, se observó que mientras los serotipos K1 y K2 se asocian a periodontitis, el serotipo K4 y la cepa no encapsulada K⁻ se asocian con salud periodontal. Finalmente, al evaluar la respuesta inmune de memoria en pacientes afectados de periodontitis, se observó que ante los serotipos K1 o K2 existe una mayor frecuencia de proliferación de linfocitos Th de memoria en comparación a sujetos sanos, lo que indica que la periodontitis puede estar siendo causada, al menos en parte, por la presencia de estos serotipos. Recientemente, en un modelo de periodontitis experimental se observó que los serotipos K1 y K2 inducen neuroinflamación y que, en conjunto con el serotipo K4 y la cepa no encapsulada K⁻, fueron detectados en el hipocampo. Sin embargo, los efectos neuroinflamatorios y el incremento en marcadores de enfermedad neurodegenerativa se observó solo en presencia de los serotipos K1 y K2. Contrariamente, la presencia de la cepa no encapsulada se asoció con un aumento local de IL-10 y un mejor desempeño en pruebas de memoria.

2.4 Neuroinflamación

La neuroinflamación es un mecanismo de defensa que inicialmente protege al cerebro removiendo o inhibiendo a diversos patógenos, metabolitos, fármacos u otros elementos (Wyss-Coray & Mucke, 2002). Esta respuesta inflamatoria puede tener efectos beneficiosos promoviendo la reparación tisular o, por el contrario, dañina al inhibir la regeneración y favorecer la neurodegeneración (Glass et al., 2010; Kempuraj et al., 2016). La presencia de mediadores tales como IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α son esenciales para el establecimiento de una respuesta inflamatoria en el cerebro. Estas citoquinas son reconocidas por los receptores presentes en la superficie de las microglías, las que se activan y pueden producir más citoquinas y contribuir al incremento de la inflamación cerebral (Wyss-Coray & Mucke, 2002).

En este contexto, moléculas inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , podrían difundir por la barrera hemato-encefálica y ser reconocidas por los receptores de citoquinas de las microglías, que pueden contrastar la inflamación actuando como microglías moduladoras o M2, mediante la secreción de IL-4, IL-10 o agravarla convirtiéndose en el fenotipo pro-inflamatorio M1, que se caracteriza por la producción de mayores niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en respuesta a la presencia de citoquinas pro-inflamatorias (Block & Hong, 2005; Del Alonso et al., 1997; Doens & Fernandez, 2014). Las microglías son las células fagocíticas del cerebro y se reconoce que la activación crónica por antígenos bacterianos induce una respuesta secretora y una diferenciación al fenotipo M1 (Block & Hong, 2005; Heneka et al., 2014). El incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y la respuesta M1 inducen una modificación en el fenotipo de los astrocitos, de un fenotipo fisiológico a uno reactivo, que genera un desbalance energético, oxidativo y metabólico en las neuronas. El astrocito reactivo respondería a la microglía M1 secretando mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Figura N°2).

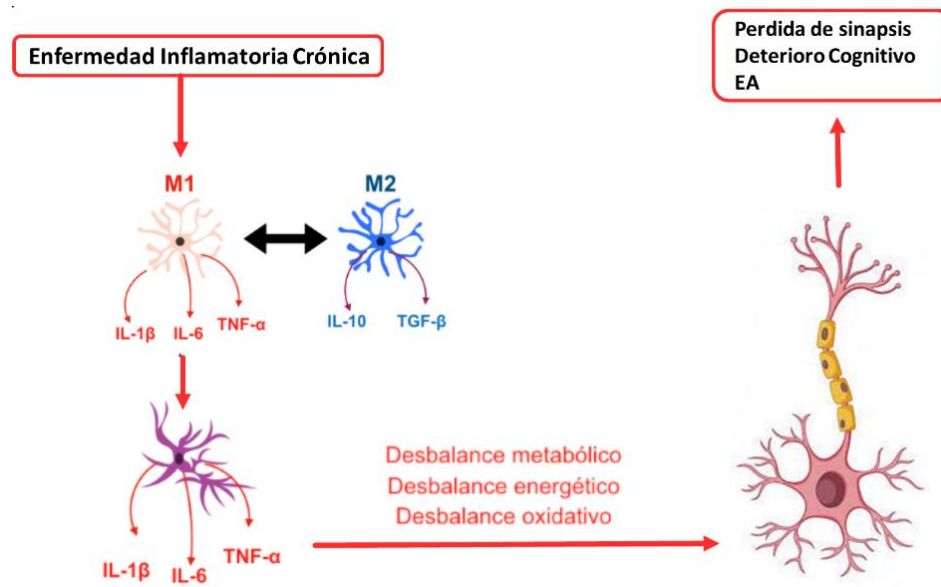


Figura N^o2. Esquema neuroinflamatorio. TNF: factor de necrosis tumoral, IL: interleuquina, EA: enfermedad de Alzheimer.

La presencia crónica de mediadores pro-inflamatorios en la circulación periférica producidos por una enfermedad crónica no transmisible puede afectar la homeodinamia cerebral (Heneka et al., 2014). En este contexto, las moléculas IL-1 β , IL-6 y TNF- α podrían difundir por la barrera hemato-encefálica y ser reconocidas por los receptores de citoquinas en las microglías y así, seguir potenciando la inflamación (Block & Hong, 2005; Del Alonso et al., 1997; Hernández et al., 2011).

2.5 Planteamiento del problema científico

Con la evidencia disponible hoy en día, sabemos que diversas enfermedades neurodegenerativas pueden ser explicadas mediante el fenómeno de la neuroinflamación. En este contexto, los modelos de periodontitis experimental inducida de diferentes maneras demuestran la presencia de neuroinflamación, activación de microglías, astrogliosis y acumulación de marcadores histopatológicos de enfermedad de Alzheimer (Díaz-Zúñiga et al., 2020; Hu et al., 2021; Ilievski et al., 2018; Poole et al., 2013; Wang et al., 2023). En este sentido, se desconoce el efecto que la periodontitis experimental pueda generar en otros tejidos cerebrales, dado que los estudios experimentales han centrado su unidad de análisis en el

hipocampo y no en otras regiones. Por ello, resulta evidente poder conocer si en la corteza cerebral, el mesencéfalo o el cerebelo pueden incrementar los mediadores pro-inflamatorios en ratas afectadas de periodontitis experimental. De ser así, la periodontitis no solo estaría potencialmente asociándose con la enfermedad de Alzheimer, sino que, con un evento pan-inflamatorio del cual se desconocen sus posibles consecuencias.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

En ratas Sprague-Dawley, la periodontitis experimental generada por inoculación palatina de *P. gingivalis* induce pan-inflamación cerebral caracterizada por el incremento significativo de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el hipocampo, corteza cerebral, cerebelo y mesencéfalo.

3.2 Objetivo General

Determinar la presencia de pan-inflamación cerebral en ratas macho Sprague-Dawley jóvenes afectadas de periodontitis experimental inducida por inoculación palatina de *P. gingivalis*.

3.3 Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α y de citoquinas moduladoras IL-4 e IL-10 en hipocampo, cerebelo, mesencéfalo y corteza cerebral de ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis experimental inducida por *P. gingivalis*.
2. Correlacionar la presencia de los mediadores pro-inflamatorios o moduladores con la presencia de periodontitis en ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis experimental inducida por *P. gingivalis* y ratas Sprague-Dawley control.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Cultivo bacteriano y curva de crecimiento bacteriano

Para la inoculación de las bacterias en la mucosa palatina se utilizó la cepa encapsulada de *P. gingivalis* W50 (K1), usada en estudios previos (Díaz-Zúñiga et al., 2014; Melgar-Rodríguez et al., 2016; Monasterio et al., 2019; Vernal et al., 2008, 2009b). Brevemente, la cepa de *P. gingivalis* W50 (serotipo K1) se cultivó en medio agar infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C en condiciones de capnofilia (8% O₂ y 12% CO₂) usando el generador CampyGen™ (Oxoid Ltd). Luego, las colonias se suspendieron en 10mL de caldo de cultivo BHI suplementado con hemina y menadiona 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 midieron en distintos tiempos hasta que la bacteria alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO se tomó una muestra de 100µL, la que se diluyó de forma seriada (log₁₀) en tampón fosfato salino (PBS) y 100 µL de cada dilución se sembró en agar sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona. Luego de 5-7 días, se cuantificó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y se contrastó con las DO correspondientes. Las curvas DO versus tiempo y DO versus UFC se graficaron para obtener un número conocido de bacterias en fase de crecimiento exponencial para realizar la inoculación con una concentración conocida de bacterias.

4.2 Modelo de infección periodontal

Para la inducción de la infección periodontal, se utilizaron 6 ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas se alojaron en jaulas separadas con filtros de aire y en condiciones estándar bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad, a 22 ± 0,5°C, 40-70% de humedad relativa, con agua y alimentación *ad libitum*. Para inducir la periodontitis experimental, los días 1 y 7, 6 ratas fueron inoculadas en la mucosa palatina con 100 µL (1x10¹⁰ UFC/mL) del serotipo K1 (cepa W50) de *P. gingivalis* bajo anestesia general utilizando isofluorano

al 3% v/v en un flujo de 1 L de oxígeno (Díaz-Zúñiga et al, 2020). Como control, 6 ratas fueron inoculadas con medio de transporte de bacterias sin bacterias (*sham*). Previo a su realización, todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile y están desarrollados según las guías internacionales de la American Veterinary Medical Association (AVMA) (Anexo N°1).

4.3 Obtención de muestras

Luego de 55 días desde la primera inoculación de bacterias en la mucosa palatina, las ratas se eutanasiaron mediante dislocación cervical con el objetivo de obtener las muestras biológicas las cuales fueron procesadas y analizadas.

Inmediatamente después de la eutanasia, a cada rata se le extrajo el cerebro *ad integrum* que se mantuvo en una solución de disección, compuesta por KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ 1 mM, suplementado con sacarosa 7,28%, dextrosa 0,18%, 2 mL de MgCl₂ 1 M, 100 µL de CaCl₂ 1 M y 1 mL de Piruvato 0,3 mM. De cada cerebro se aisló el cerebelo, el hipocampo, la corteza y el mesencéfalo e inmediatamente después se preservó en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C para posteriormente ser procesado.

4.4 Cuantificación de resorción ósea en modelos experimentales

Para confirmar que la inoculación bacteriana genera periodontitis experimental, en cada animal se cuantificó la resorción ósea en cada hemimaxilar. Para ello, posterior a la eutanasia, cada maxilar se extrajo y se eliminó todo tejido blando. Luego, se sumergieron en etanol 70% durante 24 h, 90% durante 24 h más, para finalmente preservarlo en etanol 100%. Posteriormente, cada maxilar se escaneó con un equipo Bruker microCT (SkyScan 1278; Bruker, Kontich, Belgium) utilizando los siguientes parámetros: 59 kV, 588 µA, 0,5° de rotación y 360° de rango angular. De ellos, se obtuvieron imágenes en 3D y la cuantificación de la resorción ósea se realizó utilizando el software Nrecon (Bruker, Kontich, Belgium) según las mediciones descritas previamente (Park et al., 2007). En el Anexo N°2 se representan todos los datos que demuestran que, posterior a 55 días, el serotipo K1 induce resorción ósea en comparación con el grupo control.

4.5 Detección de moléculas mediante ELISA

Para la cuantificación de las moléculas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- α cada muestra se preparó según el siguiente protocolo. Los hipocampos, cerebelos, cortezas y mesencéfalos se descongelaron y homogenizaron en una solución que contiene Tris-HCl 0,5 M, NaCl 2 M, CaCl₂ 250 mM, Tx100 25% e inhibidor de proteasas. Brevemente, cada tejido se lavó con 1 mL de NaCl 0,9% 3 veces, para luego agregar 10 μ L de solución de homogenización por cada mg de peso de la muestra, triturar con un homogenizador eléctrico y 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, Winooski, VT, USA) y se almacenó en alícuotas de 200 μ L a -80°C. A partir de 100 μ L de cada homogenizado, se cuantificó la producción de las citoquinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- α mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA), evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm (Synergy™).

4.6 Análisis de los datos

Los datos de los niveles de secreción de las citoquinas se expresaron como el valor promedio de la concentración (pg/mL) \pm desviación estándar. La cuantificación de la destrucción ósea se representó en el valor promedio (μ m) \pm desviación estándar. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Lèvene y analizaron utilizando las pruebas ANOVA-Tukey. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.22.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p value <0,05.

5. RESULTADOS

Para evaluar si la inoculación de *P. gingivalis* en la mucosa palatina induce una respuesta que nos permita definir la presencia de periodontitis experimental, en el Anexo N°3 se representan todos los datos que demuestran que posterior a 55 días, el serotipo K1 induce resorción ósea e inflamación en comparación con los otros serotipos capsulares.

5.1 Niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo

Para comprobar si la inoculación del serotipo K1 de *P. gingivalis* induce alteraciones pro-inflamatorias en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo, se cuantificaron los niveles de secreción de citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α . En las ratas inoculadas con el serotipo K1 se detectó un incremento en los niveles de secreción de las citoquinas IL-1 β , e IL-6 en el hipocampo, en comparación con las ratas *sham*. No se detectaron diferencias en los otros tejidos cerebrales.

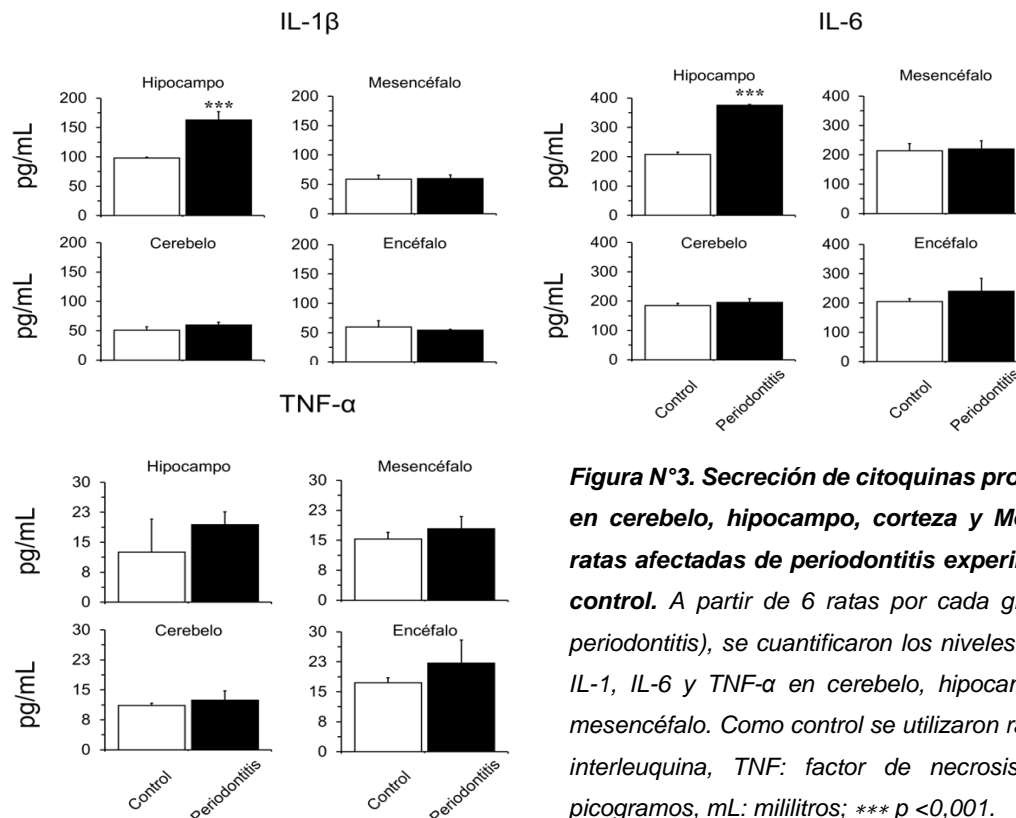


Figura N°3. Secreción de citoquinas pro-inflamatorias en cerebelo, hipocampo, corteza y Mesencéfalo de ratas afectadas de periodontitis experimental versus control. A partir de 6 ratas por cada grupo (control y periodontitis), se cuantificaron los niveles secretados de IL-1, IL-6 y TNF- α en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo. Como control se utilizaron ratas Sham. IL: interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, pg: picogramos, mL: mililitros; *** p < 0,001.

5.2 Niveles de secreción de citoquinas moduladoras en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo.

Al evaluar la presencia de las citoquinas moduladoras IL-4 e IL-10, se puede observar una menor concentración de IL-4 en el hipocampo de las ratas con periodontitis en comparación con el grupo control. No se observaron diferencias en los otros grupos experimentales.

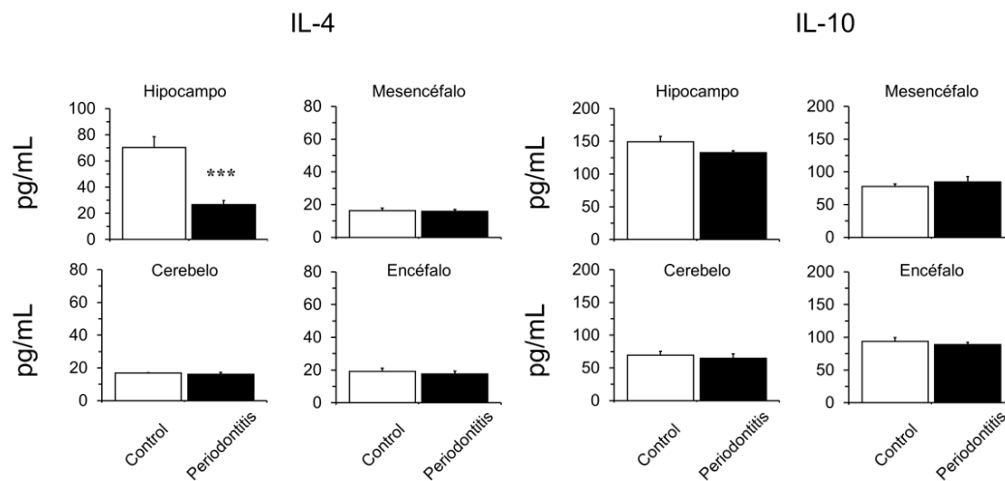


Figura N°4. Secreción de citoquinas moduladoras en cerebelo, hipocampo, corteza y Mesencéfalo de ratas afectadas de periodontitis experimental versus control. A partir de 6 ratas por cada grupo (control y periodontitis), se cuantificaron los niveles secretados de IL-4 e IL-10 en cerebelo, hipocampo, corteza y mesencéfalo. Como control se utilizaron ratas Sham. IL: interlequina, pg: picogramos, mL: mililitros; *** $p < 0,001$.

6. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la periodontitis experimental inducida por el serotipo K1 de *P. gingivalis* en ratas Sprague-Dawley es capaz de inducir mayor secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 y menores niveles de IL-4 en el hipocampo en comparación con las ratas sham. Curiosamente, en este modelo de doble inoculación palatina, y después de 55 días, no se observaron diferencias en los niveles de las moléculas cuantificadas en cerebelo, encéfalo, ni mesencéfalo. Sin embargo, para TNF- α se observa una tendencia a un incremento en sus niveles en los tejidos cerebrales de las ratas afectadas por periodontitis en comparación con el grupo control. Además, en el encéfalo de ratas afectadas de periodontitis se observa un leve incremento de IL-6 sin ser significativo.

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que se producen durante la respuesta inmune, actúan promoviendo la homeodinamia en el SNC y el sistema nervioso Periférico (SNP) y son secretadas por muchos tipos de células: endotelios, linfocitos, células gliales y neuronas (Adler & Rogers, 2005; Arisi, 2014; Hopkins & Rothwell, 1995). En el proceso de neuroinflamación se demuestra que las citoquinas pro-inflamatorias son moléculas mediadoras esenciales de este proceso, entre ellas IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Garay & McAllister, 2010).

El rol de IL-1 β en el proceso de neuroinflamación es la activación de las microglías, que al ser activadas a un fenotipo pro-inflamatorio aumentan la secreción de estos mismos mediadores e inducen la modificación fenotípica de los astrocitos a un astrocito reactivo (Wu & Nakanishi, 2015). IL-6, puede participar tanto de la activación de las microglías como de la modificación en la función de los astrocitos. Además, una asociación positiva se detectó entre el nivel sérico de IL-6 y el deterioro cognitivo (Gimeno et al., 2008; Heringa et al., 2014; Simpson et al., 2013). Por su parte, TNF- α se asocia con la patogénesis de distintas enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer. (Hallenbeck, 2002; Tweedie et al., 2007). En efecto, se ha demostrado que los niveles de TNF- α están incrementados en el tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer

hasta en 25 veces más en comparación a sujetos sanos (Tarkowski et al., 1999).

En términos generales, sabemos que existe una relación entre periodontitis y el incremento de estas citoquinas pro-inflamatorias en tejido cerebral, la que puede generar un deterioro de las funciones cerebrales, a partir de estas afirmaciones, surgen preguntas que se nos hace necesario intentar responder ¿En otros modelos experimentales que resultados se han encontrado?, ¿Existen estudios donde se puedan comprobar las consecuencias de la inflamación cerebral? Haciendo una búsqueda de evidencia observamos que en estudios similares en modelos experimentales en ratas con periodontitis inducida por ligadura se encontraron elevados niveles de IL-6 en suero y corteza cerebral (Hu et al., 2021). Otro estudio en ratas con periodontitis inducida experimentalmente, se demostró el potencial rol de IL-1 β y TNF- α en el deterioro cognitivo y pérdida de memoria (Wang et al., 2023). Los roedores con enfermedad tipo Alzheimer evidencian características similares a la EA, es decir, los estudios disponibles permiten establecer una relación entre periodontitis y pérdida de función del tejido cerebral, sin saber aún si existe causalidad. Pero ¿Cuál es la importancia del mayor incremento de estas citoquinas en el tejido hipocampal? Hoy en día se sabe que el hipocampo cumple un rol importante en la memoria y el aprendizaje del individuo y que, al provocarse un desequilibrio en esa área específica, se traduce en la aparición de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Mu & Gage, 2011). Nuestros resultados demuestran un aumento significativo en los niveles de secreción de IL-1 β , IL-6 en hipocampo de las ratas afectadas de periodontitis experimental inducida por el serotipo K1 de *P. gingivalis* en comparación con las ratas *sham*. Por lo tanto, es posible asegurar en este modelo experimental, al menos en parte, que la periodontitis provoca un desequilibrio en el tejido cerebral, aumentando la cantidad de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α y disminuyendo la cantidad de la citoquina reguladora IL-4 en el hipocampo. Esto nos permite inferir que estaríamos en presencia de neuroinflamación hipocampal, pero no de pan-inflamación cerebral.

Actualmente no existen estudios experimentales en humanos que demuestren que *P. gingivalis* sea causante de deterioro cognitivo y los modelos experimentales constituyen la mayor aproximación para demostrar esta hipótesis. Sin embargo, se

ha reportado la presencia de LPS de *P. gingivalis* en tejido cerebral proveniente de individuos con enfermedad de Alzheimer *post-mortem* sin detectarlo en sujetos sin la enfermedad (Poole et al., 2013). Epidemiológicamente, dos estudios longitudinales concluyeron de manera independiente que las personas afectadas de enfermedad de Alzheimer muestran un bajo estado de salud bucal que disminuye progresivamente a medida que aumenta la severidad de la enfermedad (Aragón et al., 2018; D'Alessandro, 2018). Al analizar a 549 personas mayores se observó que aquellas afectadas de demencia tenían múltiples problemas de salud oral relacionados con los tejidos blandos, como sangrado gingival, presencia de sacos periodontales, lesiones de la mucosa y disminución en el flujo salival (Delwel et al., 2018). En concordancia con la teoría neuroinflamatoria, todos estos estudios nos llevan a relacionar a la periodontitis y algunos patógenos, entre ellos *P. gingivalis*, como un posible factor de riesgo en humanos para el desarrollo de demencias como la enfermedad de Alzheimer (Heneka et al., 2015).

La mayor limitante de estos estudios es que no es posible medir los niveles de estas citoquinas en el tejido cerebral de estos pacientes, los estudios en humanos son epidemiológicos y los estudios experimentales son realizados en animales mayoritariamente transgénicos y que explican el 5% de las demencias. La teoría neuroinflamatoria es mucho más compleja y para entender mejor su fenómeno hace falta analizar muchas más moléculas y variables que las analizadas en este estudio, pero marca un precedente importante ya que fue posible medir un incremento significativo de IL-1 β e IL-6 en hipocampo de ratas, tejido cerebral que sabemos está relacionado con deterioro cognitivo y pérdida de memoria (Díaz-Zúñiga et al., 2020). Pero, para poder establecer una relación más robusta entre periodontitis y neuroinflamación se deberían tomar en cuenta muchas más variables para estudios posteriores, como cuantificar la presencia de LPS u otro mecanismo de patogenicidad de *P. gingivalis* u otra bacteria oral en el tejido cerebral o, simplemente, evaluar si otras bacterias periodontales poseen la capacidad de generar inflamación a nivel hipocampal.

En el presente trabajo sólo se evidencia inflamación en el hipocampo, un tejido cerebral cercana a una zona anatómica desprovista de barrera hemato-encefálica.

Estudios similares han demostrado que ante una enfermedad crónica ocurre una disrupción de la barrera hematoencefálica lo que conduce a la acumulación de proteínas neurotóxicas derivadas de la sangre en el sistema nervioso central. Entre estas proteínas se encuentran la fibrina, trombina, hemoglobina, hemosiderina que contiene hierro, hierro libre o plasmina, las que pueden causar neurodegeneración progresiva con pérdida de neuronas mediada por toxicidad neuronal directa, estrés oxidativo o desprendimiento de neuronas de su matriz extracelular (Armulik et al., 2010; Bell et al., 2009; Daneman et al., 2010; Winkler et al., 2012). En efecto, una enfermedad crónica como la periodontitis experimental, provocaría posiblemente un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y un aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el hipocampo, asociándose con la pérdida progresiva de la memoria.

En términos generales, el presente trabajo nos permite determinar la importancia que *P. gingivalis* tiene al estar presente en un animal que naturalmente no la posee y que es capaz de inducir inflamación hipocampal. Así, el presentar *P. gingivalis* en la cavidad oral podría ser un factor de riesgo no solo de desarrollar periodontitis, si no también, de tener otras condiciones o complicaciones derivadas de su presencia en sitios diferentes a la cavidad oral.

7. CONCLUSIONES

1. Existe un incremento en los niveles secretados de IL-1 β e IL-6 en el hipocampo y una tendencia en el encéfalo de mayores niveles de TNF- α en ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis inducida por el serotipo K1 de *P. gingivalis* en comparación con las ratas sham.
2. Existe una disminución de los niveles secretados de IL-4 en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley afectadas de periodontitis inducida por el serotipo K1 de *P. gingivalis* en comparación con las ratas sham.
3. Existe una asociación entre la presencia de inflamación hipocampal con la presencia de periodontitis experimental inducida por inoculación palatina de la cepa W50 de *P. gingivalis*.
4. Los datos demuestran que en el modelo de inoculación palatino no existe pan-inflamación cerebral y sólo existe inflamación hipocampal.

8. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Adler, M. W., & Rogers, T. J. (2005). Are chemokines the third major system in the brain? *Journal of Leukocyte Biology*, 78(6), 1204–1209. <https://doi.org/10.1189/jlb.0405222>

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>

Arisi, G. M. (2014). Nervous and immune systems signals and connections: Cytokines in hippocampus physiology and pathology. In *Epilepsy and Behavior* (Vol. 38, pp. 43–47). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.01.017>

Armulik A, Genové G, Betsholtz C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468(7323) 557-561.

Bell R, Deane R, Zlokovic B. (2009). SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid- β clearance in brain vascular cells *Nature Cell Biology* 11(2) 143-153.

Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 76, Issue 2, pp. 77–98). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>

Daneman R, Zhou L, Barres B. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468(7323) 562-566.

D'Alessandro, G. (2018). Estado de salud oral en pacientes con enfermedad de alzheimer: Un estudio descriptivo en una población italiana. *Contemp Dent Pract*, 19(5), 483–489.

Del Alonso, A. C., Grundke-iqbal, I., Barra, H. S., & Iqbal, K. (1997). *Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau (microtubule assembly paired helical filaments cytoskeleton neurofibrillary tangles)* (Vol. 94). www.pnas.org.

Delwel, S., Binnekade, T. T., Perez, R. S. G. M., Hertogh, C. M. P. M., Scherder, E. J. A., & Lobbezoo, F. (2018). Oral hygiene and oral health in older people with dementia: a comprehensive review with focus on oral soft tissues. In *Clinical Oral Investigations* (Vol. 22, Issue 1, pp. 93–108). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2264-2>

D'Empaire, G., Baer, M. T., & Gibson, F. C. (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., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., Ciuchi, P., García, M., Arias, J., Sanz, M., & Vernal, R. (2015). Variability of the Dendritic Cell Response Triggered by Different Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* Is Toll-Like Receptor 2 (TLR2) or TLR4 Dependent. *Journal of Periodontology*, *86*(1), 108–119. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140326>

Díaz-Zúñiga, J., More, J., Melgar-Rodríguez, S., Jiménez-Unión, M., Villalobos-Orchard, F., Muñoz-Manríquez, C., Monasterio, G., Valdés, J., 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* (2020) *11*

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>

Doens, D., & Fernandez, P. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid B for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(48).

G. Caton J, Armitage G, S. Tonetti M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology* *45* S1-S8.

Garay, P. A., & McAllister, A. K. (2010). Novel roles for immune molecules in neural development: Implications for neurodevelopmental disorders. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Issue SEP). <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00136>

Garlet, G. P., Cardoso, C. R. B., Campanelli, A. P., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2007). The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: Host protection and tissue destruction. *Clinical and Experimental Immunology*, *147*(1), 128–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03260.x>

Gimeno, D., Marmot, M. G., & Singh-Manoux, A. (2008). Inflammatory markers and cognitive function in middle-aged adults: The Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(10), 1322–1334. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.07.006>

Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 918–934). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>

Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 10, pp. 717–725).

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>

Hallenbeck, J. (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nature Medicine*, (Vol 8).

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., Verkhatsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 388–405). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 463–477). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3705>

Heringa, S. M., Van den Berg, E., Reijmer, Y. D., Nijpels, G., Stehouwer, C. D. A., Schalkwijk, C. G., Teerlink, T., Scheffer, P. G., van den Hurk, K., Kappelle, L. J., Dekker, J. M., & Biessels, G. J. (2014). Markers of low-grade inflammation and endothelial dysfunction are related to reduced information processing speed and executive functioning in an older population - the Hoorn Study. *Psychoneuroendocrinology*, 40(1), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.11.011>

Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F. E., Vernal, R., Sorsa, T., & Gamonal, J. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. In *Journal of Dental Research* (Vol. 90, Issue 10, pp. 1164–1170). <https://doi.org/10.1177/0022034511401405>

Holt, S. C. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, 20(1), 168–238.

Hopkins, S. J., & Rothwell, N. J. (1995). *Cytokines and the nervous system I: expression and recognition* (Vol. 18).

Ilievski, V., Zuchowska, P., Green, S., Toth, P., Ragozzino, M., Le, K., Aljewari, H., O'Brien-Simpson, N., Reynolds, E., 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* (2018) 13(10)

Iadecola C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*

Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P. A., Selvakumar, G. P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S. S., & Zaheer, A. (2016). *Neuroinflammation Induces Neurodegeneration*.

Laine, M., Appelmeik, B., & van Winkelhoff, A. (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *JOURNAL OF PERIODONTAL*

RESEARCH, 31, 278–284.

López, N. J., Smith, P. C., & Gutierrez, J. (2002). Periodontal Therapy May Reduce the Risk of Preterm Low Birth Weight in Women with Periodontal Disease: A Randomized Controlled Trial. In *J Periodontol*.

Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P., Escobar, A., Sanz, M., & 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>

Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, A., Hernández, M., Bravo, D., & Vernal, R. (2019). Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *Journal of Periodontology*, 90(5), 522–534. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0079>

Mu, Y., & Gage, F. H. (2011). *Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease*. <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/6/1/85>

Montagne, A., Barnes, S., Sweeney, Melanie D., Halliday, Matthew R., Sagare, Abhay P., Zhao, Zhen, Toga, Arthur W., Jacobs, Russell E., Liu, Collin Y., Amezcua, Lilyana, Harrington, Michael G., Chui, Helena C., Law, Meng, Zlokovic, B. (2015). Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* (2015) 85(2) 296-302

Papapanou, P., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D., Flemmig, T., Garcia, R., Giannobile, W., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R., Kerschull, M., Kinane, D., Kirkwood, K., Kocher, T., Kornman, K., Kumar, P., Loos, B., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G., Teles, R., Tonetti, M. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology* (2018) 89 S173-S182

Park, C. H., Abramson, Z. R., Taba, M., Jin, Q., Chang, J., Kreider, J. M., Goldstein, S. A., & Giannobile, W. V. (2007). Three-Dimensional Micro-Computed Tomographic Imaging of Alveolar Bone in Experimental Bone Loss or Repair. *Journal of Periodontology*, 78(2), 273–281. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060252>

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>

Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R.,

Hernández, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329–355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>

Simpson, E. E. A., Hodkinson, C. F., Maylor, E. A., McCormack, J. M., Rae, G., Strain, S., Alexander, H. D., & Wallace, J. M. W. (2013). Intracellular cytokine production and cognition in healthy older adults. *Psychoneuroendocrinology*, 38(10), 2196–2208. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.04.007>

Singh Rao, S. K., Harding, A., Poole, S., Kesavalu, L., & Crean, S. J. (2015). Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/137357>

Soto, C., Bugueño, I., Hoare, A., Gonzalez, S., Venegas, D., Salinas, D., Melgar-Rodríguez, S., Vernal, R., Gamonal, J., Quest, A. F. G., Pérez-Donoso, J. M., & Bravo, D. (2016). The Porphyromonas gingivalis O antigen is required for inhibition of apoptosis in gingival epithelial cells following bacterial infection. *Journal of Periodontal Research*, 51(4), 518–528. <https://doi.org/10.1111/jre.12331>

Tarkowski, E., Blenow, K., Wallin, A., & Tarkowski, A. (1999). Intracerebral Production of Tumor Necrosis Factor- α , a Local Neuroprotective Agent, in Alzheimer Disease and Vascular Dementia. In *Journal of Clinical Immunology* (Vol. 19, Issue 4).

Thanakun, S., & Izumi, Y. (2016). Effect of Periodontitis on Adiponectin, C-Reactive Protein, and Immunoglobulin G Against Porphyromonas gingivalis in Thai People with Overweight or Obese Status. *Journal of Periodontology*, 87(5), 566–576. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150583>

Trombone, A. P. F., Ferreira, S. B., Raimundo, F. M., De Moura, K. C. R., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S., Campanelli, A. P., De Franco, M., & Garlet, G. P. (2009). Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: Increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *Journal of Periodontal Research*, 44(4), 443–451. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01133.x>

Tweedie, D., Sambamurti, K., & Greig, N. H. (2007). TNF-Inhibition as a Treatment Strategy for Neurodegenerative Disorders: New Drug Candidates and Targets. In *Current Alzheimer Research* (Vol. 4).

Van Winkelhoff, A. J., Appelmelk, B. J., Kippuw, N., De Graaff, J., & Winkelhoff, V. (1993). CM MtJobiolDgy atitj itnmutology K-antigens in Porphyromonas gingivalis are associated with virulence. *Oral Microbiol Immunol*, 8, 259–265.

Van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., Van Der Reijden, W. A., & Van Der Velden, U. (2002). Bacteroides forsythus and other section Oral Microbiology and. In *J Clin*

Periodontol (Vol. 29).

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., Sanz, M., & 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. (2009a). 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>

Vernal, R., León, R., Silva, A., Van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A., & Sanz, M. (2009b). 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>

Winkler, E., Sengillo, J., Bell, R., Wang, J., Zlokovic B. (2012). Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(10) 1841-1852

Wu, Z., & Nakanishi, H. (2015). Lessons from Microglia Aging for the Link between Inflammatory Bone Disorders and Alzheimer's Disease. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/471342>

Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Review Inflammation in Neurodegenerative Disease-A Double-Edged Sword emanating from injured neurons, or by imbalances between pro-and antiinflammatory processes. Inflammatory responses also recruit immune mecha. In *Neuron* (Vol. 35).

9. ANEXOS

Anexo N°1:

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



Santiago, 06 de abril de 2022
Certificado N°: 17085-ODO-UCH-e1

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **FOUCH-041702** del Proyecto de Investigación titulado **“Asociación entre enfermedad periodontal y enfermedad de Alzheimer”**, de los investigadores **Dr. Jaime Díaz Zúñiga**, Profesor Asistente, Departamento de Odontología Conservadora y **Dra. Andrea Paula-Lima**, Profesora Asociada, Instituto de Ciencias Odontológicas, ambos de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas 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 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 **52 ratas**, especie *Rattus Norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde **marzo del 2017 hasta marzo del 2019**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el proyecto **Concurso Fondos para la Investigación en Odontología, FOUCH-017-006**.

Con fecha 06 de abril del 2022, el presente certificado incorpora la **primera enmienda**, en la cual se extiende la fecha de término de uso de los animales hasta el 30 de junio del 2022.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 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.

Claudia Delgado Acevedo
Directora Ejecutiva
CICUA – VID
Universidad de Chile



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

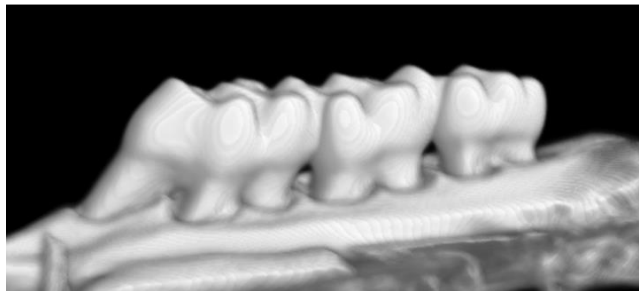
Anexo N°2:

Cuantificación de reabsorción ósea en modelo de periodontitis experimental

Una vez obtenidas las imágenes 3D de las hemimaxilas se realizaron mediciones lineales desde el límite amelo-cementario (LAC) a la cresta ósea alveolar de todas las raíces de los molares superiores del lado derecho e izquierdo, se observa que el grupo inoculado con el serotipo K1 tiene una mayor distancia desde el LAC a la cresta ósea de cada raíz de cada molar sin excepción al compararlo con el grupo Control, demostrando así que luego de 55 días el grupo de ratas al que se le indujo periodontitis experimental sí sufrió de reabsorción ósea, lo cual es un signo inequívoco de enfermedad periodontal.

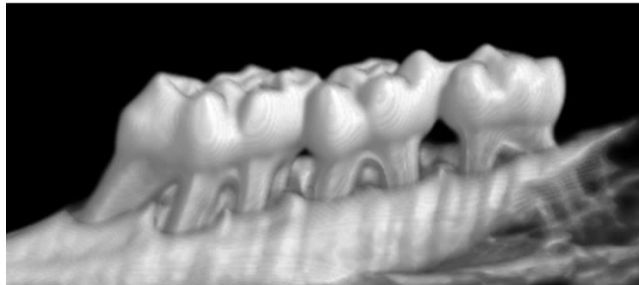
Control

A

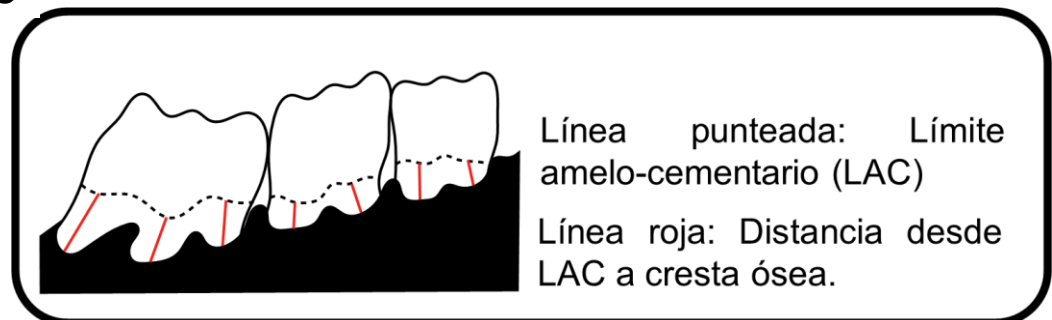


K1

B



C



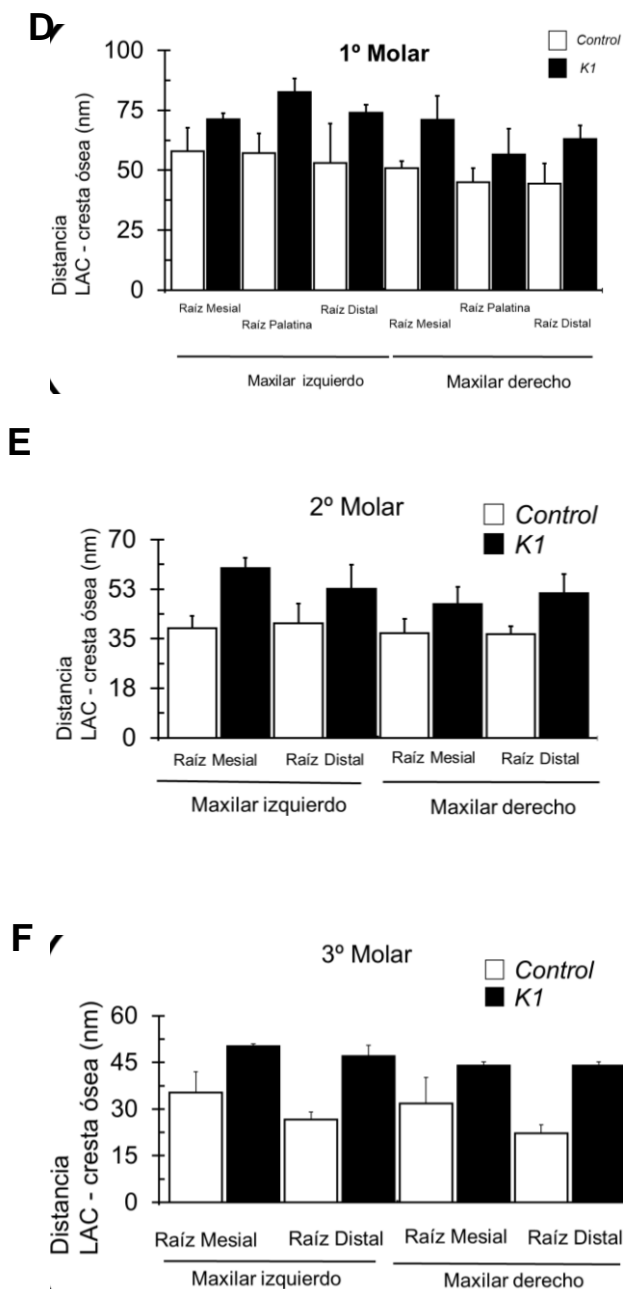


Figura N°3. Cuantificación de la resorción ósea maxilar de ratas afectadas de periodontitis experimental.

A) Esquema de la medición realizada para cuantificar la pérdida ósea; línea punteada corresponde al límite amelo-cementario (LAC); línea roja corresponde a la distancia medida entre la cresta ósea alveolar y el LAC.

B y C) Reconstrucción 3D de maxilares de ratas Sham y ratas inoculadas con serotipo K1 de *P. gingivalis*, respectivamente.

D a G) Pérdida ósea de los 1°, 2° y 3° molares superiores de los distintos grupos. Imágenes sin asteriscos de significancia por ser imagen suplementaria.