



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

**VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS CEREBRALES  
FRENTE A LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE *PORPHYROMONAS*  
*GINGIVALIS***

**Antonia Macarena González Bravo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Jaime Diaz Zúñiga**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Andrea Paula-Lima**

**Prof. Dra. Samanta Melgar Rodriguez**

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

**Santiago, Chile**

**2022**





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

**VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS CEREBRALES  
FRENTE A LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE *PORPHYROMONAS*  
*GINGIVALIS***

**Antonia Macarena González Bravo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Jaime Diaz Zúñiga**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Andrea Paula-Lima**

**Prof. Dra. Samanta Melgar Rodriguez**

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

**Santiago, Chile**

**2022**

## **Agradecimientos**

A mi mamá, mi papá y mi hermano, que siempre han creído en mí y me han dado las herramientas para convertirme en la persona que soy.

A Alonso, que desde el comienzo me ha acompañado en los momentos más difíciles de la carrera, como también, hemos celebrado juntos cada uno de nuestros logros y alegrías. Gracias por escucharme y aconsejarme.

A mi gato Rocco Humberto, que siendo un ser tan pequeño ha sido un pilar emocional muy importante en esta etapa de mi vida.

A las amigas y amigos que me dejó la universidad, por todas las risas y los buenos momentos. Mención especial a Macarena, Paloma, Florencia, Gabriel y Frank. También a mis compañeros de clínica, gracias por las sacadas de apuro y las sonrisas de ánimo cada mañana.

A mis amigas del colegio, que junto a ellas he podido desconectarme de la universidad cuando ha sido necesario.

Gracias a mi tutor de tesis Dr. Jaime Diaz, que tuvo la paciencia y disposición para resolver mis dudas, y explicarme paso a paso todo lo necesario para poder realizar este trabajo. También agradecer a las tutoras asociadas por sus correcciones y aportes en este proyecto, la Dra. Paula-Lima y la Dra. Melgar.

## Índice

1. Marco Teórico	1
1.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	1
1.2 <i>Enfermedad de Alzheimer y su posible asociación con la periodontitis</i>	3
1.3 <i>Planteamiento del problema</i>	5
2. Hipótesis.	8
3. Objetivo general	8
4. Objetivos específicos	8
5. Metodología	9
5.1 <i>Cultivo bacteriano y curva de crecimiento bacteriano</i>	9
5.2 <i>Cultivo de microglías</i>	9
5.3 <i>Cultivo enriquecido de neuronas</i>	9
5.4 <i>Purificación de RNA total y expresión de moléculas mediante qPCR</i>	10
5.5 <i>Secreción de moléculas mediante ELISA</i>	10
5.6 <i>Cuantificación de malondialdehído</i>	10
5.7 <i>Análisis de datos</i>	11
6. Resultados	12
6.1 <i>Expresión de citoquinas y receptores en microglías</i>	12
6.2 <i>Expresión de citoquinas y receptores en cultivos enriquecidos de neuronas</i>	14
6.3 <i>Cuantificación de moléculas en cultivos enriquecidos de neuronas</i>	15
6.4 <i>Factores de transcripción en cultivos enriquecidos de neuronas</i>	17
6.5 <i>Cuantificación de MDA en cultivos enriquecidos de neuronas.</i>	18
7. Discusión	19
8. Conclusiones	27
9. Referencias bibliográficas	28
10. Anexos	38
10.1 <i>Anexo N°1 Certificado comité de ética</i>	38

**Resumen**

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es una bacteria anaerobia estricta Gram negativo presente en la microbiota oral que desempeña el rol de patógeno clave en la disbiosis que desencadena la periodontitis. *P. gingivalis* presenta distintos serotipos determinados por la variabilidad estructural de su cápsula que le otorga una inmunogenicidad y mecanismos de patogenicidad diferentes. Esta bacteria se ha relacionado con enfermedades tales como la aterosclerosis, diabetes, efectos adversos en el embarazo y, recientemente, con la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es la causa más común de demencia en las personas mayores, provocando deterioro cognitivo, desorientación y pérdida de memoria. Recientemente, se observó que las microglías pueden desencadenar la respuesta proinflamatoria posterior al reconocimiento de bacterias o virus que ingresaron al cerebro. En el presente estudio se determinó el efecto inflamatorio y oxidativo de los serotipos capsulares de *P. gingivalis* en microglías y cultivos enriquecidos de neuronas derivados de ratas Sprague-Dawley. **Materiales y métodos.** Se estimularon cultivos de microglías y cultivos enriquecidos de neuronas del hipocampo derivados de cerebros de rata con los serotipos K1, K2 y K4 de *P. gingivalis*. Los niveles de interleuquina (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , receptor tipo Toll (TLR)-2 y TLR4, de las metaloproteinasas de matriz (MMP)-2 y MMP9, de los factores de transcripción *Socs3*, *Stat3*, de la enzima *Sod2* y la concentración de malondialdehído (MDA), se cuantificaron mediante ELISA o qPCR. **Resultados.** Los serotipos K1 y K2 desencadenaron respuestas inflamatorias en microglías y cultivos enriquecidos de neuronas. Además, indujeron niveles de expresión aumentados de mRNA de *Stat3*, mientras que K4 aumenta los niveles de expresión de mRNA de *Sod2* y *Socs3*, y la concentración de MDA aumenta con K2 en cultivos enriquecidos de neuronas. **Conclusiones.** Los serotipos más inmunogénicos de *P. gingivalis* K1 y K2 inducen una respuesta inflamatoria y oxidativa en las células cerebrales, lo que sugiere que estas células los reconocen de manera diferencial.

## 1. Marco Teórico

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible originada por la disbiosis de la microbiota subgingival (Hajishengallis, 2014; Tonetti y cols., 2018). Esta disbiosis desencadena una respuesta inflamatoria que genera la destrucción de los tejidos de soporte del diente, tales como el cemento radicular, el ligamento periodontal y el hueso alveolar (Hajishengallis, 2014). Este proceso se desarrolla primero con la destrucción de las fibras colágenas del tejido conectivo, luego la resorción del hueso alveolar, la migración hacia apical del epitelio de unión y la formación del saco periodontal (Singh et al., 2015). Sin una intervención y tratamiento adecuado, la periodontitis causará movilidad dentaria y finalmente, la pérdida de los dientes.

La principal causa de la disbiosis de la microbiota subgingival son las bacterias clave (*keystone pathogens*) o los patobiontes, que residen permanentemente en la microbiota subgingival. Entre las bacterias clave, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) se asocia al inicio y progresión de la periodontitis (Hajishengallis, 2014).

### 1.1 *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* es una bacteria Gram negativo, anaerobia estricta y asacarolítica, que se asocia con la destrucción del tejido periodontal y con la capacidad de modular la respuesta inflamatoria del hospedero (Laine y van Winkelhoff, 1998). *P. gingivalis* posee una gran variedad de mecanismos de patogenicidad, entre los cuales se describen las gingipainas, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares (Kunnen y cols., 2012).

Los polisacáridos capsulares son macromoléculas que otorgan integridad estructural a la superficie de *P. gingivalis* y son reconocidos por el sistema inmune del hospedero, lo que les permite interactuar y defenderse de las células mediadoras de la respuesta inmune. Estas macromoléculas están compuestas por glucosa, glucosamina, galactosa, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosa, galactosamina y los ácidos galactosaminurónico, manurónico, glucorónico y galacturónico

(Farquharson y cols., 2000). Basándose en la variabilidad estructural de la combinación de los componentes mencionados anteriormente es que se describen los distintos serotipos de *P. gingivalis* designados K1 a K6, así como cepas carentes de cápsula designadas K- (Laine y cols., 1997), que poseen una inmunogenicidad y mecanismos de patogenicidad diferente (Vernal y cols., 2009; Vernal y cols., 2014a; Vernal y cols., 2014b). En efecto, mientras los serotipos encapsulados presentan mayor virulencia en infecciones experimentales y causan un tipo de infección más severa, las cepas no encapsuladas causan abscesos localizados (Laine y van Winkelhoff, 1998).

Distintos estudios *in vitro* y experimentales han evaluado los diferentes efectos que los serotipos pueden inducir en las células o tejidos del hospedero (d'Empaire y cols., 2006; Vernal y cols., 2009; Vernal y cols., 2014a; Vernal y cols., 2014b). Así, al estimular células dendríticas humanas con los serotipos K1 o K2 se detectó un incremento en los niveles de producción de las citoquinas proinflamatorias interleuquina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor Necrosis Factor*, TNF)- $\alpha$ , en comparación con los serotipos K3, K4, K5, K6 o la cepa no encapsulada K- (Vernal y cols., 2009). Posteriormente, al evaluar la respuesta de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos K1 o K2, se detectó la diferenciación hacia los fenotipos de linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th)-1 y Th17, en comparación con los serotipos K3, K4 o K5 que indujeron una respuesta Th2, o las cepas no encapsuladas que indujeron una respuesta T reguladora (Treg) (Vernal y cols., 2014a). Finalmente, al inocular los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* en roedores se observó mayor resorción ósea en comparación a los otros serotipos o cepas no encapsuladas (Díaz-Zúñiga y cols., 2020; Mysak y cols., 2014; Vernal y cols., 2014b). En conjunto, el desequilibrio inmunológico de la microbiota no depende solo de la presencia de *P. gingivalis*, sino que también del serotipo que coloniza al hospedero, lo que determinará su susceptibilidad microbiológica.

Las lesiones periodontales se reconocen como reservorios para la diseminación sistémica de bacterias, antígenos y citoquinas junto con otros mediadores proinflamatorios (Hajishengallis, 2014). Una vez que las bacterias, los



mecanismos de patogenicidad o los mediadores proinflamatorios liberados difunden a otros tejidos u órganos del hospedero, pueden inducir respuestas proinflamatorias con efectos no deseados. La bacteriemia transitoria producida por *P. gingivalis* puede ocurrir durante actividades comunes como cepillarse los dientes, usar hilo dental o masticar, así como también durante procedimientos dentales (Corbella y cols., 2016). Esto produce la migración bacteriana desde la microbiota subgingival hacia una variedad de tejidos, relacionándose la periodontitis con resultados adversos del embarazo (Corbella y cols., 2016), y con otras enfermedades tales como aterosclerosis (Almeida y cols., 2018), diabetes mellitus tipo II (Liccardo y cols., 2019), enfermedades respiratorias (Moghadam y cols., 2017), enfermedad renal (Deschamps-Lenhardt y cols., 2019), artritis reumatoide (de Molon y cols., 2019) y, recientemente, con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Díaz-Zúñiga y cols., 2020; Dominy y cols., 2019; Poole y cols., 2013).

### **1.2 Enfermedad de Alzheimer y su posible asociación con la periodontitis**

Con el aumento de la longevidad y la esperanza de vida de las personas, la demencia se ha convertido en un problema de salud importante a nivel mundial. Entre las demencias, la EA es la causa más común entre las personas mayores (Wu y Nakanishi, 2014). El deterioro cognitivo de las personas afectadas con EA es lento y progresivo, y se caracteriza por la desorientación, la confusión y, finalmente, la pérdida de la memoria (Singhrao y cols., 2014). Los individuos susceptibles pueden tardar décadas en presentar los signos o síntomas clínicos de la EA, por lo que resulta importante encontrar nuevos factores de riesgo que influyan en su aparición, con el objetivo de desarrollar más y mejores intervenciones preventivas (Singhrao y cols., 2014).

La teoría de la cascada amiloide es la más aceptada para explicar el origen de la EA, la cual establece que la acumulación y agregación del péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) promueve la formación de ovillos neurofibrilares compuestos por agregados de la proteína asociada a microtúbulos Tau en su forma fosforilada (Ryder, 2020).

Los péptidos A $\beta$  se forman mediante la proteólisis de la proteína precursora amiloide (del inglés *Amyloid Precursor Protein*, APP) mediada por las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas. Estos péptidos se agregan en oligómeros solubles sinaptotóxicos (Paula-Lima y Hidalgo, 2013) y en agregados fibrilares insolubles, que son el principal componente de las placas seniles encontradas en el cerebro de los pacientes afectados por la EA (Gaur y Agnihotri, 2015). La acumulación de agregados de péptidos A $\beta$  induce una respuesta inflamatoria en las microglías, que son las células fagocíticas del sistema nervioso central, lo que genera un fenómeno proinflamatorio alrededor de la zona donde el péptido A $\beta$  se encuentre acumulado (Lane y cols., 2018). En este estado proinflamatorio, los astrocitos fisiológicos alteran su función y se comportan como un astrocito reactivo a este ambiente, generando mayor inflamación local, asociado a un desbalance energético, oxidativo y metabólico que afectará, finalmente, a la función neuronal (Lane y cols., 2018). En el soma de las neuronas, se acumula la proteína Tau en su forma hiperfosforilada, desestabilizando el citoesqueleto y causando retracción de los procesos neuronales (neurodegeneración). La neurodegeneración, los ovillos neurofibrilares y los péptidos A $\beta$  contribuirán a inducir una respuesta proinflamatoria en las células cerebrales, creando un ciclo injurioso progresivo (Lane y cols., 2018).

Recientemente, se ha propuesto que las enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la periodontitis, podrían iniciar los fenómenos neuroinflamatorios mediante la difusión de mediadores proinflamatorios desde los tejidos periodontales hacia el cerebro mediante la circulación sanguínea periférica. Así, la periodontitis podría contribuir, al menos en parte, en la etiología o en la progresión de la EA. En este contexto, distintos estudios han intentado demostrar que la periodontitis inducida por *P. gingivalis* es capaz de iniciar eventos neuroinflamatorios asociados a la EA. En un estudio en animales se demostró la presencia de *P. gingivalis* en muestras de cerebro de ratones con deficiencia de Apolipoproteína E (APOE *-/-*), lipoproteína que ha sido asociada con el *clearance* del péptido A $\beta$  (Poole y cols., 2015). Además, se ha evidenciado que los serotipos más virulentos de *P. gingivalis*, K1 y K2 inducen la periodontitis y el deterioro

cognitivo en ratas jóvenes *wild-type*, en comparación con las ratas inoculadas con los serotipos menos virulentos como K4 o la cepa carente de cápsula K- (Díaz-Zúñiga y cols., 2020). Curiosamente, en este estudio se determinó que todos los serotipos, independiente de su virulencia, pudieron ser detectados en el cerebro y, los efectos neuroinflamatorios o neuroprotectores de cada una de ellas, dependerá de la respuesta inmune que sean capaces de inducir (Díaz-Zúñiga y cols., 2020).

### **1.3 Planteamiento del problema**

La detección de *P. gingivalis* o de sus mecanismos de patogenicidad en el cerebro ha abierto la posibilidad de que la EA pueda tener un origen infeccioso que desencadene los eventos neuroinflamatorios. Los serotipos asociados con la periodontitis, K1 y K2, también podrían estar asociados con el inicio de la EA y la serotipificación podría considerarse una variable importante al momento de evaluar el pronóstico de cada paciente. En este contexto, se ha demostrado que los principales mecanismos de inmunogenicidad de *P. gingivalis* son los polisacáridos capsulares (Aduse-Opoku y cols., 2006; Vernal y cols., 2014a; Vernal y cols., 2014b). Aunque varios estudios utilizan el LPS purificado de *P. gingivalis*, su inmunogenicidad en modelos animales depende del reconocimiento por el receptor CD14, lo que no ocurre en las células humanas (Sugawara y cols., 2000; Tada y cols., 2002). A pesar de que CD14 es el principal receptor de LPS, los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis* son reconocidos de forma diferencial por el receptor tipo toll (del inglés, *T-cell receptor*, TLR)-4 (Díaz-Zúñiga y cols., 2015). La activación de este receptor en los fagocitos induce la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), el cual inicia la transcripción de una serie de moléculas asociadas a los eventos proinflamatorios o inmunomoduladores, dependiendo de las señales co-estimuladoras y las citoquinas circundantes en el medio. Así, una microglía puede diferenciarse a un fenotipo proinflamatorio o M1 caracterizado por la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , además de metaloproteinasas de matriz (del inglés *Matrix Metalloproteinases*, MMP)-2 y MMP-9 y especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen*

species, ROS) y nitrógeno (del inglés *reactive nitrogen species*, RNS). Por el contrario, las microglías también se podrán diferenciar a un fenotipo modulador o M2, caracterizado por la producción de IL-4, IL-10, enzimas antioxidantes y moléculas que favorecen la recuperación de la integridad de los tejidos (Yang y cols., 2018). Recientemente, se ha propuesto que los factores de transcripción supresores de la señalización de citoquinas (del inglés *Suppressor of cytokine signaling*, SOCS) y el transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés *Signal transducer and activator of transcription*, STAT) podrían estar involucrados en esta respuesta diferencial (Braun y cols., 2013, Fan y cols., 2013; Carow y Rottenberg, 2014). Una explicación que permite reunir todas estas vías es la activación de TLR-4 por parte de los serotipos de *P.gingivalis*, que mediante NF- $\kappa$ B y el factor de liberación de interferón (IRF) inducirían o inhibirían diferencialmente según su virulencia la expresión de IL-1 $\beta$ , IFN y SOCS3. Esto activaría a STAT3, lo que podría inducir una mayor producción de ROS y una regulación negativa de la superóxido dismutasa (SOD)-2 (Fan y cols., 2013; Carow y Rottenberg., 2014; Muñoz y cols., 2018; Cevy y cols., 2019). SOD2 es una enzima antioxidante mitocondrial, que tiene como función catalizar los agentes oxidantes producidos por la fosforilación oxidativa (El Assar y cols., 2013). Las células cerebrales que detectan a *P. gingivalis* mediante sus receptores TLR4 se encuentran hiperreactivas e inflamadas, lo que sugiere una mayor actividad mitocondrial y requerimiento de ATP, llevando a la célula a producir mayores niveles de ROS, tales como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con la consecuente producción de radicales libres. Al haber una regulación negativa de la función de SOD2 en las células cerebrales en presencia de los serotipos capsulares más virulentos de *P. gingivalis*, se estaría en presencia de una mayor oxidación de los lípidos de la membrana plasmática producto de las ROS, lo que genera el subproducto malondialdehído (MDA), un biomarcador de estrés oxidativo (Tsikas, 2017).

Recientemente, se ha descrito que IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-2 y MMP-9 están involucradas en la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) (Bowman y cols., 2018). Incluso se ha detectado a *P. gingivalis* en el líquido cerebroespinal (LCE) y el cuarto ventrículo cerebral de pacientes con EA (Dominy y cols., 2019;

Poole y cols., 2013). Diferentes estudios han demostrado que el LPS purificado de cepas no encapsuladas de *P. gingivalis* induce neuroinflamación y deterioro cognitivo en modelos de animales transgénicos o *wild-type* (Singh Rao y cols., 2015; Ishida y cols., 2017; Wu y cols., 2017; Ding y cols., 2018; Ilievsky y cols., 2018; Zhang y cols., 2018; Dominy y cols., 2019). Además, se ha demostrado que *P. gingivalis* indujo una patología similar a la EA en ratas Sprague-Dawley *wild-type* de manera serotipo dependiente (Díaz-Zúñiga y cols., 2020). A pesar de las conocidas diferencias en las respuestas celulares y moleculares generadas por diferentes serotipos de *P. gingivalis* en las células inmunes y el rol propuesto de *P. gingivalis* en la EA, los posibles efectos de los distintos serotipos de *P. gingivalis* no se han explorado en las células cerebrales del hipocampo, las que incluyen microglías, astrocitos y neuronas. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos *in vitro* de los diferentes serotipos capsulares de *P. gingivalis* en la inducción de respuestas proinflamatorias y oxidativas en diferentes tipos de células cerebrales del hipocampo utilizando cultivos primarios de rata.

## **2. Hipótesis.**

Los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* inducen en las células cerebrales del hipocampo una respuesta proinflamatoria, caracterizada por el incremento en las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y TNF- $\alpha$ , las moléculas MMP-2 y MMP-9 y los receptores TLR4, asociado al incremento en los niveles de *Stat3*, en comparación con el serotipo menos virulento K4.

## **3. Objetivo general.**

Caracterizar la respuesta inflamatoria y oxidativa de las células cerebrales del hipocampo derivadas de ratas Sprague-Dawley estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*.

## **4. Objetivos específicos.**

Cuantificar los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$ , los receptores TLR-2 y TLR-4, los factores de transcripción *Socs3* y *Stat3* y la enzima *Sod2* en cultivos de células cerebrales del hipocampo de ratas Sprague-Dawley estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* mediante qPCR.

Cuantificar los niveles de secreción de las MMP-2 y MMP-9 y las citoquinas IL- 1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en cultivos de células cerebrales del hipocampo de ratas Sprague-Dawley estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* mediante test de ELISA.

Cuantificar los niveles de producción de MDA en cultivos de células cerebrales del hipocampo de ratas Sprague-Dawley estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*.

## **5. Metodología**

### **5.1 Cultivo bacteriano y curva de crecimiento bacteriano**

En el presente estudio se utilizaron cepas encapsuladas de *P. gingivalis*, usadas en estudio previos, para estimular a los distintos cultivos celulares (Díaz-Zuñiga y cols., 2014; Melgar-Rodríguez y cols., 2016; Vernal y cols., 2008; Vernal y cols., 2009). La estimulación celular se realizó con los serotipos K1 (cepa W50), K2 (cepa HG184) y K4 (cepa ATCC 49417<sup>TM</sup>) de *P. gingivalis* inactivadas durante 30 min a 60°C y a una multiplicidad infectante incremental de 10:1 (MOI: -1). Los cultivos celulares no estimulados (n.e.) se consideraron como controles.

### **5.2 Cultivo de microglías**

Los cultivos de las microglías de rata se obtuvieron tal como se describió anteriormente (Muñoz y cols., 2018; Díaz-Zuñiga y cols., 2019). La corteza cerebral de crías de rata Sprague-Dawley de 1-3 días de edad se disecaron en solución salina tamponada de Hank y se digirieron en tripsina al 0,25% suplementada con 0,5 mg/ml de DNAasa I. Los cultivos mixtos de astrocitos/microglías se incubaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10%. Después de 13 días en cultivo, las células se agitaron vigorosamente en un agitador a 2 xg durante 72 horas para separar las microglías. Luego estas fueron sembradas en medio complementado con DMEM hasta un 80% de confluencia. Posteriormente las células se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^5$  cels/mL.

### **5.3 Cultivo enriquecido de neuronas**

Cultivos primarios de hipocampo enriquecidos con neuronas se prepararon a partir de embriones de 18 días obtenidos de ratas *Sprague-Dawley* preñadas como se describió anteriormente (Paula-Lima y cols., 2005). Brevemente, después de la eutanasia, los cerebros se colocaron en una placa que contiene una solución de glucosa de Hank y los hipocampos se desagregaron mecánicamente. La suspensión celular se centrifugó y resuspendió en DMEM suplementado con suero de caballo al 10% y se sembró en placas tratadas con polilisina. Después de 40

min, se reemplazó el DMEM por un medio Neurobasal suplementado con B-27™. Luego, las células se mantuvieron *in vitro* durante 18-21 días a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% antes de las manipulaciones experimentales. Todos los protocolos experimentales utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética para la Investigación Animal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Protocolo 17085-ODO-UCH, Anexo N°1).

#### **5.4 Purificación de RNA total y expresión de moléculas mediante qPCR**

La purificación del RNA total de las muestras y la síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó según los protocolos descritos previamente (Díaz-Zúñiga y cols., 2015a; Díaz-Zúñiga y cols., 2015b; Díaz-Zuñiga y cols., 2014; Melgar-Rodríguez y cols., 2016). La expresión de los mRNA de las moléculas IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF-α, los receptores TLR2 y TLR4, y los factores *Socs3*, *Stat3* y la enzima *Sod2* se analizaron a partir de 50 ng de cDNA mediante qPCR, utilizando partidores específicos (Anexo N°2), un *kit* KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, USA), según las indicaciones del fabricante. Para el cálculo de los niveles de expresión relativa se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno y las células no estimuladas como control negativo. La amplificación por qPCR se realizó siguiendo los siguientes ciclos de amplificación: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos cada uno de 95°C por 15s y 60°C por 30s, tal como se realizó previamente (Díaz-Zúñiga y cols., 2015a; Díaz-Zúñiga y cols., 2015b; Díaz-Zuñiga y cols., 2014; Melgar-Rodríguez y cols., 2016).

#### **5.5 Secreción de moléculas mediante ELISA**

A partir de 100 ó 200 µL de los sobrenadantes se cuantificó la secreción de las moléculas IL-1β, IL-6, TNF-α, MMP-2 y MMP-9 mediante ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).



### **5.6 Cuantificación de malondialdehído**

Para evaluar la acción de los agentes oxidantes inducidos durante la neuroinflamación, se realizó un método indirecto de cuantificación de malondialdehído (MDA) mediante la detección de sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo las indicaciones del fabricante (R&DSYSTEMS).

### **5.7 Análisis de datos**

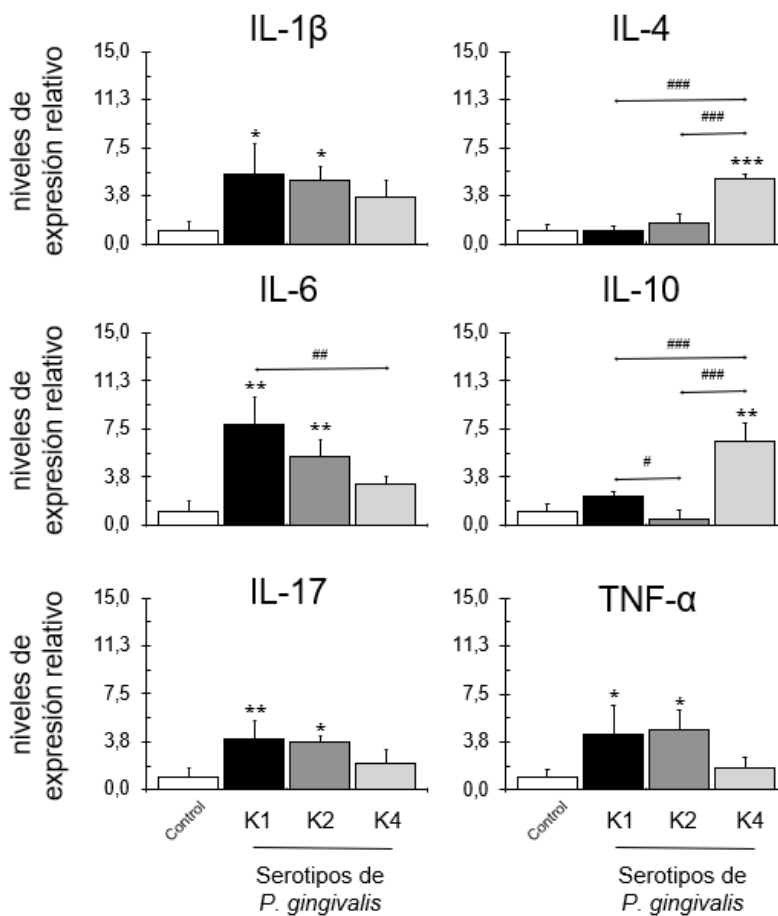
Los datos de los niveles de secreción y expresión de citoquinas se escribieron como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar en valores de concentración (pg/ml) y niveles relativos de expresión, respectivamente. La cuantificación de MDA se representa como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de la concentración ( $\mu$ M). La normalidad de distribución de los datos se determinó usando la prueba de *Shapiro-Wilk*. Los datos se analizaron utilizando las pruebas ANOVA-Tukey. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando *p-value* < 0,05.



## 6. Resultados

### 6.1 Expresión de citoquinas y receptores en microglías

Para evaluar si los diferentes serotipos de *P. gingivalis* inducen una respuesta inflamatoria distinta en las células inmunes cerebrales, se estimularon microglías con las cepas W50 (serotipo K1), HG184 (serotipo K2) y ATCC®49417™ (serotipo K4), durante 48 h y luego, mediante qPCR se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF $\alpha$  (Fig. N°1).

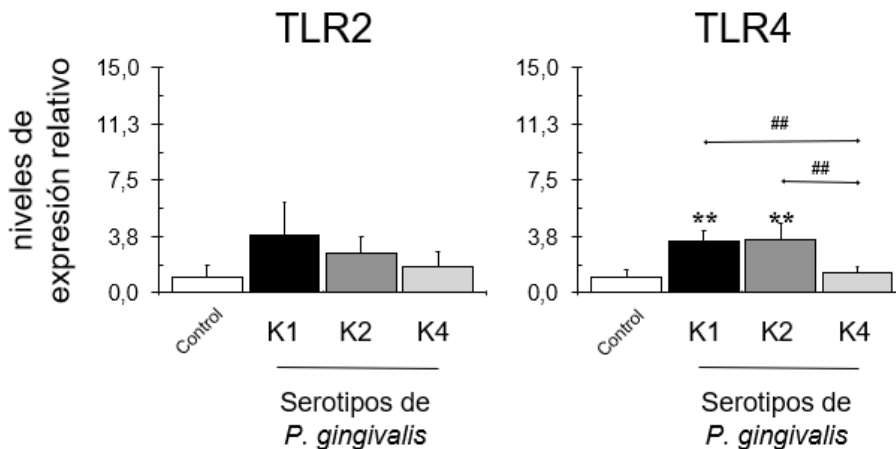


**Figura N°1. Expresión de mediadores proinflamatorios en cultivos de microglías.** A partir de 8 cultivos de microglías estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF $\alpha$ , mediante qPCR siguiendo la metodología del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno y las células no estimuladas como control negativo. \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos

experimentales. IL: interleuquina, TNF: tumor necrosis factor. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ .

En las microglías estimuladas con el serotipo K1 y K2 se observó un aumento en la expresión de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y TNF $\alpha$  en comparación con el grupo control. Además, no se detectaron diferencias entre las condiciones estimuladas con el serotipo K1 o K2. En los cultivos de microglías estimuladas con el serotipo K4 se observaron menores niveles de expresión de mRNA en comparación con los serotipos K1 o K2, sin ser significativos. Además, para las citoquinas inmunomoduladores IL-4 e IL-10 se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de mRNA de los cultivos estimulados con el serotipo K4 en comparación con las otras condiciones experimentales y control.

Luego, debido a que las microglías son células fagocíticas y poseen receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *pattern recognition receptors*, PRR), como los macrófagos o células dendríticas, se evaluaron los niveles de expresión de los receptores TLR2 y 4 (Fig. N°2). En las microglías estimuladas con los serotipos K1 o K2, se observó un incremento en los niveles de expresión de mRNA del receptor TLR4 en comparación al grupo control y a las



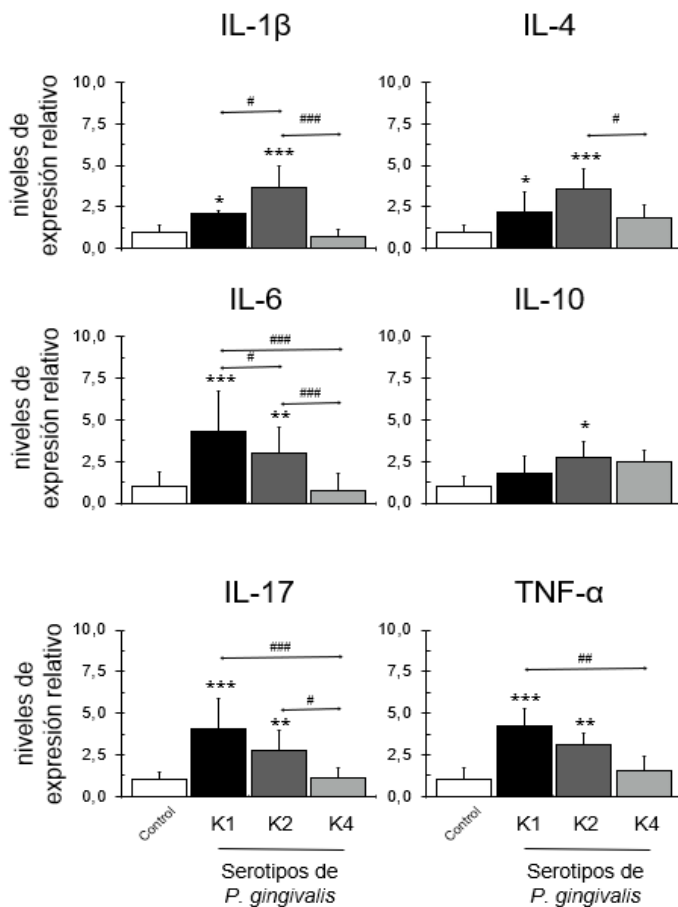
células estimuladas con el serotipo K4. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de mRNA del receptor TLR2.

**Figura N°2. Expresión de receptores TLR en cultivos de microglías.** A partir de 8 cultivos de microglías estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los

niveles de expresión de mRNA de TLR2 y TLR4, mediante qPCR siguiendo la metodología del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno y las células no estimuladas como control negativo. \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. TLR: toll like receptor. \*\* $p < 0,01$ , ### $p < 0,01$ .

## 6.2 Expresión de citoquinas y receptores en cultivos enriquecidos de neuronas

Posteriormente, los cultivos enriquecidos de neuronas fueron estimulados



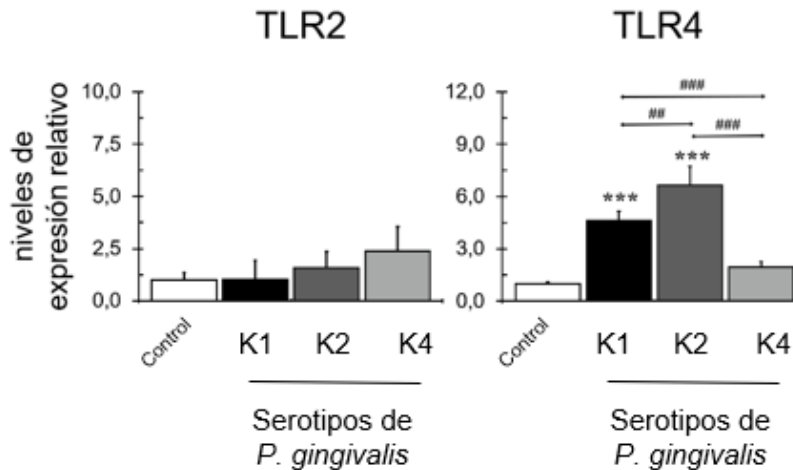
con los serotipos K1, K2 o K4 de *P. gingivalis*, de manera similar a como fueron estimuladas las microglías (Fig. N°3). Así, se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión de mRNA de IL-1β, IL-6, IL-17 y TNF-α en los cultivos estimulados con los serotipos K1 y K2 en comparación con el grupo control. En el caso de los cultivos estimulados con el serotipo K4 no se observaron diferencias con el grupo control. Al evaluar diferencias entre los grupos experimentales, se observó un incremento en los

niveles de expresión de mRNA de IL-1β en el cultivo estimulado con K2 en comparación con K1. Por el contrario, en el caso de los niveles de expresión de IL-6 se observó un incremento en la estimulación con el serotipo K1 en comparación con K2.

**Figura N°3. Expresión de mediadores proinflamatorios en cultivos enriquecidos de neuronas.** A partir de 8 cultivos mixtos hipocampales estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de IL-1β, IL-4, IL-6,

IL-10, IL-17 y TNF $\alpha$ , mediante qPCR siguiendo la metodología del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno y las células no estimuladas como control negativo. \*representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. IL: interleuquina, TNF: tumor necrosis factor. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ .

Luego, al igual que con las microglías, se evaluó la expresión de mRNA de los receptores TLR2 y TLR4 en los cultivos enriquecidos de neuronas con los

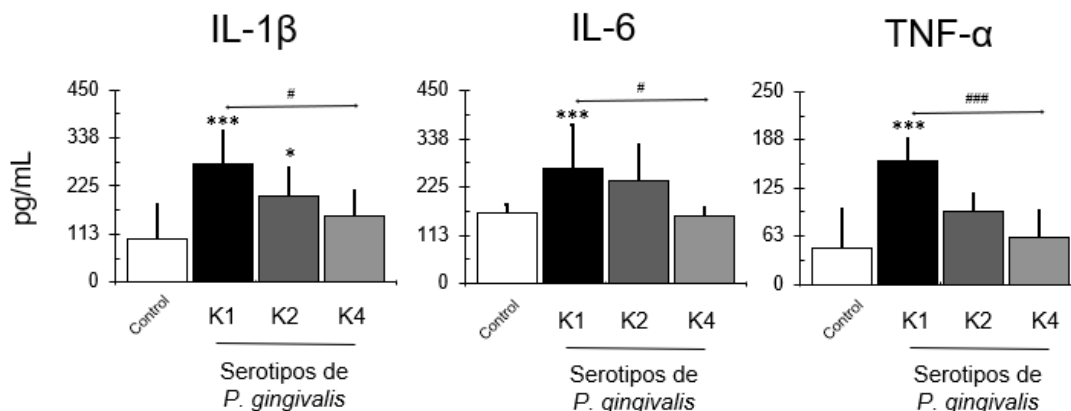


diferentes serotipos de *P. gingivalis* (Fig. N°4). Se observó un aumento significativo en la expresión de mRNA de TLR4 en los cultivos estimulados con K1 y K2, en comparación con el grupo control y el estimulado con el serotipo K4. Además, se detectó un mayor incremento de TLR4 cuando los cultivos se estimularon con el serotipo K2 en comparación con el serotipo K1. No hubo diferencias significativas para los niveles de expresión de mRNA de TLR-2 en ninguno de los grupos experimentales y control.

**Figura N°4. Expresión de receptores TLR en cultivos enriquecidos de neuronas.** A partir de 8 cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de TLR2 y TLR4, mediante qPCR siguiendo la metodología del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno y las células no estimuladas como control negativo. \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. TLR: toll like receptor. \*\*\* $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ .

### 6.3 Cuantificación de moléculas en cultivos enriquecidos de neuronas

Posteriormente, debido a que se ha descrito que las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y

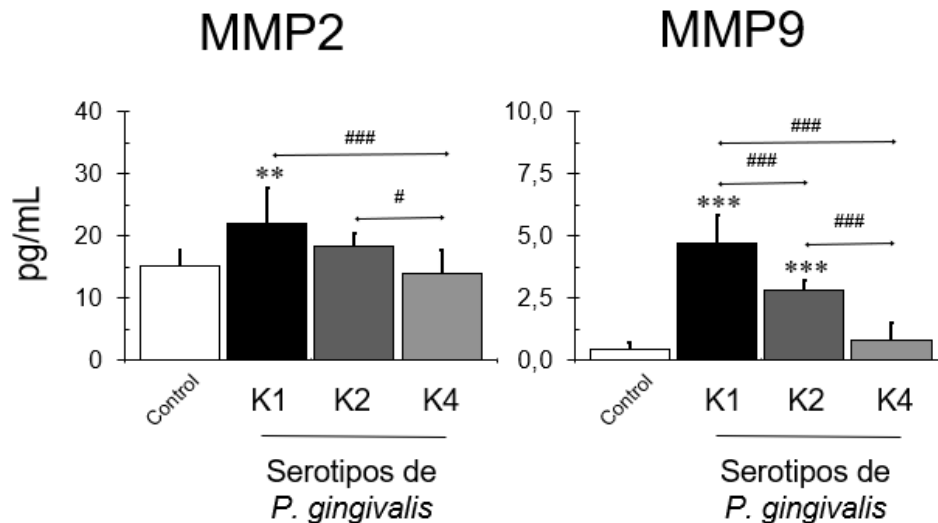


TNF- $\alpha$ , y las MMP2 y MMP9 están involucradas en la ruptura de la BHE, los niveles producidos de estos mediadores se cuantificaron mediante ELISA en los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con las distintas cepas de *P. gingivalis* (Fig. N°5 y N°6). Se detectó un incremento significativo en la secreción de IL-1 $\beta$  en los cultivos estimulados con el serotipo K1 y K2 en comparación con el otro grupo experimental y el grupo control. También hubo un aumento significativo en la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los cultivos estimulados con K1 en comparación con el grupo control y K4, y se detectó un leve aumento de estas citoquinas al estimular los cultivos con K2, pero este no se consideró significativo.

**Figura N°5. Cuantificación de citoquinas en cultivos enriquecidos de neuronas.** A partir de 8 cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  mediante test de ELISA. \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. IL: interleuquina, TNF: tumor necrosis factor. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ .

Con respecto a la cuantificación de MMP, se observó un aumento significativo en los niveles de secreción de MMP2 y MMP9 en los cultivos estimulados con el serotipo K1 en comparación con el grupo control y los estimulados con el serotipo K4. El serotipo K2 indujo un incremento significativo en la secreción de MMP9, en relación con el grupo control. Además, al comparar la

secreción de MMP9 en los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con el serotipo K1 se detectó un incremento significativo en comparación con los cultivos estimulados con el serotipo K2 y K4.

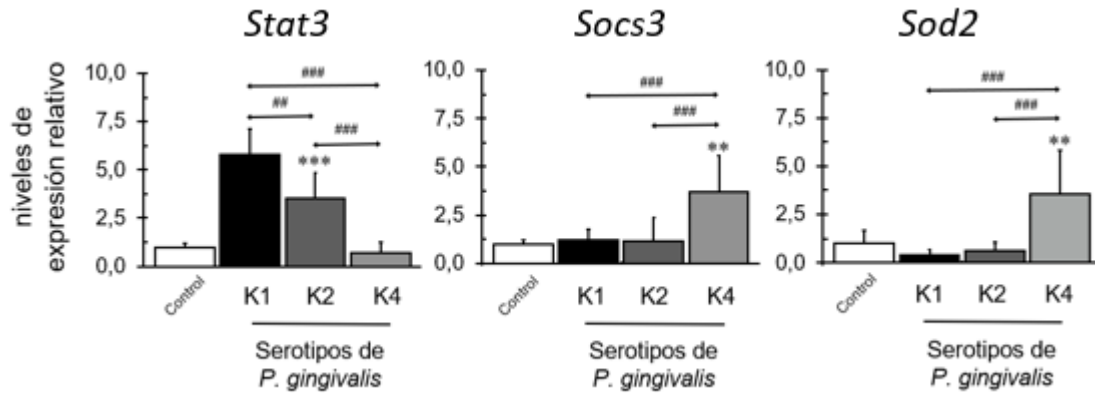


**Figura N°6. Cuantificación de proteasas en cultivos enriquecidos de neuronas.** A partir de 8 cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de secreción de MMP2 y MMP9 mediante test de ELISA. \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. MMP: matrix metalloproteinases. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ .

#### 6.4 Factores de transcripción en cultivos enriquecidos de neuronas

También se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción *Socs3*, *Stat3* y la enzima *Sod2* mediante qPCR (Fig. N°7). En este caso se identificó un aumento significativo de *Socs3* en los cultivos estimulados con el serotipo K4 en comparación con todas las otras condiciones. En el caso de *Stat3*, hubo un incremento significativo en los niveles de expresión de mRNA en los cultivos estimulados con K2 en comparación con las células estimuladas con el serotipo K4 y grupo control, mientras que K1 generó un mayor incremento de *Stat3* en comparación a K2 y K4. Para *Sod2* hubo un aumento significativo en la expresión de mRNA ante la estimulación con el serotipo K4.

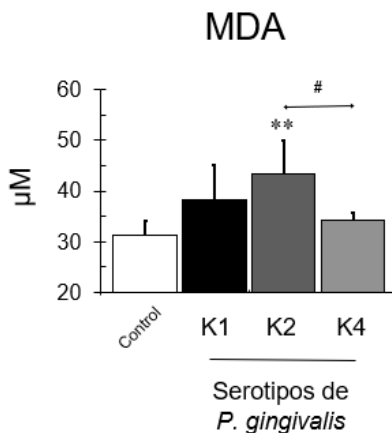




**Figura N°7. Expresión de factores de transcripción.** A partir de cultivos mixtos hipocampales estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de Stat3, Socs3 y Sod2 mediante qPCR siguiendo la metodología del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno y las células no estimuladas como control negativo. \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. Socs: suppressor of cytokine signaling, Stat: signal transducer and activator of transcription. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ .

### 6.5 Cuantificación de MDA en cultivos enriquecidos de neuronas.

Finalmente, se cuantificó la concentración de MDA para evaluar si los agentes oxidantes inducidos durante la neuroinflamación pueden afectar la membrana plasmática. Aquí ocurrió que los cultivos estimulados con el serotipo K2 fueron los que presentaron una mayor concentración de MDA, y los cultivos estimulados con K1 presentaron un leve aumento de concentración sin ser significativo.



**Figura N°8. Cuantificación de MDA en cultivos enriquecidos de neuronas.** A partir de 8 cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de concentración de MDA mediante la detección de sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS). \* representa las diferencias entre los grupos experimentales con su control y # representa las diferencias entre los grupos experimentales. MDA: malondialdehído. \*\* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ .

## 7. Discusión

Los antígenos capsulares de *P. gingivalis* tienen diferentes potenciales de virulencia y su diversidad estructural determina la virulencia e inmunogenicidad de cada serotipo. En el presente estudio, se evaluó la respuesta de microglías y cultivos enriquecidos de neuronas del hipocampo de ratas Sprague-Dawley frente a los serotipos K1, K2 y K4 de *P. gingivalis*. Los resultados demuestran que existe un aumento significativo de mRNA de los mediadores proinflamatorios IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en ambos cultivos al ser expuestos al serotipo K1 y, en menor medida, ante el serotipo K2. En microglías estimuladas con el serotipo K4 hubo un aumento en las citoquinas inmunomoduladoras IL-4 e IL-10. Al evaluar la expresión de mRNA de TLR4, hubo un incremento en ambos cultivos expuestos a los serotipos más virulentos K1 y K2. Además, en los cultivos enriquecidos de neuronas, ambos serotipos K1 y K2 indujeron un aumento en la secreción de MMP9, y K1 también aumentó en los niveles de MMP2. También se evidenció un aumento de *Stat3* en los cultivos enriquecidos de neuronas al ser estimulados con los serotipos K1 o K2, mientras que K4 provocó un aumento de *Socs3*. Finalmente, en los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con el serotipo K4 se observó un aumento de *Sod2* y con el serotipo K2 se observó un aumento de MDA.

Las microglías son células que se encuentran en todas las regiones del cerebro y se encargan de la respuesta inmune. Una de sus principales funciones consiste en la inspección constante del cerebro, siendo muy sensibles a los cambios en su entorno. Las microglías se diferencian a un fenotipo proinflamatorio M1 o a un fenotipo modulador M2, dependiendo del estímulo que detecten sus receptores. Cuando el cerebro se ve afectado por una patología, las microglías M1 sufren cambios morfológicos, acortando sus procesos microgliales, agrandando su cuerpo celular, y proliferando en el sitio afectado. De esta forma, las microglías secretan mediadores proinflamatorios con el objetivo de desencadenar la respuesta inmune que devuelva la homeostasis al cerebro (Nakajima y Kohsaka, 2001).

El estado activado de la microglia puede afectar a la progresión de la EA. En una revisión de la literatura realizada por Hansen y cols. (2018) se planteó que la función de las microglías en el cerebro es normalmente protectora, ya que actúa como fagocito para mantener la homeostasis tisular y un espacio extracelular limpio de péptido A $\beta$ , previniendo así la EA (Hansen y cols., 2018). En ciertas ocasiones, debido al envejecimiento o a la susceptibilidad genética, la función microglial se puede volver inadecuada para prevenir la EA. A medida que se acumulan las especies amiloides tóxicas en la matriz cerebral y la proteína Tau en las neuronas, la microglia responde generando un estado inflamatorio, secretando citoquinas proinflamatorias y alterando la sinapsis (Hansen y cols., 2018).

En este estudio se expusieron los cultivos de microglías a diferentes cepas de *P. gingivalis* pertenecientes a los serotipos K1 (W50), K2 (HG184) y K4 (ATCC®49417™) para cuantificar los niveles de expresión de mRNA de citoquinas inducidos por la presencia de este patógeno periodontal. En ellas, se confirmó que el serotipo K1 es el más virulento, seguido por el serotipo K2, induciendo un aumento en los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y TNF- $\alpha$ . Estos resultados indican que los serotipos más virulentos de *P. gingivalis*, K1 y K2, son los que inducen una diferenciación de las microglías hacia un fenotipo M1. Por el contrario, los cultivos que fueron expuestos al serotipo K4, demostraron un aumento en los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas IL-4 e IL-10, que son moléculas relacionadas con la modulación de la respuesta inmune, lo que sugiere una diferenciación de las microglías hacia un fenotipo M2. Con esto, se demuestra que las microglías en presencia de los serotipos más virulentos de *P. gingivalis* generan un estado proinflamatorio, lo que podría afectar la función microglial protectora descrita en los estados iniciales de la EA.

Además, se analizaron los niveles de expresión de mRNA de los receptores TLR2 y TLR4 para determinar si *P. gingivalis* es reconocido diferencialmente en las microglías y las células cerebrales, tal como fue demostrado en otras células inmunes (Díaz-Zúñiga y cols., 2015). La respuesta observada en ambos cultivos

fue similar a la descrita para otras células inmunes: distintos serotipos inducen una respuesta diferencial dependiendo de su virulencia e inmunogenicidad. Así, mientras los serotipos más virulentos K1 y K2 produjeron un incremento en la expresión de mRNA de TLR4, no hubo cambios en los niveles de TLR2.

La reactividad astrocítica es un cambio funcional y morfológico de los astrocitos como resultado de una variedad de lesiones cerebrales. Esta se caracteriza por una mayor expresión génica de proteínas estructurales, hipertrofia del soma y mayor proliferación, que es particularmente importante en la formación de una cicatriz astrocítica alrededor de las lesiones tisulares (Choi y cols., 2020). Los astrocitos se han clasificado en A1 y A2 según su patrón de expresión génica, que indica que los astrocitos A1 tienen funciones y morfología dañinas, mientras que los astrocitos A2 tienen funciones neuroprotectoras. Liddelow y cols (2017) en su estudio demostraron que los astrocitos A1 pueden ser inducidos por las microglías M1 mediante la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y el complemento componente C1q. Además, demostraron que, en trastornos neurodegenerativos como la EA, se detectan más astrocitos A1 en el cerebro que astrocitos A2. En el presente estudio, se observó un incremento en los niveles de expresión de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y TNF- $\alpha$  en los cultivos enriquecidos de neuronas del hipocampo, donde el serotipo K1 evidenció una mayor inmunogenicidad seguido del serotipo K2. En efecto, la presencia de estos mediadores proinflamatorios es suficiente para generar cambios en el fenotipo de las microglías y los astrocitos (Liddelow y cols., 2017). Así, los resultados sugieren que, en estos cultivos enriquecidos de neuronas, la activación de las microglías M1 podrían inducir la activación de los astrocitos hacia un estado neurodegenerativo y dañino para las funciones cerebrales, ya que los astrocitos A1 pierden la capacidad de promover la supervivencia neuronal, el crecimiento, la sinaptogénesis y la fagocitosis. (Liddelow y cols., 2017).

Un hallazgo importante que destacar fue el aumento en los niveles de secreción de IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con el serotipo K1, y un aumento de IL-1 $\beta$  e IL-17 en los cultivos

estimulados con el serotipo K2, ya que estas citoquinas se asocian con un aumento en la permeabilidad de la BHE, lo que puede contribuir a una mayor progresión de la EA. En estudios experimentales en ratas se observaron cambios en la morfología de los astrocitos en contacto con los vasos sanguíneos de la BHE cuando se encuentran cercanos a depósitos de péptido A $\beta$  en el cerebro con EA (Merlini y cols., 2011). Esto ocurre porque durante la respuesta inflamatoria inducida por los depósitos de péptido A $\beta$ , los astrocitos secretan citoquinas y quimioquinas que atraen leucocitos circulantes dentro del cerebro a través de la BHE y estimulan un proceso inflamatorio crónico. Esto a su vez, activa a las microglías que se encuentran en la cercanía, las que secretan mediadores proinflamatorios que promueven la neuroinflamación que estimula la progresión de la EA (Zenaro y cols., 2017).

La BHE es una barrera física y metabólica que aísla al sistema nervioso central (SNC) del resto del organismo. Está conformada por células endoteliales especializadas que interactúan con pericitos, astrocitos, neuronas, microglías y componentes de la matriz extracelular (Marchi y cols., 2004). TNF- $\alpha$  es un mediador proinflamatorio capaz de generar cambios en permeabilidad de la BHE, ya que induce la producción de IL-1 $\beta$  e IL-6, la muerte por apoptosis neuronal, la disfunción neuroglial y el reclutamiento de más células inflamatorias (Von Bernhardi, 2004). En condiciones patológicas, la mayor expresión de citoquinas proinflamatorias en el cerebro disminuye la expresión de uniones estrechas (del inglés *Tight junctions*, TJ) en la BHE, produciendo un aumento en la permeabilidad y trans migración celular (Hickey, 2001). Las TJ son estructuras dinámicas entre las células endoteliales de la BHE que controlan la difusión de moléculas desde la circulación sanguínea al cerebro. Las proteínas de las TJ están sujetas a cambios en la expresión, la ubicación paracelular, la modificación postraducciona l y las interacciones proteína-proteína en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. La ocludina, la claudina-5 y la zonula occludens-1 (zo-1), son las principales proteínas de la BHE y se consideran indicadores sensibles de los estados funcionales normales y alterados (Yang y Rosenberg, 2011). En un modelo *in vitro* de BHE se demostró que la presencia incrementada de IL-6, IL-17A y TNF- $\alpha$

indujo su permeabilización, caracterizada por la disminución en la expresión de ZO-1 y claudina-5 (Voirin y cols., 2020).

En otras infecciones de origen bacteriano como el *Meningococo* y *Escherichia coli* se observó que la infección resultante induce un aumento en el transporte vesicular y una separación de las TJ, lo que desencadena la liberación tanto de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  como de MMPs (Kim, 2001; Paul y cols., 1998). En efecto, en el presente estudio se demostró un aumento en los niveles de expresión de mRNA de MMP2 y MMP9, con un incremento diferencial entre los cultivos tratados con los serotipos K1 sobre los tratados con el serotipo K4, mientras que el serotipo K2 causó un aumento únicamente de MMP9. Esto es importante de mencionar, ya que las MMP2 y MMP9 tienen gran especificidad de sustrato por las TJ de la BHE (Liu y Rosenberg, 2005). Después de un accidente cerebrovascular, se activan las MMPs y éstas permeabilizan la BHE por medio de la degradación de las proteínas claudina-5 y ocludina (Yang y Rosenberg, 2011). Así, en presencia del serotipo K1 y K2, las células del hipocampo secretarían mayor concentración de MMP2, MMP9 y mediadores proinflamatorios, lo que inducirá un aumento en la permeabilidad de la BHE, atrayendo células del sistema inmune que perpetúan la inflamación crónica, generando el estado neuroinflamatorio que favorece la progresión de la EA.

Una explicación del comportamiento de los cultivos enriquecidos de neuronas frente a los serotipos de *P. gingivalis* es el hecho de que la ruta SOCS3-STAT3 se activó o inhibió diferencialmente. Se sabe que tanto IL-10 como IL-6 inducen la activación de STAT3, generando diferentes respuestas celulares, donde la estimulación con IL-6 promueve una respuesta proinflamatoria y, la señalización con IL-10 promueve una respuesta antiinflamatoria. En el presente estudio se observó un aumento considerable de *Stat3* en presencia del serotipo K1, seguido de una leve variación con el serotipo K2 y sin cambios respecto al serotipo K4.

STAT3 es activado por IL-6 mediante la vía JAK-STAT3, y varias citoquinas, factores de crecimiento y hormonas utilizan esta vía para transmitir su información

al núcleo. En este caso, el receptor de citoquina se activa después de unirse a IL-6, activando a JAK, quien se une al receptor de IL-6 y lo fosforila. Los STAT luego se unirán al receptor fosforilado de IL-6 y sufrirán una fosforilación mediada por JAK. STAT fosforilado sufrirá un cambio conformacional, se separará del receptor y luego se unirá a otro STAT fosforilado, formando dímeros de STAT que translocan al núcleo uniéndose a los promotores de los genes blanco, promoviendo su transcripción (Levy y Darnell, 2002; Murray, 2007).

En conjunto, los datos del presente estudio sugieren que al estimular los cultivos enriquecidos de neuronas con el serotipo K1 o K2, se producen mayores niveles de IL-6, y esta secreción activaría la vía JAK-STAT, lo que explicaría, al menos en parte, el aumento en los niveles de STAT3. Eso implica que, en las microglías y astrocitos, STAT3 puede estar induciendo señales en el núcleo que inhiben la muerte por apoptosis e inducen la supervivencia, perpetuando la neuroinflamación y el fenotipo proinflamatorio. En el estudio de Reichenbach y cols. (2019) se demostró que STAT3 es inductor de la astrogliosis reactiva, la cual está relacionada con el progreso de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Se encontró que ratones APP/PS1 deficientes en STAT3 presentan menores niveles de péptido A $\beta$ , ya que su deficiencia induce que las microglías cercanas a la placa amiloide tengan una morfología más compleja, internalicen más péptido A $\beta$  e incrementen las vías para su eliminación, y que los astrocitos produzcan menos citoquinas proinflamatorias (Reichenbach y cols., 2019). Otro estudio demostró que la inyección intraperitoneal de *Stat3ic* —un inhibidor selectivo de STAT3— posterior a la exposición de LPS, disminuye la activación de las microglías hipocámpales y reduce los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Milot y cols., 2020).

Por otro lado, se encontró que en cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los serotipos K1 o K2, los niveles de mRNA de *Socs3* se mantuvieron sin variaciones. Contrariamente, cuando los cultivos fueron estimulados con el serotipo K4, se observó una respuesta completamente diferente, con un aumento en los niveles de *Socs3* y sin cambios en *Stat3*.

Curiosamente, se ha demostrado que el aumento de los niveles de IL-10 podría estimular los niveles de expresión de *Socs3*, induciendo la inhibición de los niveles de expresión de *Stat3*. SOCS3 regula la activación de STAT3 en respuesta a las citoquinas, uniéndose al receptor de citoquinas gp130, que es el receptor de IL-6. La capacidad de SOCS3 para unirse simultáneamente a JAK y gp130 explica la especificidad de la supresión. SOCS3 se une a JAK cuando está unido a gp130, impidiendo que STAT3 se pueda unir al receptor, lo que inhibe la capacidad de JAK de fosforilar a STAT3 para que se pueda traslocar al núcleo. Los estudios en diferentes modelos de ratones demuestran la importancia de SOCS3 para restringir la inflamación y permitir niveles óptimos de respuestas protectoras contra las infecciones (Carow y Rottenberg, 2014).

El cerebro es un órgano rico en fosfolípidos, que son fundamentales para los procesos de neurotransmisión y la base de las interacciones neuronales y la cognición. Los fosfolípidos cerebrales contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico. Se ha encontrado que a medida que aumenta la producción de ROS, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el cerebro disminuye gradualmente (Chen y Zhong, 2014). En el presente estudio se observó un aumento en los niveles de expresión de mRNA de *Sod2* en los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con el serotipo K4, lo que se correlacionó con una baja concentración de MDA, sugiriendo su rol en las vías de oxidación. Dado que la inflamación crónica induce un desequilibrio oxidativo en los astrocitos (Muñoz y cols., 2018), se determinó la lipoperoxidación presente en cultivos enriquecidos de neuronas, utilizando el ensayo TBARS. El serotipo K1, que indujo una mayor respuesta proinflamatoria, indujo solo una tendencia de aumento en la concentración de MDA. Por el contrario, el serotipo K2 indujo una respuesta proinflamatoria menor que K1, pero indujo un aumento significativo en la concentración de MDA, en comparación con las otras condiciones. En conjunto, estos datos sugieren que después de 48 horas de estimulación con K2, los cultivos enriquecidos de neuronas experimentan un desequilibrio oxidativo con la peroxidación de los lípidos de la membrana. Se ha visto que el estrés oxidativo



participa en el desarrollo de la EA al promover el depósito de péptido A $\beta$ , la hiperfosforilación de Tau y la posterior pérdida de sinapsis y neuronas. La relación entre el estrés oxidativo y la EA sugiere que el estrés oxidativo es una parte esencial del proceso patológico de la enfermedad (Chen y Zhong, 2014).

*P. gingivalis* está siendo cada vez más investigada, ya que se ha visto cómo su presencia en la microbiota oral puede influir en diversas enfermedades crónicas no transmisibles, tales como aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, estrés, partos prematuros y bajo peso al nacer (Orrego-Cardozo y cols., 2015) y, recientemente, con la EA. Es necesario avanzar en estudios humanos, ya que por ahora la mayor cantidad de evidencia respecto de la relación de *P. gingivalis* con la EA se presenta en estudios *in vitro* o *in vivo*. Debido a ello es importante considerar que de este estudio solo se pueden obtener inferencias de una posible relación entre *P. gingivalis* y la EA, y para poder obtener conclusiones de causalidad directa entre ambas variables es necesario avanzar en estudios experimentales o clínicos. Además, la evidencia actual es muy heterogénea, lo que dificulta comparar los resultados de este estudio con otras bases de datos. Sería importante establecer el uso de los serotipos más inmunogénicos en vez de utilizar cepas carentes de cápsula, para así generar más evidencia sobre la virulencia de estos serotipos capsulares y ver su implicancia en otras enfermedades crónicas no transmisibles. Con esto se podría avanzar en la línea investigativa y realizar estudios clínicos de serotipificación a pacientes con EA y periodontitis, para así buscar una relación directa entre la virulencia de los serotipos de *P. gingivalis* y la EA.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten establecer las bases celulares de la asociación entre una bacteria y el origen de la neuroinflamación, contribuyendo para determinar la posible asociación causal entre la periodontitis y la EA. De esta forma, en pacientes con periodontitis, se podrán realizar estudios de serotipificación para saber su susceptibilidad frente a la EA. Además, es necesario compartir estos resultados con la comunidad médica, para que los pacientes geriátricos, con antecedentes de deterioro cognitivo o historia familiar de

EA, sean derivados al odontólogo para realizar prevención y que reciban tratamiento periodontal oportuno, además de mantener controles periódicos que eviten la progresión de la enfermedad periodontal.

## 8. Conclusiones

1. En los cultivos de microglías y en los cultivos enriquecidos de neuronas de ratas Sprague-Dawley estimulados con los serotipos K1 y K2 existe un aumento en los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y TNF- $\alpha$ , y un incremento en los niveles de TLR4. Además, en los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los serotipos K1 y K2 se observó un incremento en los niveles de expresión de mRNA de *Stat3*.
2. En los cultivos enriquecidos de neuronas estimulados con los serotipos K1 o K2 existe un incremento en la secreción de MMP-9, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . En los cultivos estimulados con K1 también hay mayor secreción de MMP-9.
3. En cultivos enriquecidos de neuronas de ratas Sprague-Dawley se detectó un aumento significativo de MDA en presencia del serotipo K2.
4. En base a los resultados obtenidos se puede establecer que los serotipos capsulares K1 y K2 de *P. gingivalis* son, en efecto, los que inducen una mayor respuesta proinflamatoria y oxidativa tanto en microglías como en cultivos enriquecidos de neuronas.

## 9. Referencias bibliográficas

- Aduse-Opoku, J., Slaney, J. M., Hashim, A., Gallagher, A., Gallagher, R. P., y cols. (2006). Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 74(1), 449–460. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.449-460.2006>
- Almeida, A., Fagundes, N., Maia, L. C., y Lima, R. R. (2018). Is there an Association Between Periodontitis and Atherosclerosis in Adults? A Systematic Review. *Current Vascular Pharmacology*, 16(6), 569–582. <https://doi.org/10.2174/1570161115666170830141852>
- Bowman, G.L., Dayon, L., Kirkland, R., Wojcik, J., Peyratout, G., y cols. (2018). Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults. *Alzheimer's & Dementia*, 14(12): 1640-1650. doi:10.1016/j.alz.2018.06.2857..
- Braun, D.A., Fribourg, M., y Sealton, S.C. (2013). Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 2986-2993. doi:10.1074/jbc.M112.386573
- Carow, B. y Rottenberg, M.E. (2014). SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5, 58-71. doi: 10.3389/fimmu.2014.00058
- Cevey, A.C., Penas, F.N., Soto, C.D.A., Mirkin, G.A., y Goren, N.B. (2019) IL-10/STAT3/SOCS3 axis is involved in the anti-inflammatory effect of benzinidazole. *Frontiers in Immunology*, 10, 1267. doi: 10.3389/fimmu.2019.01267
- Chen, Z., y Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/S12264-013-1423-Y>
- Choi, M., Kim, H., Yang, E. J., y Kim, H. S. (2020). Inhibition of STAT3 phosphorylation attenuates impairments in learning and memory in 5XFAD

- mice, an animal model of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacological Sciences*, 143(4), 290–299. <https://doi.org/10.1016/J.JPHS.2020.05.009>
- Corbella, S., Taschieri, S., Del Fabbro, M., Francetti, L., Weinstein, R., y cols. (2016). Adverse pregnancy outcomes and periodontitis: A systematic review and meta-analysis exploring potential association. *Quintessence International*, 47(3), 193–204. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a34980>
- d'Empaire, G., Baer, M.T., y 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, 6236–6243. doi: 10.1128/IAI.00519-06.
- de Molon, R. S., Rossa, C., Thurlings, R. M., Cirelli, J. A., y Koenders, M. I. (2019). Linkage of periodontitis and rheumatoid arthritis: Current evidence and potential biological interactions. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184541>
- Deschamps-Lenhardt, S., Martin-Cabezas, R., Hannedouche, T., y Huck, O. (2019). Association between periodontitis and chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases* (Vol. 25, Issue 2, pp. 385–402). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/odi.12834>
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., y cols. (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>
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., y cols. (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., y cols. (2020). Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588036>
- Díaz-Zuñiga, J., Melgar Rodriguez, S., Hernandez, M., Pablo, J., Alvarez, C., y cols. (2014). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 242–251. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12205>
- Díaz Zúñiga, J., Yáñez Figueroa, J., Melgar Rodríguez, S., Álvarez Rivas, C, Rojas Lagos, C., y cols. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 5(1), 40-45. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072012000100007>
- Ding, Y., Ren, J., Yu, H., Yu, W., y Zhou, Y. (2018). *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity & Ageing*, 15, 6. doi:10.1186/s12979-017-0110-7.
- Dominy, S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., y cols. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 5(1). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- El Assar, M., Angulo, J., y Rodríguez-Mañas, L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 380–401. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.07.003>
- Fan, Y., Mao, R., y Yang, J. (2013). NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & Cell*, 4,176-185. doi: 10.1007/s13238-013-2084-3.
- Farquharson, S. I., Germaine, G. R., y Gray, G. R. (2000). Isolation and characterization of the cell-surface polysaccharides of *Porphyromonas*

- gingivalis* ATCC 53978. *Oral microbiology and immunology*, 15(3), 151–157.  
<https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2000.150302.x>
- Gaur, S., y Agnihotri, R. (2015). Alzheimer's disease and chronic periodontitis: Is there an association? *Geriatrics and Gerontology International*, 15(4), 391–404. <https://doi.org/10.1111/ggi.12425>
- Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular Oral Microbiology*, 29(6), 248–257. <https://doi.org/10.1111/omi.12065>
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., y Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology*, 217(2), 459. <https://doi.org/10.1083/JCB.201709069>
- Hickey, W. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*, 36(2), 118–124. <https://doi.org/10.1002/GLIA.1101>
- Ilievski, V., Zuchowska, P.K., Green, S.J., Toth, P.T., Ragozzino, M.E., y cols. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One*, 13, e0204941. doi: 10.1371/journal.pone.0204941.
- Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y., y cols. (2017). Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease* 3, 3-15. doi: 10.1038/s41514-017-0015-x
- Kim, K. S. (2001). *Escherichia coli* Translocation at the Blood-Brain Barrier. *Infection and Immunity*, 69(9), 5217. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5217-5222.2001>
- Kunnen, A., Dekker, D. C., Van Pampus, M. G., Harmsen, H. J. M., Aarnoudse, J. G., y cols. (2012). Cytokine production induced by non-encapsulated and encapsulated *Porphyromonas gingivalis* strains. *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1558–1566. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.07.013>

- Laine, M. L., Appelmeik, B. J., y Van Winkelhoff, A. J. (1997). Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *Journal of Dental Research*, 76(12), 1840–1844. <https://doi.org/10.1177/00220345970760120601>
- Laine, M.L., y van Winkelhoff, A.J. (1998). Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*, 13, 322-325. doi: 10.1111/j.1399-302x.1998.tb00714.x.
- Lane, C. A., Hardy, J., y Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. In *European Journal of Neurology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 59–70). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Levy, D. E., y Darnell, J. E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(9), 651–662. <https://doi.org/10.1038/NRM909>
- Liccardo, D., Cannavo, A., Spagnuolo, G., Ferrara, N., Cittadini, A., y cols. (2019). Periodontal disease: A risk factor for diabetes and cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20061414>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., y cols. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017 541:7638, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liu, K. J., y Rosenberg, G. A. (2005). Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.03.033>
- Marchi, N., Cavaglia, M., Fazio, V., Bhudia, S., Hallene, K., y cols. (2004). Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 342(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.CCCN.2003.12.008>

- Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., y cols. (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>
- Merlini, M., Meyer, E. P., Ulmann-Schuler, A., y Nitsch, R. M. (2011). Vascular  $\beta$ -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA $\beta$  mice. *Acta Neuropathologica*, 122(3), 293. <https://doi.org/10.1007/S00401-011-0834-Y>
- Millot, P., San, C., Bennana, E., Porte, B., Vignal, N y cols. (2020). STAT3 inhibition protects against neuroinflammation and BACE1 upregulation induced by systemic inflammation. *Immunology Letters*, 228, 129–134. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2020.10.004>
- Moghadam, S. A., Shirzaiy, M., y Risbaf, S. (2017). The Associations between Periodontitis and Respiratory Disease. In *Journal of Nepal Health Research Council* (Vol. 15, Issue 35, pp. 1–6). J Nepal Health Res Council. <https://doi.org/10.3126/jnhrc.v15i1.18023>
- Muñoz, Y., Paula-Lima, A. C., y 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>
- Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT Signaling Pathway: Input. *J Immunol References*, 178, 2623–2629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2623>
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., y cols. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: Major periodontopathic pathogen overview. *Journal of Immunology Research* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/476068>
- Nakajima, K., y Kohsaka, S. (2001). Microglia: Activation and Their Significance in



the Central Nervous System. *JB Review J Biochem*, 130, 169–175.  
<https://academic.oup.com/jb/article/130/2/169/759983>.

Orrego-Cardozo, M., Parra-Gil, M., Salgado-Morales, Y., Muñoz-Guarín, E., y Fandiño-Henao, V. (2015). *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *CES Odontología*, 28(1), 57-73. Retrieved May 30, 2022, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X201500100006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X201500100006&lng=en&tlng=es).

Paula-Lima, A. C., De Felice, F. G., Brito-Moreira, J., y Ferreira, S. T. (2005). Activation of GABAA receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, 49(8), 1140–1148.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.06.015>

Paula-Lima, A., y Hidalgo, C. (2013). Amyloid  $\beta$ -peptide oligomers, ryanodine receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release and Wnt-5a/ $\text{Ca}^{2+}$  signaling: Opposing roles in neuronal mitochondrial dynamics? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0(JUL), 120. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00120/BIBTEX>

Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., y cols., H. W. (1998). Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Annals of Neurology*, 44(4), 592–600.  
<https://doi.org/10.1002/ANA.410440404>

Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., y cols. (2015). Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE<sup>-/-</sup> mice brains. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43(1), 67–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-140315>

Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A., y 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>

- Reichenbach, N., Delekate, A., Plescher, M., Schmitt, F., Krauss, S y cols. (2019). Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Molecular Medicine*, 11(2). <https://doi.org/10.15252/EMMM.201809665>
- Ryder, M. I. (2020). *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer disease: Recent findings and potential therapies. *Journal of Periodontology*, 91(S1), S45–S49. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0104>
- Singh Rao, S. K., Harding, A., Poole, S., Kesavalu, L., y Crean, S. J. (2015). *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. *Mediators of Inflammation* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/137357>
- Singh Rao, S. K., Harding, A., Simmons, T., Robinson, S., Kesavalu, L., y cols. (2014). Oral inflammation, tooth loss, risk factors, and association with progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(3), 723–737. <https://doi.org/10.3233/JAD-140387>
- Sugawara, S., Nemoto, E., Tada, H., Miyake, K., Imamura, T y cols. (2000). Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *Journal of Immunology*, 165, 411-418. doi: 10.4049/jimmunol.165.1.411.
- Tada, H., Sugawara, S., Nemoto, E., Takahashi, N., Imamura, T y cols. (2002). Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infection and Immunity*, 70, 3304-3307. doi: 10.1128/iai.70.6.3304-3307.2002.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., y Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89, S159–S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>

- Tsikakos, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2016.10.021>
- Vernal, R., Leon, R., Herrera, D., Garcia-Sanz, J. A., Silva, A., y cols. (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., Garcia-Sanz, J., y cols. (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(10), 823–829. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01462.x>
- Vernal, R., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., y Garcia-Sanz, J. A. (2014a). Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(1), 19–30. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12176>
- Vernal, R., Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Pujol, M., Díaz-Guerra, E., y cols. (2014b). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 451-459. doi: 10.1111/jcpe.12236.
- Voirin, A. C., Perek, N., y Roche, F. (2020). Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ ) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model. *Brain Research*, 1730. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2020.146647>
- Von Bernhardi, R. (2004). La barrera hemato-encefálica en la patología del sistema nervioso central: Su importancia en la respuesta inflamatoria. *Revista*

*Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 42(2), 121–130.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-92272004000200005>

- Wu, Z., y Nakanishi, H. (2014). Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: Possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *Journal of Pharmacological Sciences* (Vol. 126, Issue 1, pp. 8–13). Japanese Pharmacological Society. <https://doi.org/10.1254/jphs.14R11CP>
- Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F., y cols. (2017). Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.002>
- Yang, X., Zhang, J., Duan, L., Xiong, H., Jiang, Y., y cols. (2018). Microglia activation mediated by toll-like receptor-4 impairs brain white matter tracts in rats. *Journal of Biomedical Research*, 32(2), 136–144. <https://doi.org/10.7555/JBR.32.20170033>
- Yang, Y., y Rosenberg, G. A. (2011). MMP-mediated disruption of claudin-5 in the blood-brain barrier of rat brain after cerebral ischemia. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 762, 333–345. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-185-7\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-185-7_24)
- Zenaro, E., Piacentino, G., y Constantin, G. (2017). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 107, 41. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2016.07.007>
- Zhang, J., Yu, C., Zhang, X., Chen, H., Dong, J y cols. (2018). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 37-52. doi: 10.1186/s12974-017-1052-x.
- Zhao, H., Liu, J., Pan, S., Sun, Y., Li, Q., y cols. (2013). SOD mRNA and MDA

expression in rectus femoris muscle of rats with different eccentric exercise programs and time point. *PLoS One*, 8, e73634. doi: 10.1371/journal.pone.0073634.

## **10. Anexos**

### ***10.1 Anexo N°1 Certificado de comité de ética***



Santiago, 06 de abril de 2022

Certificado N°: 17085-ODO-UCH-e1  
 Comité Institucional de Bioseguridad  
 Administración Conjunta Campus Norte  
 FDO N°102

**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.

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FDOUCH-2018-016 titulado **"Asociación entre Enfermedad Periodontal y Enfermedad de Alzheimer"**. El Investigador Responsable de este proyecto es el **Prof. Jaime Díaz Zúñiga**, Profesor Asistente del Departamento de Odontología Conservadora de este Comité.

Los ensayos propuestos en este Proyecto involucran el manejo de:  
 - Moléculas de ADN Recombinante,  
 - Organismos y Virus que contienen las moléculas antes mencionadas,  
 - Bacterias: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*  
 - Líneas celulares primarias de animales: neuronas de hipocampo de Sprague Dawley.  
 - Muestras Biológicas de Sprague Dawley: Líquido Cefalorraquídeo, Sangre, Tejido Animal, Biopsia Animal.

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 docencia 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 **"Proyecto de Investigación FDOUCH-2018-016"** que se realizará en el Laboratorio de Biología Periodontal y Laboratorio de Biología Celular Molecular, ambos pertenecientes a la Facultad de Odontología.

El personal que manipulará las muestras biológicas, líneas celulares, bacterias, compuestos químicos y el manejo del micro-CT, se encuentran debidamente entrenados en estas áreas. Además, técnicos de laboratorio y/o estudiantes que trabajarán con el equipo de investigación estarán bajo la supervisión del Prof. Díaz o de algunos de los Co-Investigadores del presente Proyecto.

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

*(Handwritten signatures and stamps)*  
 Directora Ejecutiva: *[Signature]*  
 Presidente: *[Signature]*  
 CICUA - VID  
 Universidad de Chile

**10.2 Anexo N°2**

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Prof. Díaz para ser presentado en la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología.



**Dr. Mario Chiong**  
**Secretario**



**Dra. Carla Lozano M.**  
**Presidenta**