



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**Cambios morfológicos en astrocitos producidos por la periodontitis experimental
inducida por *Porphyromonas gingivalis* en ratas**

Valentina Andrea Moscoso García

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra Andrea Paula-Lima

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Jaime Díaz Zuñiga

Dr. Alejandro Luarte

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1150736, FONDECYT 1181780, FIOUCh 17/019,
RDP-IADR 2017-2019.**

Santiago, Chile 2021

Agradecimientos

Agradecida de la Dra. Andrea Paula-Lima por guiarme, acompañarme, hacer que pudiera disfrutar del proceso de tesis, por ser una gran docente y profesional que me motivó con sus investigaciones desde el primer año de la carrera. Agradecida de mis tutores Dr. Díaz y Dr. Luarte por la paciencia de explicar con detalle y enseñar de manera muy dedicada y especial.

Agradezco profundamente a mi familia maravillosa: mamá, papá y hermano por siempre ayudarme y acompañarme en todo, nunca dejarme caer, nunca presionarme, por dar una palabra de aliento y secarme las lágrimas cuando fue necesario. No lo hubiese logrado jamás sin su apoyo, amor y contención. Estaré eternamente agradecida con ustedes. Les amo con todo mi ser.

Gracias amor Atilio por acompañarme en los últimos años de este proceso, por sentir en carne viva lo que me pasaba a mí en esos momentos de angustia y también de felicidad. Estar dispuesto a ayudarme en todo para lograr mis objetivos y eso mi corazón jamás lo olvida.

Gracias a mis amigos y amigas que hice estudiando, desde Bachillerato hasta el fin, hubiese sido muy difícil hacerlo sin compañía, sin los bailoteos, sin las copuchas, sin conversar en plaza de la unión y sin sufrir y reír en conjunto.

A mis amig@s de la vida y del alma les agradezco por distraerme de la odontología cuando fue necesario para mí. Les quiero mucho

Gracias a mi familia Moscoso y familia García por siempre apoyarme, sobre todo a mi abuelo Sergio por inculcarme a ser estudiosa y aplicada.

Y finalmente, gracias a mí por lograrlo. Nada es imposible.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	4
II. MARCO TEÓRICO/ INTRODUCCIÓN	5
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
IV. METODOLOGÍA.	15
IV.1. Análisis morfométricos.....	16
V. RESULTADOS	20
V.1. Número de ramificaciones del astrocito.....	21
V.2. Largo de la ramificación más extensa del astrocito.....	22
V.3. Promedio del largo del total de ramificaciones del astrocito.....	23
V.4. Área del astrocito.....	24
V.5. Distancia no lineal más larga que cruza toda la célula.....	25
V.6. Punto terminal de una ramificación.....	26
V.7. Máxima distancia lineal que cruza al astrocito.....	27
V.9. Distancia euclidiana del largo promedio del astrocito.....	28
V.10. Índice de tortuosidad.....	29
V.11. Índice de tortuosidad máximo.....	30
VI. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIONES.....	40
VIII. ANEXOS	41
ANEXO N°1: Certificado Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.....	41
ANEXO N°2: Reconstrucción de astrocitos 2D y 3D del análisis Skeleton en las distintas áreas del hipocampo en el antígeno capsular K y serotipo no capsular K- de <i>Porphyromonas gingivalis</i> , en un modelo murino de periodontitis experimental que desarrolla neuroinflamación y daño cognitivo.....	42
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMEN

La periodontitis es un conjunto de condiciones inflamatorias que afectan el tejido de protección del diente, el patógeno clave es la *Porphyromona gingivalis*. Dentro de sus factores de virulencia, destaca la cápsula y se reconocen 7 serotipos encapsulados (K1-K7) y cepas no encapsuladas (K-). Se asocia el serotipo K1 a las más inmunogénicas y virulentas, en tanto, la cepa K- tiene mayor proliferación en sujetos sanos. La periodontitis podría generar neuroinflamación, asociándose con la Enfermedad de Alzheimer y en posibles alteraciones en astrocitos. En este estudio se mide la variación de la morfología astrocitaria hipocampal en la neuroinflamación provocada por un modelo de periodontitis experimental.

Metodología: Se indujo periodontitis experimental a 10 ratas macho por inoculación en mucosa palatina de *P. gingivalis* serotipo K1, *P. gingivalis* cepa mutante K- y grupo control con medio de transporte de bacterias. Se generan cortes cerebrales del hipocampo, se incuban en el anticuerpo primario GFAP. Se evalúa morfología astrocitaria con el software Image J y análisis skeleton para el número de ramificaciones, medidas comparativas del largo de las ramificaciones, áreas, largos lineales y no lineales del astrocito, número de terminaciones y niveles de tortuosidad.

Resultados: Los astrocitos en las ratas inoculadas con el serotipo K1 tienen más ramificaciones y de mayores longitudes, además de mayor volumen, mayor longitud no lineal, mayor número de terminaciones y mayor nivel de sinuosidad en su morfología que las inoculadas con la cepa no encapsulada K-.

Conclusión: La periodontitis experimental inducida por *P. gingivalis* no encapsulada K- se asoció a mayores cambios en su morfología en comparación con la inoculación con serotipo K1 y el grupo control, lo cual, se podría asociar con un rol neuroprotector.

INTRODUCCIÓN/MARCO TEÓRICO

Periodontitis y Porphyromonas gingivalis

La periodontitis corresponde a un conjunto de condiciones inflamatorias de origen multifactorial que afectan a los tejidos de protección o soporte del diente, produciendo su destrucción. Sin tratamiento, esta enfermedad oral conduce a la pérdida de los dientes y a la disfunción masticatoria, impactando negativamente en la calidad de vida (Pardo-Romero y Hernandez, 2018; Pihlstrom y Johnson, 2005). Constituye una de las patologías más prevalentes en los humanos tanto a nivel mundial (Muhammad, 2020; White y cols., 2009), como a nivel nacional (Carvajal, 2016; Gamonal y cols, 2010) su causa principal es la disbiosis de la microbiota subgingival que desencadena una reacción inflamatoria (Darveau, 2010). Entre las bacterias asociadas a la disbiosis de la microbiota se describen tales como, *Filifactor alocis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, siendo esta última considerada como un patógeno clave o “keystone” (Bodet y cols., 2007; Hurtado y cols., 2016; Tsai y cols., 2018). La *P. gingivalis* es un cocobacilo Gram-negativo, anaerobio estricto, asacarolítico, que expresa diversos factores de virulencia que van determinando su patogenicidad. Entre los factores de virulencia que *P. gingivalis* produce, destacan la fimbria, el lipopolisacárido (LPS), las gingipaínas y la cápsula (Hajinshengallis y Lamont, 2014). Las fimbrias corresponden al factor de virulencia de mayor extensión extracelular de la bacteria, que facilita su adhesión a cualquier superficie, las que incluyen proteínas de la matriz, células del hospedero y otros microorganismos, lo que le permite migrar a las diferentes superficies, tejidos u órganos del hospedero (Amano y cols., 2004). Las gingipaínas, corresponden a un conjunto de enzimas que degradan proteínas que contienen Arginina (Arg) o Lisina (Lys) en su estructura primaria (Stathopoulou y cols, 2009). De esta manera se describen las gingipaínas-Arg o Rgp y las gingipaínas-Lys o Kgp. Las gingipaínas son

esenciales para la maduración de la fimbria, la exportación de los polisacáridos capsulares a la superficie celular, la degradación de los receptores de las células del hospedero y para el metabolismo de las proteínas que le otorgarán la energía a *P. gingivalis* para desarrollar sus actividades metabólicas (Septiwidyati y Bachtiar, 2020). El LPS, por otro lado, interfiere con la respuesta inmune, favoreciendo el aumento en la cantidad de bacterias y en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Wang & Ohura, 2002). Los polisacáridos capsulares de carga negativa entregan a la bacteria estabilidad estructural, posibilidad de interacción con el hospedero, mecanismos de supervivencia, evasión de respuesta inmune y capacidad de invadir tejidos (Septiwidyati y Bachtiar, 2020).

Sobre la base de la variabilidad estructural de los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis* se han descrito distintos serotipos. Actualmente, se reconocen 7 serotipos capsulares denominados K1 a K7 y cepas no encapsuladas denominadas K- (Laine, 1998; van Winkelhoff, 2002; Aduse-Opoku, 2006). En modelos animales, los serotipos K1 y K2 presentan mayor virulencia y mayor resistencia a la fagocitosis, causando infecciones más graves que los serotipos K3 a K6 o las cepas no encapsuladas K- (Brunner y cols., 2010). Así, a los serotipos K1 y K2 se les atribuye una mayor capacidad de inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias tales como interleuquina (IL)-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral (del inglés *tumoral necrosis factor*, TNF)- α y de quimioquinas en células dendríticas, mayor diferenciación a linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) tipo 1 y 17 y, mayor activación de osteoclastos (d'Empaire y cols., 2006; Melgar-Rodriguez, 2014; Vernal 2009, 2014). Por otro lado, los serotipos K3, K4 y K5 modulan la respuesta en células dendríticas y producen mayor diferenciación de linfocitos Th2, mientras que las cepas K- son capaces de inducir una respuesta T reguladora (Treg) (Vernal y cols., 2014; Vernal y cols., 2009). Además, al evaluar la respuesta de memoria inmunológica en pacientes afectados de periodontitis, se logró determinar que existe una mayor frecuencia de proliferación de linfocitos T

de memoria en presencia de los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis*, sugiriendo su rol en el inicio o progresión de la periodontitis, en comparación con el serotipo K4 o la cepas K-, cuya mayor proliferación se detecta en sujetos sanos (Melgar-Rodríguez, 2014). En particular, de todos los serotipos de *P. gingivalis*, las cepas pertenecientes al serotipo K1 corresponden a las más inmunogénicas y virulentas (Vernal y cols., 2013).

Los mediadores inflamatorios generados por *P. gingivalis* y sus factores de virulencia pueden generar inflamación sistémica de bajo grado (Singhrao y Olsen, 2019). De esta manera, la periodontitis se asocia con otras enfermedades o condiciones, tales como, parto prematuro y bajo peso al nacer, diabetes mellitus II, accidentes cerebro-vasculares, infarto agudo al miocardio, aterosclerosis y, más recientemente, con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Bermudez y cols., 2003; Dietrich y cols., 2013; Morales y cols., 2016; Luna y cols., 2019; Sansores-España y cols., 2021; Vincent y cols., 2018).

Demencia y posible rol de Porphyromonas gingivalis

Las demencias corresponden a diversas patologías caracterizadas por el deterioro cognitivo (Grand y cols., 2011). Dentro de éstas, la patología más común es la EA (Knopman y cols., 2001), la cual, se caracteriza por la pérdida progresiva de funciones cognitivas como memoria, aprendizaje y comportamiento (Castellani y cols., 2010). A nivel histológico, en el cerebro de pacientes con EA se observan *post mortem* las placas seniles, que se componen mayoritariamente por agregados insolubles de péptido β -Amiloide ($A\beta$), y los ovillos neurofibrilares, compuestos por la proteína Tau hiperfosforilada. Las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, en conjunto con la neurodegeneración, se consideran marcadores histopatológicos distintivos de la EA (Baranello y cols., 2015; Castello y Soriano, 2014).

La proteína precursora amiloide (del inglés *amyloid precursor protein*, APP), que da origen al péptido A β , corresponde a una proteína transmembrana presente en células neuronales y no neuronales (Sagare y cols., 2012). El péptido A β se origina a partir del clivaje proteolítico de esta proteína, e incluye a varios de sus aminoácidos hidrofóbicos ya que corresponde a una parte de la secuencia transmembrana de la APP. En razón de esto, en medio acuoso el péptido A β exhibe cambios conformacionales a estructuras β -plegadas con incorrecto plegamiento, más propensas a agregarse en forma de oligómeros y fibrillas insolubles, que constituyen agregados que circulan y se depositan en el cerebro, causando neurotoxicidad (Estrada & Zomosa, 2017). En tanto, la proteína Tau se encuentra a nivel del citoplasma estabilizando los microtúbulos neuronales, pero al hiperforforilarse, se acumula en forma de ovillos neurofibrilares desestabilizando al citoesqueleto e impactando negativamente la sinapsis y la fisiología neuronal (Kametani y Hasegawa, 2018).

En estudios con neuroimágenes se utilizaron mediciones por resonancia magnética funcional para demostrar que, en una tarea asociativa de memoria, en sujetos control, se activa el hipocampo, mientras que esto no ocurre en pacientes con deterioro cognitivo. En este estudio, la ausencia del efecto de aprendizaje asociativo en la muestra señaló el importante vínculo entre los problemas de memoria y el hipocampo, una estructura especialmente sensible a la neurotoxicidad (Johnson y cols., 2008; Montañés & Matallana, 2010). Es interesante notar que otro tipo de infecciones bacterianas pueden estar relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha reportado recientemente que la infección neonatal de ratones por la bacteria *Escherichia coli* aumenta la susceptibilidad de los animales a desarrollar EA en la etapa adulta que produce muerte neuronal en la región del giro dentado (GD) y pérdida sináptica en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Venâncio A, 2017).

Los procesos cognitivos son gestionados por el sistema nervioso central y para ser regulados, requieren la participación de diferentes estructuras cerebrales, siendo el hipocampo el área asociada con la memoria cognitiva y una de las pocas regiones donde se producen nuevas neuronas (neurogénesis). El hipocampo deriva del telencéfalo y está organizado por el hipocampo propiamente tal, que incluye las regiones CA1, CA2 y CA3 y el GD. El circuito de procesamiento de información de la memoria cognitiva es el trisináptico, que incluye la región CA1, CA3 y GD del hipocampo. En este procesamiento, las neuronas de la corteza envían sus proyecciones a las células del GD, estas últimas proyectan sus axones a las neuronas de la región CA3, las cuales, finalmente llevan sus axones hasta la región de CA1. Por lo tanto, resulta interesante analizar las 3 áreas debido a que están interconectadas entre sí, de modo que se puedan comparar sus efectos (Hernández y cols., 2015).

Actualmente, se ha propuesto que el origen de EA puede ser atribuido a la inflamación cerebral crónica (Swardfager y cols., 2010), estableciendo que la exposición sostenida a factores de virulencia y/o mediadores pro-inflamatorios en el cerebro provocaría daño neuronal y degeneración como consecuencia de una alteración de la microglia y astrocitos, entre otros factores (Kamer y cols, 2008). En este sentido, se ha propuesto que algunas de las infecciones sistémicas podrían establecer un estado inflamatorio en el sistema nervioso central que favorezca la neurodegeneración (Scheiblich y cols., 2020).

Así, evidencia creciente muestra que la bacteria *P. gingivalis* puede alterar la respuesta inmune del hospedero, ingresando a la circulación sanguínea periférica para luego entrar al parénquima cerebral. De este modo, *P. gingivalis* podría estimular directa o indirectamente a las células gliales (Sansores-España y cols., 2021; Singhrao y Olsen., 2019). Diversos estudios, plantean que *P. gingivalis* tiene capacidad para generar neuroinflamación (Brown, 2019; Septiwidyati y Bachtiar, 2020; Singhrao y Olsen 2019). Específicamente, el serotipo K1 se asocia con

neuroinflamación, astrogliosis, neurodegeneración, formación de ovillos neurofibrilares y aumentando la concentración de A β en el cerebro (Díaz-Zuñiga y cols., 2020). En tanto, en modelos *in vitro* y experimentales, las cepas no encapsuladas (k-) se asocian con salud periodontal (Brunner y cols., 2010; Díaz-Zuñiga y cols., 2012).

Microglías y astrocitos

En el cerebro, la principal célula glial que cumple roles inmunológicos corresponde a la microglía (Rohan y Yirmiya, 2016). Las microglías son fagocitos con un rol neuroprotector, estimulando la plasticidad neuronal y la secreción de factores neurotróficos en respuesta a diversos patrones moleculares altamente conservados de patógenos (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) o de daño tisular (del inglés *damaged-associated molecular patterns*, DAMPs) (Wolf y cols., 2017). En condiciones fisiológicas, cuando las microglías se activan, se diferencian al fenotipo M2 o inmuno-modulador, que promueve la secreción de citoquinas moduladoras. Sin embargo, si el estímulo inflamatorio aumenta o perpetúa, las microglías se activan y diferencian a un fenotipo M1 o pro-inflamatorio, incrementando la síntesis de citoquinas inflamatorias y factores neurotóxicos. De este modo, las citoquinas producidas por las microglías pueden activar a otras células gliales, como los astrocitos, que perpetúan el ciclo de injuria (Sansores-España y cols., 2021; Tang y Le 2016).

Los astrocitos corresponden a la célula glial más abundante del cerebro. Los astrocitos dirigen diversos procesos claves para la homeostasis del sistema nervioso, participando en el metabolismo neuronal, la regulación de la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal. En presencia de neuroinflamación, ocurre un proceso titulado astrogliosis, que implica una modificación en su fenotipo a astrocitos reactivos, actuando en conjunto con las microglías M1 (Reinchenbach y cols., 2019).

Así, los astrocitos alteran su funcionamiento en presencia de neuroinflamación (Guillamón-Vivancos y cols., 2015; Sansores-España y cols., 2021), sin embargo, no hay concordancia en la relevancia e impacto de las variantes morfológicas de este. Anteriormente, se ha comprobado que ocurren variaciones numéricas en astrocitos y cambios morfológicos en el astrocito envejecido, observándose prolongaciones más cortas (Cerbai y cols., 2012). Por otro lado, ante la presencia de antioxidantes, los astrocitos modifican su morfología, adquiriendo un rol neuroprotector en la inflamación cerebral (Oliveira-Junior y cols., 2019). Sin embargo, hasta la fecha, no existe una clara comprensión de los beneficios o riesgos que este cambio morfológico pueda tener (Cerbai y cols., 2012). Además, dichos cambios morfológicos no han sido abarcados en profundidad en modelos de periodontitis experimental, y menos si habrían particularidades en respuesta a los diferentes serotipos de *P. gingivalis*.

Planteamiento del problema

La neuroinflamación podría ser causada tanto por las bacterias periodonto-patógenas como por sus factores de virulencia (Sansores-España y cols., 2021), que posiblemente migren de los sitios periodontales hacia el cerebro por vía circulatoria sanguínea, linfática o nerviosa (Singh Rao y Olsen 2019). De esta manera, se ha planteado una relación directa entre enfermedades crónicas no transmisibles como la periodontitis y la EA. Diversos estudios, plantean que *P. gingivalis* podría provocar neuroinflamación (Septiwidyati y Bachtiar, 2020; Singh Rao y Olsen 2019). En particular, estudios experimentales donde inducen periodontitis por *P. gingivalis* mediante distintas metodologías demuestran que existe presencia de neuroinflamación, astrogliosis, activación de microglia e, incluso, deterioro cognitivo (Ding y cols., 2018; Hu y cols., 2020; Wang y cols., 2019). Además de causar neuroinflamación, la inoculación del serotipo K1 de *P. gingivalis*, tanto en la mucosa palatina como por vía oral forzada (“*oral gavage*”),

se asocia con neurodegeneración, formación de ovillos neurofibrilares y acumulación extracelular de A β (Díaz-Zuñiga y cols., 2020; Brown, 2019). Recientemente, en un modelo experimental de periodontitis en ratas mediante la irrigación subgingival del LPS de *P. gingivalis* no encapsulada, se observaron modificaciones en la morfología astrocitaria, donde se destacó la presencia de astrocitos con cuerpo celular agrandado y protuberancias irregulares en la corteza cerebral (Hu y cols., 2020). Sin embargo, la metodología para inducir la periodontitis no es la indicada, por cuanto se reconocen 3 metodologías avaladas para inducir una patología tipo periodontitis.

El *gold* estándar para inducir periodontitis en roedores es la aplicación de ligaduras, la que genera disbiosis de la microbiota, resorción ósea a partir de los 10 días y un fenómeno inflamatorio agudo (Garlet, 2010). Otras metodologías incluyen la inoculación de bacterias o factores de virulencia en la mucosa palatina o por vía oral forzada, ambas con indicaciones precisas. En particular, si se pretende estudiar el efecto a nivel sistémico de una bacteria, la vía oral forzada es la metodología indicada, pero es necesario considerar que genera disbiosis intestinal y, por tanto, la respuesta inflamatoria podría deberse a alteraciones intestinales (de Molon y cols., 2016). Por el contrario, si lo que se pretende es determinar el rol de una bacteria o un factor de virulencia es específico, la técnica ideal es la inoculación palatina, que genera resorción ósea a partir del día 30 y un proceso inflamatorio crónico de bajo grado (Garlet y cols., 2010).

En un estudio previo del laboratorio, demostramos que todos los serotipos de *P. gingivalis* estudiados fueron capaces de llegar al cerebro tras su inoculación en la mucosa palatina de ratas. Sin embargo, sólo el serotipo K1 de *P. gingivalis* causó neurodegeneración, formación de ovillos neurofibrilares y acumulación extracelular de A β (Díaz-Zuñiga y cols., 2020) en este modelo experimental de periodontitis. Un hallazgo interesante adicional se refiere al número de astrocitos, que no varió significativamente tras la inoculación de los diferentes serotipos de *P. gingivalis*.

Sin embargo, notamos que los astrocitos de ratas infectadas con el serotipo K1 o K2 exhibían una morfología distintiva inusual en las regiones CA1, CA3 y GD. Por lo tanto, realizamos un análisis de Sholl para comparar la morfología de estas células en la región CA1, en el hipocampo de ratas infectadas K1 o K- y observamos que la infección por K1 promovió un ligero aumento en el tamaño y la complejidad de los procesos astrocíticos. (Díaz-Zúñiga y cols., 2020). En el presente estudio, estudiamos en detalle cómo cambia la morfología astrocitaria hipocámpal en la neuroinflamación provocada por un modelo de periodontitis experimental producido por monoinfección palatina con la cepa K1 (encapsulada), y compararlo con la monoinfección palatina por el serotipo K- (no encapsulado) de *P. gingivalis*

HIPÓTESIS.

La neuroinflamación producida por la inoculación palatina de cepas encapsuladas y no encapsuladas de *Porphyromonas gingivalis* altera la morfología de los astrocitos hipocampales en forma diferencial.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar si ocurren alteraciones de la morfología astrocitaria dependientes del antígeno capsular K en un modelo murino de periodontitis experimental que desarrolla neuroinflamación y daño cognitivo, comparando con la mono infección con un serotipo no encapsulado (K-) de *Porphyromonas gingivalis*,

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Estudiar la morfología astrocitaria mediante análisis morfométricos en las distintas regiones del hipocampo de ratas afectadas o no de periodontitis experimental con el serotipo K1 de *Porphyromonas gingivalis*, que desarrolla neuroinflamación y daño cognitivo.
2. Comparar los efectos del serotipo K1 de *P. gingivalis* con los del serotipo no encapsulado K- sobre la morfología astrocitaria, y su relación con la neuroinflamación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo de las cepas, las condiciones de cultivo bacteriano, la manutención de los animales, y la obtención de muestras fueron ejecutadas previamente en la tesis de Doctorado del Dr. Jaime Díaz publicadas en el paper Díaz-Zuñiga 2020.

Se trabajó con 2 cepas de *P. gingivalis*: La cepa encapsulada de *P. gingivalis* W50 (serotipo K1) y la mutante isogénica-W50 de *P. gingivalis* que fue manipulada para hacer la delección de los genes que codifican para las enzimas que sintetizan la cápsula de la bacteria, de modo de generar la cepa mutante de fenotipo no encapsulado (cepa K-) (Aduse-Opoku et al, 2006).

Se utilizan en total 10 ratas macho de experimentación de 4 a 6 semanas de edad subdivididos en los siguientes grupos de ratas:

Modelo de periodontitis experimental:

- Experimentales K1
- Experimentales K-
- Control periodontitis

La inducción de periodontitis experimental se realizó inoculación de las bacterias en la mucosa palatina. El grupo control fue inyectado con medio de transporte de bacterias (sham).

En la extracción de muestras biológicas para análisis mediante inmunofluorescencia, el cerebro se extrajo completamente. De cada cerebro se obtuvieron cortes de 10 μm de grosor en criostato obteniendo 3 imágenes de 3 regiones distintas del hipocampo: región CA1, CA3 y giro dentado.

Los cortes de cerebro se incubaron en PBS y una solución de bloqueo conteniendo anticuerpo primario contra la proteína acídica fibrilar glial (GFAP, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA). Los cortes histológicos se lavaron tres veces con PBS y montaron en medio que contenía DAPI (Abcam®) para poder visualizar los núcleos. Fueron examinados con un microscopio espectral

confocal C2 Plus (Nikon, USA) y las imágenes se procesaron usando el software Image J (NIH, MD, USA). La proporción de células marcadas se determinó contando las células teñidas positivamente por el anticuerpo primario GFAP en relación al total de células teñidas con DAPI. Con el objetivo de evaluar la morfología de los astrocitos se realizó el análisis Skeleton usando el software Image J.

Análisis morfométricos

En el presente trabajo, para evaluar la variación morfológica de los astrocitos se utilizó el análisis Skeleton del software (Fiji is just) Image J que corresponde a una herramienta computacional que reduce una figura a un conjunto de líneas que pasan por su centro. Se midieron 10 parámetros distintos para comparar los efectos producidos posterior a la inoculación de las cepas encapsuladas (K1) o no encapsuladas (K⁻) de *P. gingivalis*. Las imágenes tenían en promedio 20 stacks. Se evaluaron entre 1 a 3 astrocitos por imagen. Se suman slices y se escogen aquellos astrocitos en que se pudo visualizar la mayor cantidad de volumen y que se vean completos en la imagen, de modo que al mover stacks a los extremos, el astrocito desaparezca, lo cual, nos asegura que este se pueda ver en su mayoría y no se pierda parte de la morfología de la célula en el corte de la imagen. Se selecciona el astrocito con todos sus stacks y se ocupa un filtro gaussiano para visualizar nítidamente las ramificaciones. Se binariza la imagen, se fija un umbral en el stack que abarque gran parte del astrocito con la herramienta threshold, y de manera manual se destaca minuciosamente la célula en su totalidad en las partes que no pudieron ser abarcadas con threshold. Finalmente, se hace una proyección en zeta, sin embargo, también se filtran ramificaciones de otros astrocitos y para esta limitación, se binariza la imagen y se limpia de manera manual en cada stack todo aquello que no corresponda a la célula. Con la imagen limpia, se aplica el

pluggins de Skeletonize para que arroje la imagen como un esqueleto del astrocito con puntos y ramas que nos mostraron las ramificaciones, puntos de ramificación y terminaciones, adelgazando matemáticamente cualquier área a un píxel central formando un esqueleto aplicado a todas las imágenes que nos permitió cuantificar la morfología. Se midieron en total 78 astrocitos de 25 imágenes analizadas para todos los parámetros. Los datos se graficaron, diferenciándose según región CA1, CA3 y GD, y cada región se dividió en las condiciones experimentales o control (Arganda-Carreras y cols., 2010; Karperien A. FracLac for ImageJ 1 1999–2013; available at the ImageJ website, National Institutes of Health; Karperien y cols., 2013) como se describió previamente (Fernández-Arjona y cols., 2017). Los parámetros evaluados fueron:

- 1) Número de ramificaciones del astrocito: Se cuantifica el total de líneas que pasan por el centro del esqueleto del astrocito.
- 2) Largo de la ramificación más extensa del astrocito: Se compara las distintas magnitudes de la línea más larga que pasa por el centro del esqueleto del astrocito.
- 3) Promedio del largo del total de ramificaciones del astrocito: Se cuantifica la medida del largo de todas las ramificaciones del astrocito y se obtiene un promedio por cada condición experimental.
- 4) Área del astrocito: Se mide el volumen del esqueleto 3D del astrocito arrojado por el análisis skeleton de las ratas inoculadas con P. gingivalis K1 y K-.
- 5) Distancia no lineal más larga que cruza toda la célula: Se busca el recorrido más largo de la línea que cruce a lo largo de todo el esqueleto del astrocito en cada condición experimental.
- 6) Punto terminal de una ramificación: Se cuantifica el número total de terminaciones que tienen las líneas que cruzan por el centro del esqueleto del astrocito.

- 7) Máxima distancia lineal que cruza al astrocito: Se mide la distancia lineal que hay entre los 2 puntos terminales más alejados del centro del esqueleto del astrocito.
- 8) Distancia euclidiana del largo promedio del astrocito: Se determina el promedio de la distancia lineal que hay entre los puntos terminales del extremo de cada ramificación del astrocito en las condiciones experimentales evaluadas.
- 9) Índice de tortuosidad: Representa el nivel de sinuosidad que tiene el astrocito y se mide como la razón entre el largo de una ramificación y su distancia lineal.
- 10) Índice de tortuosidad máximo: Representa el nivel de sinuosidad que tiene el astrocito y se mide como la razón entre el largo de la ramificación de mayor tamaño y su distancia lineal.

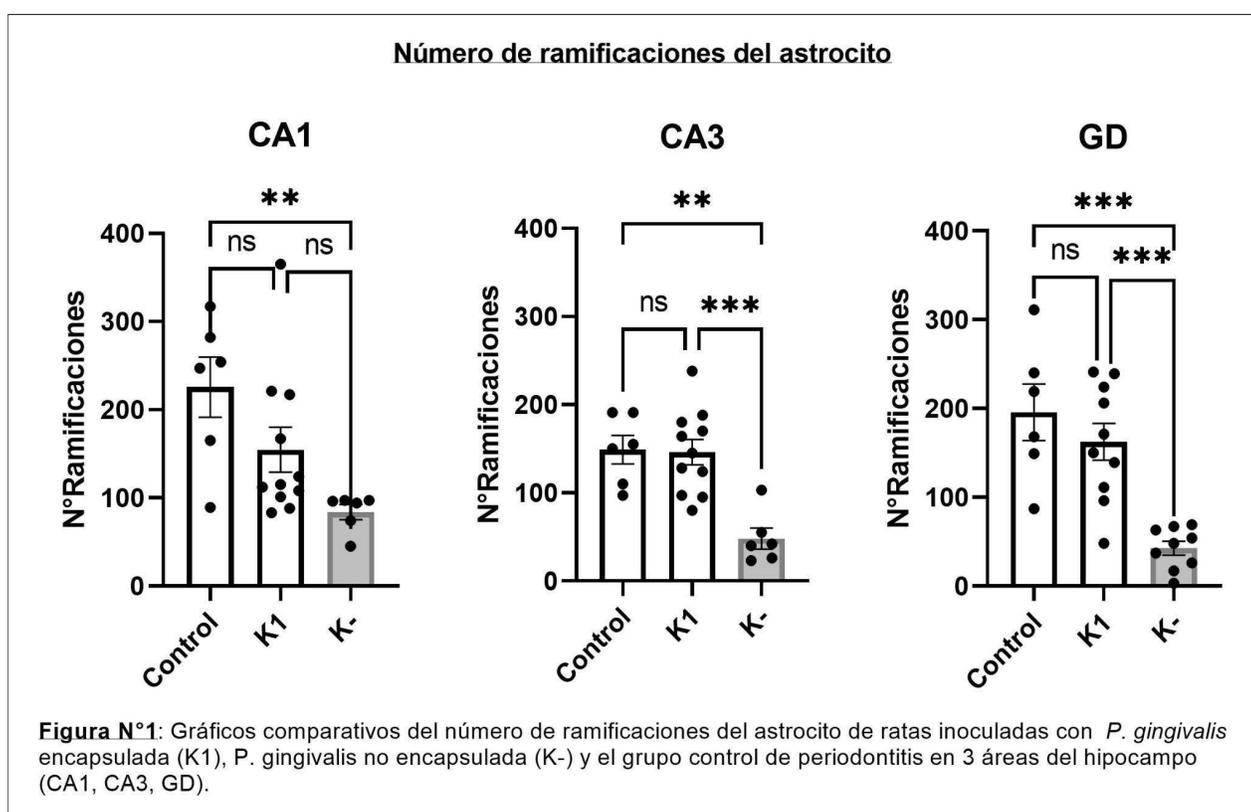
Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). La distribución normal de los datos se determinó usando el test Shapiro-Wilk. Las diferencias entre los grupos y las comparaciones múltiples se analizaron con los test ANOVA-Tukey o Kruskal Wallis-Dunn para distribución paramétrica o no paramétrica, respectivamente. Diferencias entre dos grupos se analizaron con t-test. Las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

RESULTADOS

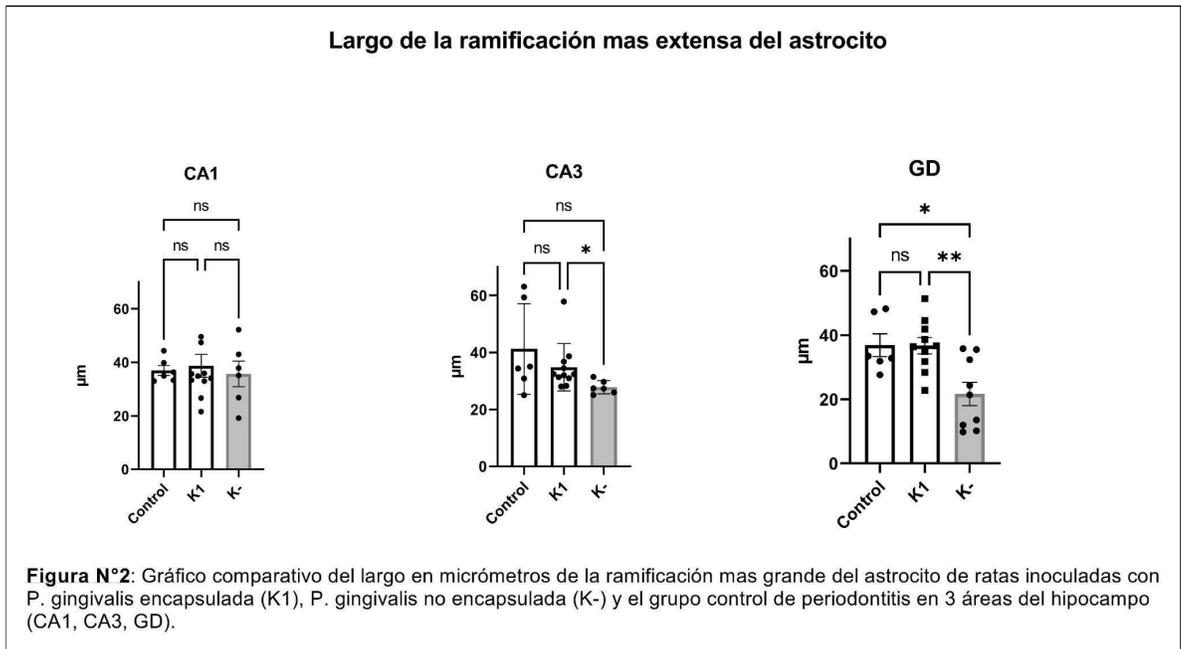
Se evaluaron los cambios morfológicos de los astrocitos hipocampales de ratas inoculadas con serotipo K1 o serotipo K- de *Porphyromonas gingivalis* y se compararon con el grupo control de periodontitis (inoculado con salino). Se graficaron los datos para diferentes parámetros, diferenciándose según región del hipocampo (CA1, CA3 y GD), obteniéndose los siguientes resultados:

Análisis Skeleton

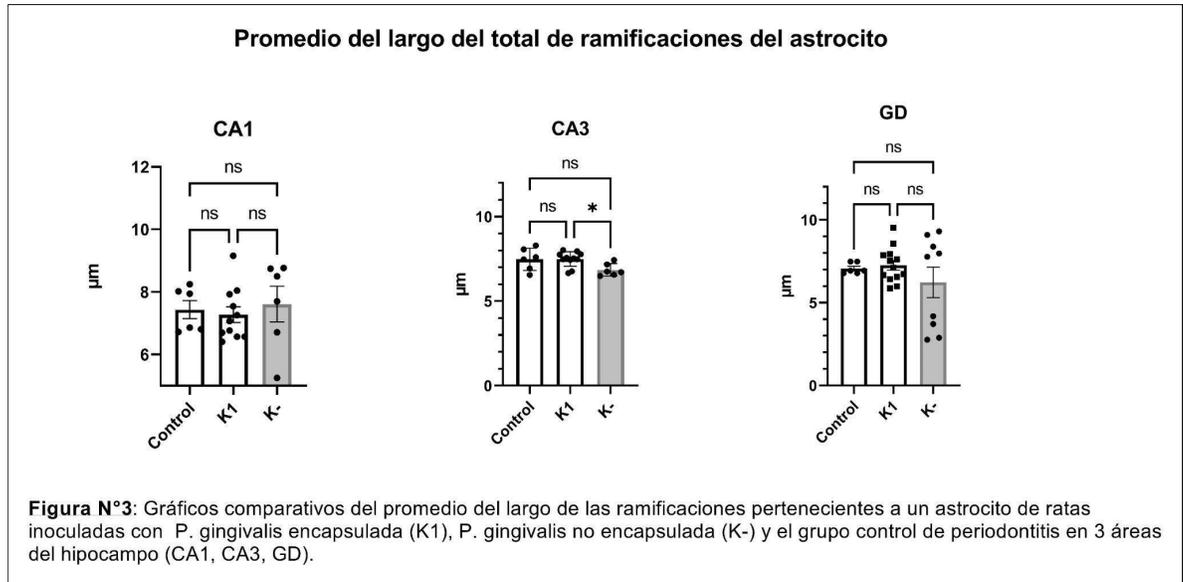
1) **Número de ramificaciones del astrocito:** Como primera aproximación, medimos el número total de ramificaciones en los astrocitos inmunomarcados con GFAP. En el número de ramificaciones de los astrocitos de ratas inoculadas con el serotipo K1 o la cepa no encapsulada K- no se encontraron diferencias con respecto al control. Sin embargo, se observa de manera significativa que los astrocitos en las ratas inoculadas con el serotipo K1 tienen más ramificaciones que las inoculadas con la cepa no encapsulada K- (Figura N°1).



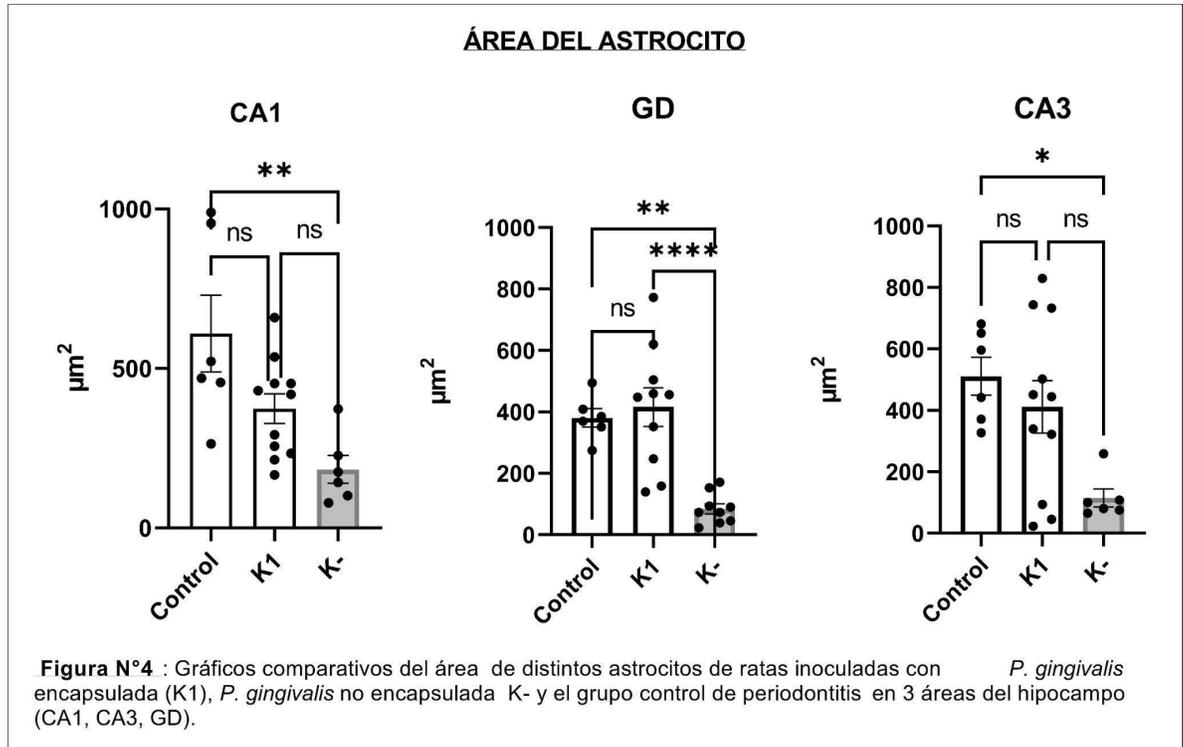
2) Largo de la ramificación más extensa: En las ratas inoculadas con las distintas cepas de *Porphyromonas gingivalis* se observó que las ratas inoculadas con K1 tienen sus ramificaciones más extensas de mayor longitud que las ratas inoculadas con K- (Figura N°2), sugiriendo un mayor tamaño. En GD, los astrocitos de las ratas inoculadas con K- también mostraron ser significativamente menores que los de ratas control.



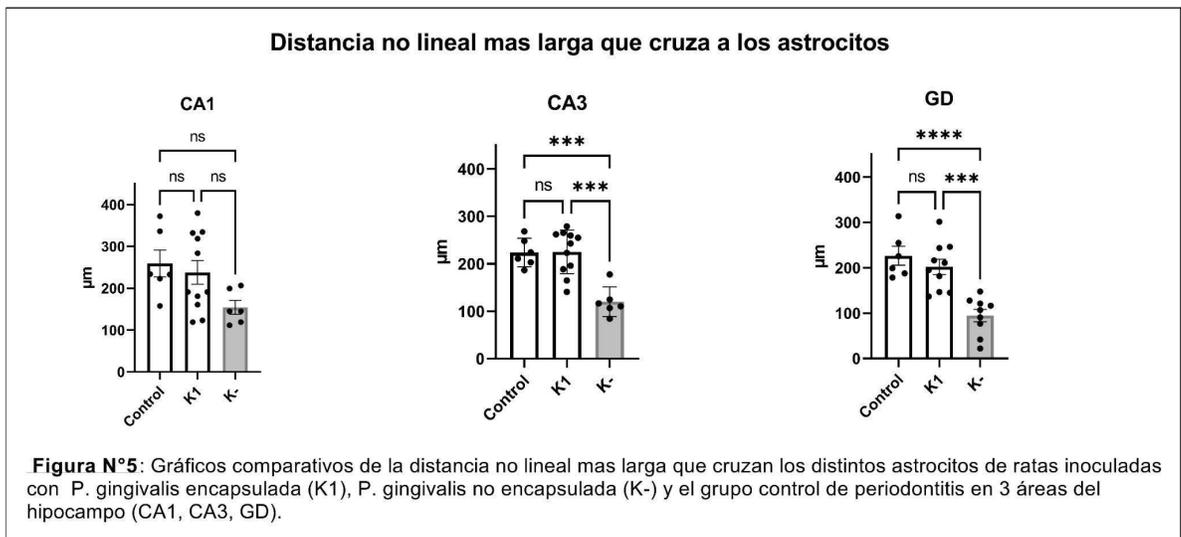
3) Promedio del largo del total de ramificaciones del astrocito: No se aprecian diferencias significativas (Figura N°3).



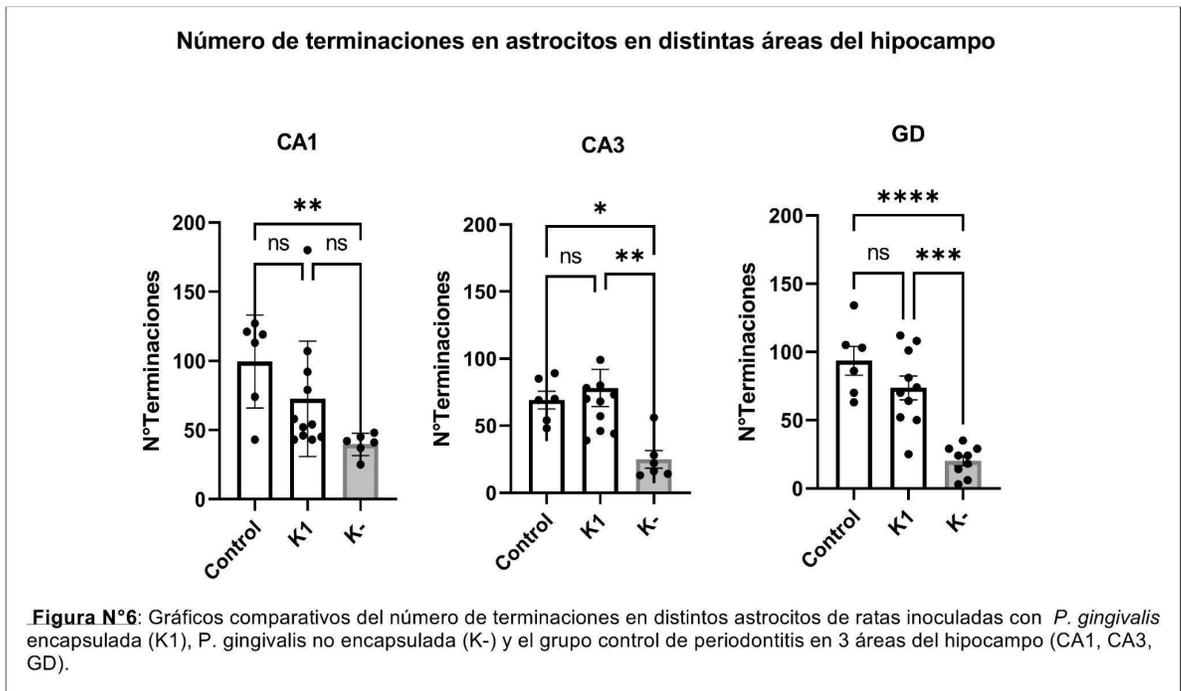
4) Área del astrocito: Los astrocitos de las ratas inoculadas con la cepa no encapsulada K- disminuyen significativamente su área con respecto al grupo control y las ratas inoculadas con el serotipo K1 (Figura N°4).



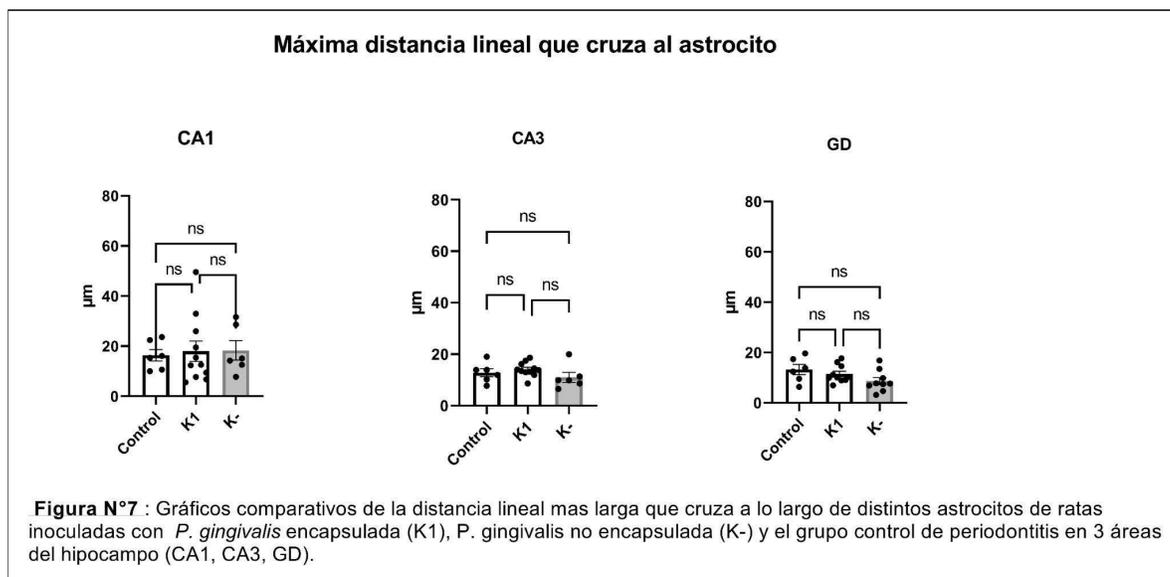
5) Distancia no lineal más larga que cruza toda la célula. Se aprecia un efecto selectivo arrojando menores valores en las longitudes máximas no lineales que recorren la célula en las ratas inoculadas con la cepa no encapsulada K⁻, lo cual, podría significar que las células se vuelven más pequeñas o más tortuosas (Figura N°5). Debido a este resultado, es que evaluamos el parámetro de distancia lineal (en detalle más adelante).



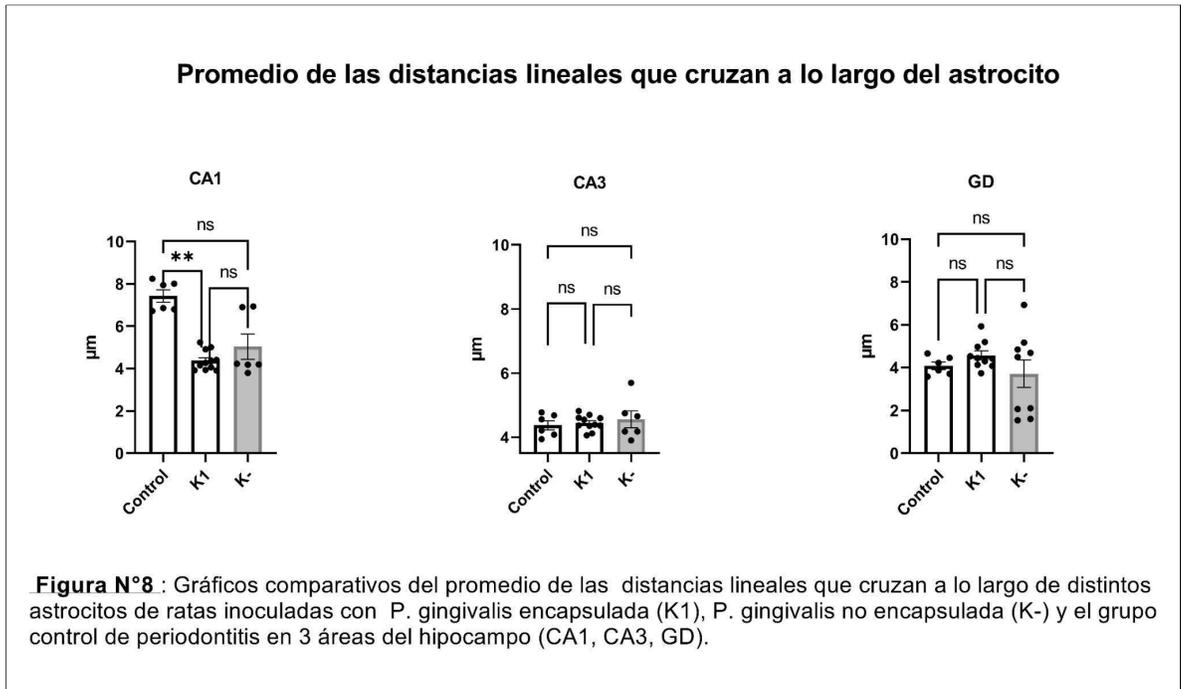
6) Punto terminal de una ramificación: Se observó un efecto selectivo en las 3 áreas evaluadas del hipocampo en donde las ratas inoculadas con la cepa no encapsulada tienen considerablemente menor número de terminaciones en sus astrocitos con respecto a las ratas control y rata inoculadas con el serotipo K1 (Figura N°6).



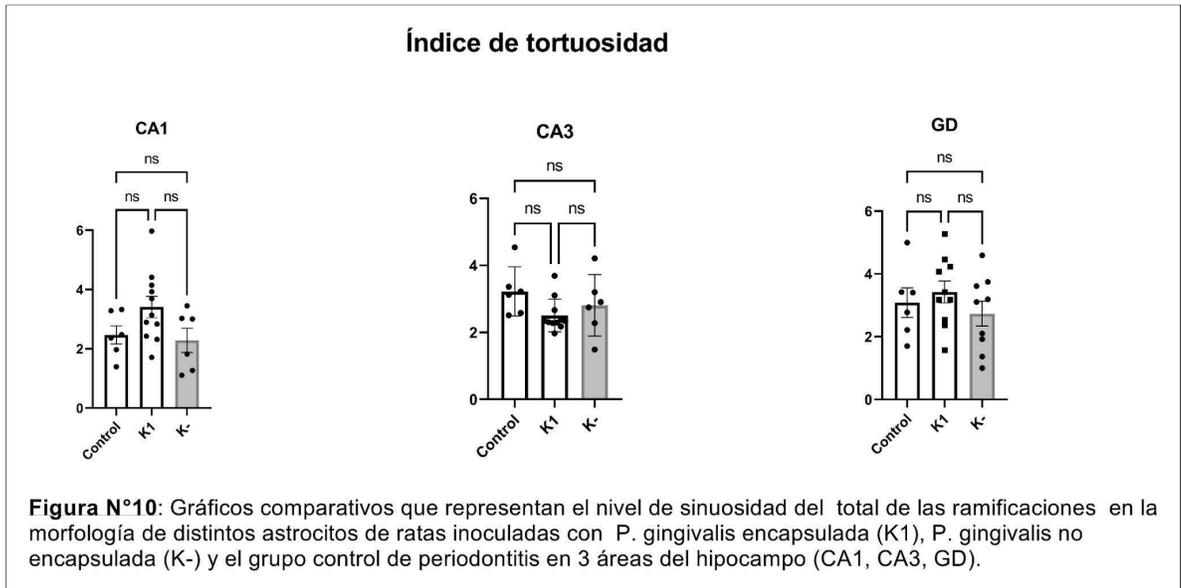
7) **Máxima distancia lineal que cruza al astrocito:** No se detectaron diferencias ni efectos selectivos de los grupos evaluados (Figura N°7).



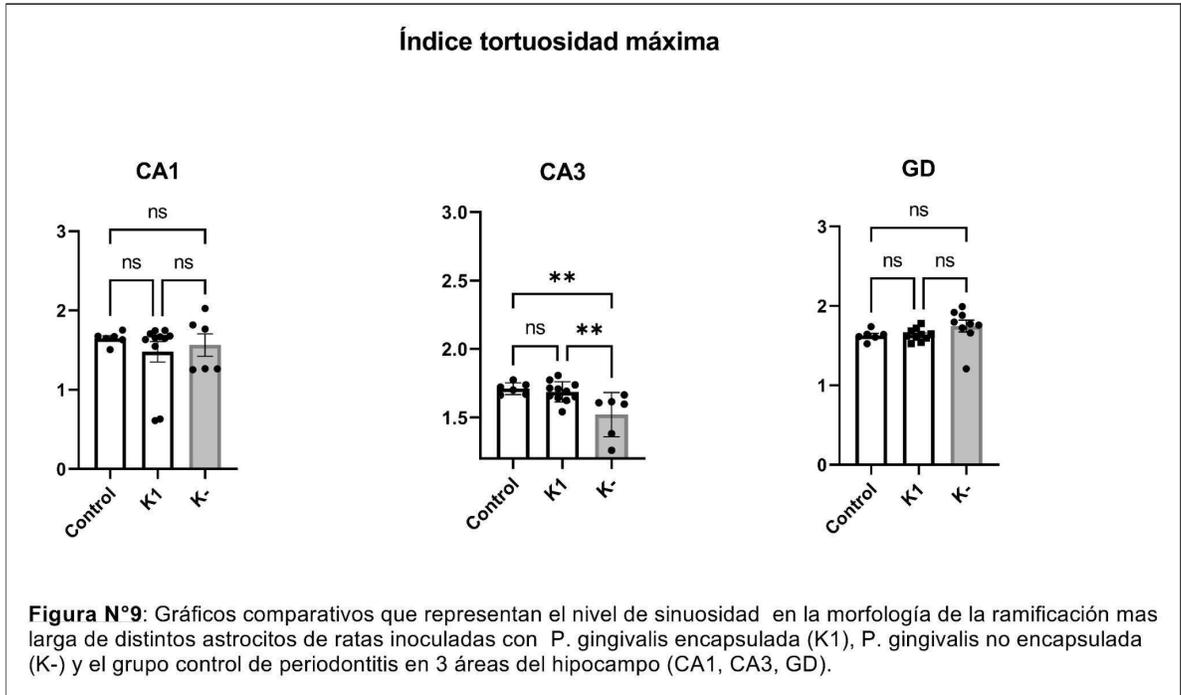
8) Promedio de distancias lineales que cruzan al astrocito: Existe un efecto selectivo en los promedios de las distintas distancias lineales evaluadas en cepa encapsulada y no encapsulada, sin embargo, este no es significativo en la muestra. (Figura N°8).



9) Índice de tortuosidad: Se observa un efecto selectivo en la región CA3 del hipocampo que indica que los astrocitos en el grupo inoculado con *P. gingivalis* encapsulada muestran mayor sinuosidad en su morfología con respecto al grupo inoculado con *P. gingivalis* no encapsulada (Figura N°9).



10) Índice de tortuosidad máxima: No hay datos que puedan asociar algún cambio en la sinuosidad de la célula evaluada en los distintos grupos experimentales (Figura N°11).



DISCUSIÓN

En un estudio anterior realizado por nuestro grupo y denominado “*Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by Porphyromonas gingivalis in Wild Type Rats Is Serotype Dependent*” se determinó la presencia de la periodontitis experimental a través de la evaluación del nivel de resorción ósea y de expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias en mucosa palatina, la cual, fue mayor para las ratas inoculadas con serotipo K1 de *P. gingivalis* con respecto a la cepa K-. Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo de todas las ratas se ocupó la prueba del OASIS Maze, donde se observó que no hay diferencias en capacidades motoras en ninguna de las condiciones, pero con un daño a la memoria espacial asociado a la inoculación de los serotipos K1 y K2. Se cuantificó la secreción de moléculas pro-inflamatorias en hipocampo y líquido cerebro-espinal (LCE) donde se observó mayor secreción en las ratas inoculadas con el serotipo K1 y K2 de *P. gingivalis*. Además, se cuantificó el marcador histopatológico de la EA A β 1-42 en el hipocampo, observándose una mayor concentración de este péptido en las ratas inoculadas con los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis*. Para determinar la presencia de astrocitos en las regiones CA1, CA3 o GD, se realizó detección inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Para determinar el número de astrocitos se hizo el recuento total de núcleos teñidos con DAPI en el hipocampo donde se detectó que no hay diferencias en el número de astrocitos en las distintas condiciones. Mediante inmunofluorescencia se cuantificó también la presencia de proteína Tau total y Tau hiperfosforilada en muestras de hipocampo visualizándose una mayor cantidad de proteína Tau hiperfosforilada en la región CA1 de las ratas inoculadas con serotipo K1 (Díaz-Zuñiga y cols., 2020). No obstante, todos los serotipos bacterianos estudiados fueron detectados en el cerebro de las ratas inoculadas, incluyendo el serotipo no encapsulado K-.

Distintos estudios experimentales sugieren que *P. gingivalis* podría difundir desde el sitio inoculado a los distintos órganos y tejidos del hospedero, incluyendo el parénquima cerebral (Díaz-Zúñiga et al, 2020, Dominy et al, 2019). Actualmente, no está claro cuál es la ruta de acceso de estas bacterias al sistema nervioso central. En efecto, se ha observado que los microorganismos migran desde las mucosas respiratorias o periodontales a través del nervio olfatorio o trigémino hacia el cerebro (Mikklossy 2011; Olsen & Singhrao, 2015). Así, cuando los microorganismos colonizan el cerebro son capaces de secretar citoquinas pro-inflamatorias, activar a los astrocitos y degradar proteínas que permitirían que debilite la barrera hematoencefálica (Agrawal & Biswas, 2015; Qi y cols, 2007; Wang y cols, 2019). Es conocido que Los serotipos K1 y K2 de *P.gingivalis* tienen una capacidad de provocar mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como, IL-1 β , IL-6, IL-17, interferón (IFN)- γ y TNF- α en macrófagos y células dendríticas, en comparación con los otros serotipos y cepas no encapsuladas (Vernal y cols., 2013). Se considera que la cepa encapsuladas de *P. gingivalis* expresa mayor cantidad de factores de virulencia que las cepas no encapsuladas y que los serotipos K3, K4, K5 o K6 (d'Empaire y cols., 2006; Díaz-Zuñiga y cols., 2015; Kunnen y cols., 2009; Laine & Winkelhoff, 1998; Melgar, 2014; Vernal y cols ., 2009; Vernal y cols, 2014b). En efecto, el comportamiento de las células inmunes ante los distintos serotipos de *P. gingivalis* no está descrito en los astrocitos.

En este trabajo estudiamos en detalle los efectos morfológicos en los astrocitos de distintas zonas del hipocampo de ratas inducidos por la inoculación palatina del serotipo K1 encapsulado y comparamos directamente con los provenientes de las ratas inoculadas con el serotipo no encapsulado K- de *P. gingivalis*. Para el análisis de las distintas morfologías de los astrocitos a través de las condiciones experimentales mencionadas anteriormente se utilizan los resultados del estudio de Diaz-Zuñiga y cols. año 2020, donde se generó un modelo de periodontitis inoculando la mucosa palatina la cepa de *P. gingivalis* W50

serotipo K1 y la cepa mutante GPA no capsulada K- en ratas. El cambio observado en los distintos parámetros morfológicos analizados en este estudio, muestra que el efecto de K- en la morfología astrocítica es mayor que el de K1.

La morfología de los astrocitos se estudió con el marcador de activación GFAP, la cual es la principal proteína en los astrocitos maduros que participa en la regeneración y la plasticidad sináptica (Midderldorp & Hol, 2011), además se ha visto que en la astrogliosis aumenta GFAP asociándolo con inflamación cerebral (Eng & Ghirnikar, 1994), por lo cual, los resultados serían compatibles con la idea de que K1 es la cepa más virulenta, pues induce mayor inflamación. En cambio, K- estaría asociada a un estado menos inflamatorio, y por ende, con menor expresión y extensión de la marca de GFAP. Así, los resultados de este estudio muestran que los astrocitos de las ratas inoculadas con *P. gingivalis* K- tienen menos números de ramificaciones, menor área, menor número de ramificaciones y terminaciones, menores valores en las distancias no lineales de mayor longitud que recorren la célula en las ratas inoculadas con K1. Así, los astrocitos inoculados con *P. gingivalis* serotipo K1 son más complejos, de mayor tamaño y tortuosidad en su morfología, por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada inicialmente.

En los astrocitos ocurre un proceso denominado “astrogliosis”, el cual se define como un cambio molecular, celular y funcional del astrocito en respuesta a enfermedades que afecten al SNC. La severidad del cambio en los astrocitos depende de la gravedad del daño y de la inflamación, además de la proximidad del astrocito al lugar. Estos cambios están regulados por moléculas de señalización tanto intra como extracelular, lo cual, altera las funciones del astrocito. Se describe que en la astrogliosis ocurre hipertrofia celular y del soma, además de superposición con astrocitos vecinos en respuesta a la neuroinflamación transformándose en un astrocito reactivo, por lo tanto, puede explicar que la inoculación con serotipo K1 en ratas genera un astrocito más complejo debido a

su capacidad de virulencia a diferencia de los astrocitos de ratas inoculadas con cepas no encapsuladas asociadas a menos virulencia, donde la estructura del astrocito se vuelve más simple (Anderson y cols., 2018).

En el estudio de Ilievski en el año 2018 se realizó el modelo de periodontitis a través de la administración oral del serotipo K1 de *P. gingivalis*, donde se detectó una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias, mayor astrogliosis y mayor activación de microglías en comparación con las ratas control (Ilievsky y cols., 2018). Por otro lado, la aplicación de concentraciones supra-fisiológicas de la cepa encapsulada de *P. gingivalis* produjo mayores niveles de neuroinflamación y deterioro cognitivo que el grupo control (Ding y cols., 2018; Dominy y cols., 2019; Ishida y cols., 2017; Leira y cols., 2019; Singhrao y cols., 2015; Zhang y cols., 2018). De esta manera, se sugiere que podría existir un posible rol neuroprotector por inoculación de la cepa no encapsulada de *P. gingivalis*, lo que explicaría los cambios en su morfología. Estos cambios, podrían deberse a las diferencias que existen en la estructura y composición de los polisacáridos capsulares de la bacteria periodontal (Schifferle y cols., 1989).

Las neuronas y los astrocitos reactivos son los responsables de la secreción de A β (Birch y cols., 2014; Frost & Li, 2017; Heneka y cols., 2015). Las ratas afectadas de periodontitis experimental por inoculación del serotipo K1 de *P. gingivalis* secretan mayores niveles de A β con respecto al grupo control y las ratas inoculadas con la cepa no encapsulada. En el estudio de Laine se evalúan 3 cepas de *P. gingivalis* no encapsuladas, las cuales, indujeron abscesos localizados y ocasionalmente una infección diseminada (Laine & Winkelhoff, 1998). Por otra parte, los serotipos encapsulados son resistentes a la fagocitosis, generan abscesos distantes y sepsis (van Winkelhoff y cols., 2002). De esta manera, se sugiere que la diferencia en la virulencia de los serotipos capsulares se considera un factor importante pero no determinante de *P. gingivalis* (Laine & Winkelhoff, 1998).

En el estudio de Díaz-Zuñiga año 2020 se visualiza que las ratas infectadas con los serotipos K1 y K2 muestran mayor problemas de memoria, mayor resorción ósea alveolar, mayor producción de citoquinas y cambios en la morfología astrocitaria. En el análisis Sholl de la región CA1 realizado se observa un ligero aumento en el tamaño y la complejidad de las ramificaciones astrocíticos en la infección por K1. Tal efecto no se aprecia en ninguna rata infectada con cepas bacterianas no encapsuladas (Díaz-Zúñiga y cols., 2020). Sorprendentemente, en este trabajo donde se determina en detalle la morfología del astrocito, el mayor cambio se aprecia en las ratas infectadas con la cepa K- no encapsulada con respecto al grupo control y a las ratas infectadas con K1. En cuanto a las diferencias entre el análisis Sholl y el Skeleton para evaluar morfologías celulares, es que el primero crea una serie de capas concéntricas alrededor del foco de la célula (Binley y cols., 2014). El análisis skeleton es una herramienta computacional que reduce una figura a un conjunto de líneas que pasan por su centro, donde se puede dar información más acabada de la morfología. (Lavado, 2018).

Los astrocitos y microglías requieren mantener sus funciones fisiológicas para una correcta eliminación de A β generando una acumulación de éstas a nivel cerebral (Heneka y cols., 2015; Cai y cols., 2017). Un marcador de progresión de la EA es una menor detección de A β (Hempel y cols., 2018; Pawlowski y cols., 2017; Vega y cols., 2017). La neuroinflamación afecta el metabolismo de las neuronas, alterando la función cognitiva, por lo tanto, una mayor astrogliosis explicaría el peor desempeño en la memoria espacial de las ratas inoculadas con el serotipo K1 de *P. gingivalis* (Cai y cols., 2017). En la astrogliosis ocurre una rápida síntesis de GFAP. En contextos patológicos aparecen fenotipos astrogliales anormales que impulsan cambios neuropatológicos, como por ejemplo en leucodistrofias, leucoencefalopatía, entre otros. En la astrodegeneración se observa disminución en la densidad astrogliar que se acompaña con atrofia morfológica y una pérdida

de función, por lo tanto, disminuyen las capacidades homeostáticas y neuroprotectoras, observándose en enfermedades neuropsiquiátricas, trastornos adictivos, epilepsia y neurodegeneración (Rodríguez y cols., 2009; Verkhratsky y cols., 2019). A través de distintos métodos de tinción se ha podido dilucidar que el astrocito tiene una forma estrellada que la distingue de otras células gliales, se describe además que las ramificaciones del astrocito tienen en su terminación dilataciones que permiten la comunicación con vasos sanguíneos y neuronas. Un astrocito reactivo aumenta su densidad y tamaño, teniendo entre 5-8 ramificaciones principales con terminaciones que se dividen formando redes más delgadas (Nag, 2011). La proteína GFAP etiqueta solo las ramificaciones principales de los astrocitos, las más pequeñas no son reactivas con esta proteína. Se reconoce que estas últimas tienen mayor cantidad de mitocondrias con respecto a los otras ramificaciones, de modo que el metabolismo oxidativo es parte importante para el metabolismo energético de los astrocitos (Matyash & Kettenmann, 2010; Naig, 2011).

En la literatura actual se considera que los subproductos citotóxicos de la *P. gingivalis* como las gingipaínas y la cápsula tienen un agente causal predominante de la EA. Las gingipaínas provocan un aumento de beta-amiloide y de proteína Tau, sin embargo, los inhibidores de gingipaína podrían bloquear daños neuronales disminuyendo los efectos neurotóxicos (Altamirano y cols., 2021; Nakanishi y cols., 2020; Sansores-España y cols., 2021). Por otro lado, la cápsula es una estructura importante en la virulencia de la célula, y aunque el rol exacto aún no está determinado, se sabe que el nivel de adhesión a células epiteliales y de coagregación es mayor en *P. gingivalis* encapsulado, la cual está involucrada en la evasión del sistema inmunológico del huésped, a diferencia de los serotipos

no encapsulados. La cápsula de *P. gingivalis* reduce la respuesta inmunitaria de los fibroblastos gingivales humanos (Brunner y cols., 2010).

En el estudio de Diaz-Zuñiga, las cepas encapsuladas de *P. gingivalis* podrían desencadenar la aparición de neuroinflamación, aparición de marcadores cerebrales de EA y deterioro cognitivo. Por otro lado, ninguno de estos efectos pudo ser observado en las cepas no encapsuladas (Díaz-Zuñiga y cols., 2020). En el presente estudio se aprecia un cambio morfológico considerable de los astrocitos inoculados con la cepas no encapsulada de *P. gingivalis*, incluso, se ha asociado esta cepa con salud periodontal, por lo tanto, se sugiere que podría existir algún rol neuroprotector que aún no ha sido dilucidado asociado a estos cambios morfológicos en los astrocitos, sin embargo, solo los serotipos patógenos de las bacterias activan selectivamente la respuesta inflamatoria en el cerebro, por lo tanto, se requiere profundizar en el rol que cumple la bacteria no encapsulada a nivel cerebral (Diaz-Zuñiga y cols., 2020; Nakanishi y cols., 2020).

Según la inmunotinción con GFAP, se describen cuatro morfologías en astrocitos de corticales humanas: protoplásmico, interlaminar, polarizado y fibrilar. La morfología protoplasmática de los astrocitos humanos describe astrocitos más grandes y más elaborados que los roedores. El cuerpo celular del astrocito humano es pequeño con ~10 mm de diámetro, en tanto sus ramificaciones abarcan 100-200 mm de diámetro (Matyash & Kettenmann, 2010; Naig, 2011; Zhou y cols., 2019). El astrocito interlaminar tiene ramificaciones largas frecuentemente no ramificadas. Los cuerpos celulares de estos astrocitos tienen ~10 mm de diámetro y describe que tienen aproximadamente dos ramificaciones que cruzan capas de la corteza formando una red astrocítica. Estas ramificaciones son tortuosas y, ocasionalmente tienen comunicación con vasos sanguíneos. El astrocito fibrilar tiene ramificaciones más rectas y menos ramificadas, las

ramificaciones de los astrocitos fibrosos se entremezclan y superponen con otros astrocitos, tienen una morfología simple, por lo cual, se sugiere que su participación apunta al metabolismo celular, no así al procesamiento y modulación de la actividad neuronal. Ambas morfologías descritas se pueden asociar con la morfología arrojada en las ratas inoculadas con la cepa no-encapsulada de *P. gingivales* (Bushong y cols, 2004; Matyash & Kettenmann, 2010). El astrocito polarizado tiene ramificaciones largas y rectas, tienen un diámetro constante de ~2-3 μm . Ocasionalmente, los astrocitos polarizados prolongan las ramificaciones a la vasculatura, lo que no fue observado en los astrocitos analizados (Matyash & Kettenmann, 2010).

De los parámetros evaluados, el índice de tortuosidad es un buen medidor de morfología del astrocito y de los cambios que puedan existir en estos con las distintas condiciones experimentadas debido a que nos muestra el nivel de sinuosidad que pueda tener el astrocito, sin embargo, las diferencias en ningún caso fueron significativas.

Por otro lado, el área también se considera un buen indicador de la variación de la morfología debido a que permite evaluar el tamaño y densidad que tenga el astrocito, lo que nos permite comparar los efectos generados, donde nos muestra que las ratas inoculadas con la cepa no encapsulada son más pequeños en comparación con las otras condiciones de manera significativa.

CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo se determinó que:

1.- La periodontitis experimental inducida por *P. gingivalis* no encapsulada K- se asoció a mayores cambios en la morfología de los astrocitos en comparación con la inoculación con serotipo encapsulado K1 y el control.

2. Considerando que la periodontitis experimental inducida por la cepa *P. gingivalis* W50 (serotipo K1) se asoció a neuroinflamación y no así el serotipo K- (Díaz-Zúñiga et al., 2020), siendo este último el serotipo que induce cambios morfológicos más pronunciados en los astrocitos, se podrían asociar los cambios que genera en la morfología astrocitaria con un rol neuroprotector.

A modo general cabe destacar que en este trabajo se aprecia la necesidad de profundizar en el posible rol neuroprotector de la bacteria no encapsulada K- a nivel cerebral, que podría incluso ser un foco de estudio para guiar futuras terapias de enfermedades que involucran neuroinflamación.

ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo n°1: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile



Santiago, a 16 de noviembre de 2017

Certificado n°: 17085-ODO-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el protocolo número **FOUCH-041702**, del Proyecto de Investigación titulado: **"Asociación entre enfermedad periodontal y enfermedad de Alzheimer"**, cuyo Investigador es **Jaime Díaz Zúñiga** y cuyo Patrocinante e Investigadora Responsable es la **Dra. Andrea Paula-Lima** del Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los Investigadores, se han comprometido a la ejecución de este proyecto de investigación dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 42 ratas *Rattus norvegicus* (cepa *Sprague-Dawley*), provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde marzo de 2017 hasta marzo de 2019 tiempo estimado de ejecución del proyecto, el cual será financiado con por los siguientes proyectos **RDP-IADR 2017-2019, Fondecyt N°1150736, Fondecyt N°1140904 y BNI P-09-015F.**

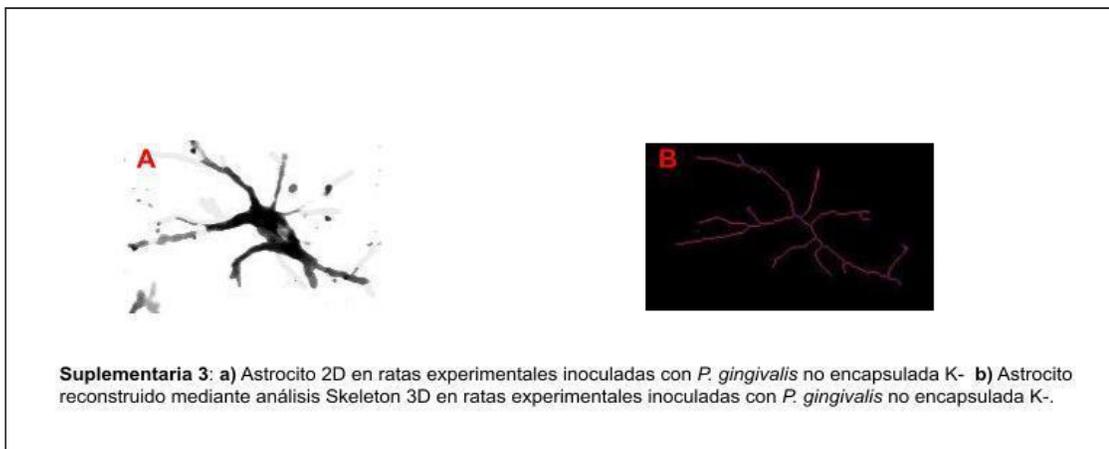
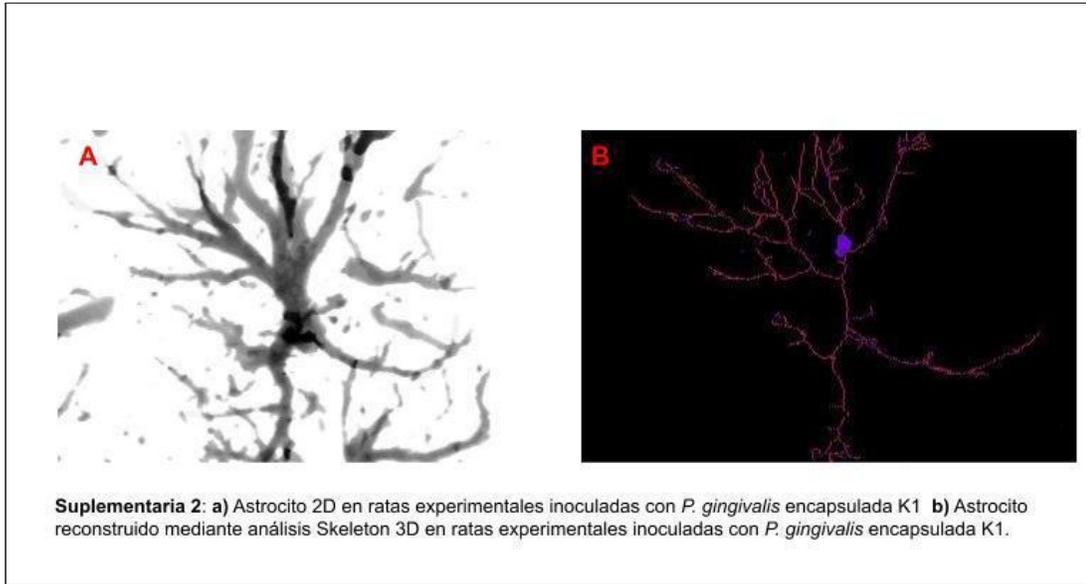
El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director
CICUA - VID
Universidad de Chile



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

Anexo N° 2: Reconstrucción de astrocitos 2D y 3D del análisis Skeleton en las distintas áreas del hipocampo en el antígeno capsular K y serotipo no capsular K- de *Porphyromonas gingivalis*, en un modelo murino de periodontitis experimental que desarrolla neuroinflamación y daño cognitivo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aduse-Opoku J, Slaney J, Hashim A, Gallagher A, Gallagher R, Rangarajan M & Curtis M. Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*. 2006; 74(1): 449-460.

Agrawal M & Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015; 2 (3): 54-67. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00054>

Amano A, Nakagawa I, Okahashi N & Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of periodontal research*. 2004; 39(2): 136-142. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.20265>

Anderson M, Ao Y, Sofroniew M. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*. 2014; 565(2): 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>.

Arganda-Carreras I y cols., 3D Reconstrucion of histological sections: Application to mammary gland tissue". *Microscopy Reseach and Technique*. 2010; 73(11): 1019-1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829>

Baranello R, Bharani K, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri D & Greig N. Vías de depuración y degradación de la proteína amiloib-beta y el papel en la enfermedad de Alzheimer. *Curr Alzheimer Res*. 2015; 12(1) : 32-46. [doi:10.2174/1567205012666141218140953](https://doi.org/10.2174/1567205012666141218140953)

Bermúdez V, Leal E, Bermúdez F, Cano C, Cabrera M, Ambard M & Lemus M. Enfermedad Periodontal como factor de riesgo para la Aterosclerosis. *AVFT*. 2003; 22(2): 153-162.

Binley K, Ng W, Tribble J, Song B, Morgan J. Sholl analysis: a quantitative comparison of semi-automated methods. *J Neurosci Methods*. 2014; 30(225):65-70. doi: [10.1016/j.jneumeth.2014.01.017](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.017).

Birch A, Katsouri L & Sastre, M. Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2014; 11(1): 11-25. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-25>

Bodet C, Chandad F & Grenier D. Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis, *Pathologie Biologie*. 2007; 55 (3): 154–162. [10.1016/j.patbio.2006.07.045](https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.045).

Brown G. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2019; 16(1): 180. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7>

Brunner J, Scheres N & El Idrissi N. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol*. 2010; 10 (1): 5 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-5>

Bushong E, Martone M & Ellisman M. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2004; 22(2): 73-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008>

Cai Z, Wan C & Liu Z. Astrocyte and Alzheimer's disease. *Journal of neurology*. 2017; 264(10), 2068-2074. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8593-x>

Carvajal P. Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2016; 9(2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.001>

Castellani R, Rolston R & Smith M. Enfermedad de Alzheimer. *Dis lun*. 2010; 56 (9): 484-546. [doi: 10.1016 / j.disamonth.2010.06.001](https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001)

Castello M & Soriano S. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Aging Res Rev*. 2014; 13(1) : 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.10.001>

Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova P, Zecchi S, Brothers H & Giovannini M. The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus. *PLoS ONE*. 2012; 7(9): e45250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045250>

Darveau R. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(7) : 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>

de Molon R, Mascarenhas V, de Avila E, Finoti L, Toffoli G, Spolidorio D & Cirelli J. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clinical oral investigations*. 2016; 20(6): 1203-1216. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1607-0>

d'Empaire G, Baer M & Gibson F. The K1 Serotype Capsular Polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* Elicits Chemokine Production from Murine Macrophages

That Facilitates Cell Migration. *Infection and Immunity*. 2006; 74(11): 6236-6243. <https://doi.org/10.1128/iai.00519-06>

Díaz-Zuñiga J, More J, Melgar-Rodriguez S, Jiménez-Unión M, Villalobos-Orchard F, Muñoz-Manriquez C, Monasterio G, Valdés J, Vernal R & Paula-Lima A. Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Frontiers in immunology*. 2020; 11: 588036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588036>

Díaz-Zuñiga J, Yáñez-Figueroa J, Melgar-Rodríguez S, Álvarez-Rivas C, Rojas-Lagos C, Vernal R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2012; 5(1): 40-45. [https://doi.org/10.1016/s0718-5391\(12\)70090-3](https://doi.org/10.1016/s0718-5391(12)70090-3)

Dietrich T, Sharma P, Walter C, Weston P & Beck J. The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of periodontology*. 2013; 84(1): 70-84.

Ding Y, Ren J, Yu H, Yu W & Zhou Y. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity & Ageing*. 2018. 15(1), 1-8. [10.1186/s12979-017-0110-7](https://doi.org/10.1186/s12979-017-0110-7)

Dominy S, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A & Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*. 2019; 5(1): 28-47. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>

Eng L & Ghirnikar R. GFAP and astrogliosis. *Brain pathology*. 1994; 4(3): 229-237. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x>

Estrada R & Zomosa S. Papel de la agregación del péptido Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Educ Bioquímica*. 2017;36(1):2-11.

Fernández-Arjona M, Grondona J, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P & López-Ávalos M. Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017; 11 (1): 235-240.

Frost G & Li Y. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open biology*. 2017; 7(12): 170228. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>

Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W & Arteaga O. Clinical Attachment Loss in Chilean Adult Population : First Chilean National dental examination survey, *Journal of Periodontology*. 2010; 81(10). 1403–1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>

Garlet G. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*. 2010; 89(12): 1349-1363. <https://doi.org/10.1177/0022034510376402>

Grand J, Caspar S & MacDonald S. Clinical features and multidisciplinary approaches to dementia care. *Journal of multidisciplinary healthcare*. 2011; 4 (1): 125.

Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U & Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurología (English Edition)*. 2015; 30(2): 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2014.12.005>

Hajishengallis G & Lamont R. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *European Journal of Immunology*. 2014; 44(2): 328-338. <https://doi.org/10.1002/eji.201344202>

Heneka M, Carson M., El Khoury J, Landreth G, Brosseron F, Feinstein D & Kummer M. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2015; 14(4): 388-405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Hempel H, O'Bryant S, Molinuevo J, Zetterberg H, Masters C, Lista S & Blennow, K. Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nature Reviews Neurology*. 2018; 14(11): 639-652. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0079-7>

Hernández J, Aguilar E & García F. Hippocampus: neurogenesis and learning. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 2015; 15(1): 20-28.

Hu Y, Li H, Zhang J, Zhang X, Xia X, Qiu C, Zhou W. Periodontitis Induced by *P. gingivalis*-LPS Is Associated With Neuroinflammation and Learning and Memory Impairment in Sprague-Dawley Rats. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 14(1): 658. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00658>

Hurtado C, Bojórquez A, Montaña P y cols. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *Oral*. 2016;17(54):1374-1378.

Ilievski V, Zuchowska P, Green S, Toth P, Ragozzino M, Le K & Watanabe K. 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): 0204-221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>

Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, *et al.* Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *npj Aging Mech Dis.* 2017; 3(1): 3-15. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0015-x>

Johnson S, Schmitz T, Asthana S, Gluck M & Myers C. Associative Learning Over Trials Activates the Hippocampus in Healthy Elderly but not Mild Cognitive Impairment. *Aging, Neuropsychology, and Cognition.* 2008; 15(2): 129–145. <https://doi.org/10.1080/13825580601139444>

Kamer A, Dasanayake A, Craig R, Glodzik L, Bry M & de Leon M. Alzheimer's Disease and Peripheral Infections: The Possible Contribution from Periodontal Infections, Model and Hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2008; 13(4): 437-449. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-13408>

Kametani F & Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience.* 2018; 12(1): 25-30. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.0002>

Karperien A, Ahammer H & Jelinek H. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2013; 7 (1): 3.

Knopman D, De-Kosky S, Cummings J, Chui H, Corey-Bloom J & Relkin N. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurología.* 2001; 56 (9) : 1143–1153.

Kunnen A, Dekker D, van Pampus M, Harmsen H., Aarnoudse J, Abbas F & Faas M. M. Cytokine production induced by non-encapsulated and encapsulated *Porphyromonas gingivalis* strains. *Archives of oral biology.* 2009; 57(11): 1558-1566.

Laine M & Winkelhoff A. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*. 1998; 13(5): 322-325. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1998.tb00714.x>

Lavado I. Comparación de algoritmos de cálculo del Skeleton y su aplicación en biología. *Repositorio Universidad de Chile*. 2018. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/152140>

Leira Y, Iglesias-Rey R, Gómez-Lado N, Aguiar P, Campos F, D'Aiuto F & Sobrino T. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced periodontitis and serum amyloid-beta peptides. *Archives of oral biology*. 2019; 99 (1): 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.008>

Luna M, Cubides-Munevar A, Ruiz-Melo C, Alonso S, Pinzón E & Gullozo L. Asociación entre bajo peso al nacer y parto pretérmino en gestantes con signos de enfermedad periodontal atendidas en una institución del nivel primario de salud del valle del cauca-colombia. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 2019; 84(2): 103-111. <https://doi.org/10.4067/s0717-75262019000200103>

Matyash V & Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews*. 2010; 63(1-2): 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>

Melgar-Rodriguez S. Efecto de la estimulación con los distintos serotipos de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en la actividad de los linfocitos TCD4+ y la reabsorción ósea in vitro. *Universidad de Chile*. 2014. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/147391>

Middeldorp J & Hol E. GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*. 2011; 93(3): 421-443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>

Mikklossy J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2011; 13(30): 107-1021
<https://doi.org/10.1017/s1462399411002006>

Montañés P & Matallana D. Detección temprana de la demencia: la perspectiva neuropsicológica. *Acta Neurol Colomb*. 2010; 26(3): 13-20.

Morales A, Bravo J, Baeza M, Werlinger F & Gamonal J. Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2016; 9(2): 203-207. <https://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.004>

More J, Galusso N, Veloso P, Montecinos L, Finkelstein J, Sanchez G, Paula-Lima A y cols. N-acetylcysteine prevents the spatial memory deficits and the redox-dependent RyR2 decrease displayed by an Alzheimer's disease rat model. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018; 10(399): 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00399>

Nag S. Morphology and Properties of Astrocytes. In: Nag S. (eds) *The Blood-Brain and Other Neural Barriers. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Humana Press. 2011; 686(2): 69-100.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_3

Nakanishi H, Nonaka S & Wu Z. Microglial Cathepsin B and Porphyromonas gingivalis Gingipains as Potential Therapeutic Targets for Sporadic Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 2020; 19(7): 495–502.
<https://doi.org/10.2174/1871527319666200708125130>.

Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. *The Scientific World Journal*, 2020; 2020(1): 1-8. [10.1155/2020/2146160](https://doi.org/10.1155/2020/2146160)

Oliveira-Junior M, Pereira E, de Amorim V, Reis L, do Nascimento R, da Silva V & Costa S. Lupeol inhibits LPS-induced neuroinflammation in cerebellar cultures and induces neuroprotection associated to the modulation of astrocyte response and expression of neurotrophic and inflammatory factors. *International Immunopharmacology*. 2019; 70 (1): 302-312. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.055>

Olsen I & Singhrao S. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *Journal of Oral Microbiology*. 2015; 7(1): 243-291. <https://doi.org/10.3402/jom.v7.29143>

Pardo-Romero F, Hernández L. Periodontal disease: epidemiological approaches for its analysis as a public health concern. *Rev. Salud Pública*. 2018; 20 (2): 258-264. <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n2.64654>

Paula-Lima A, Adasme T, SanMartín C, Sebollela A, Hetz C, Carrasco M & Hidalgo C. Amyloid β -Peptide Oligomers Stimulate RyR-Mediated Ca^{2+} Release Inducing Mitochondrial Fragmentation in Hippocampal Neurons and Prevent RyR-Mediated Dendritic Spine Remodeling Produced by BDNF. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011; 14(7), 1209–1223. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3287>

Pawlowski M, Meuth S & Duning T. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease—From brain starch to bench and bedside. *Diagnostics*. 2017; 7(3): 42-55. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7030042>

Pihlstrom B, Michalowicz B & Johnson N. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005; 366(9499): 1809–1820. [doi:10.1016/s0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67728-8).

Qi J, Wu H, Yang Y, Wang D, Chen Y, Gu Y & Liu T. Cerebral Ischemia and Alzheimer's Disease: The Expression of Amyloid- β and Apolipoprotein E in Human Hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2007; 12(4), 335–341. <https://doi.org/10.3233/jad-2007-12406>

Reichenbach N, Delekate A, Plescher M, Schmitt F, Krauss S, Blank N & Petzold G. Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Molecular Medicine*. 2019; 11(2): e9665. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809665>

Rodriguez J, Olabarria M, Chvatal A & Verkhratsky A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death & Differentiation*. 2009; 16(3): 378-385. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.172>

Rohan F & Yirmiya R. Microglia, physiology and behavior: A brief commentary. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016; 55(1): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.006>

Sagare A, Bell R & Zlokovic B. Neurovascular Dysfunction and Faulty Amyloid -Peptide Clearance in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(10): a011452. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011452>

Sansores-España D, Carrillo-Avila A, Melgar-Rodriguez S, Díaz-Zuñiga J & Martínez-Aguilar V. Periodontitis and Alzheimer's disease. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2021; 26(1): 43-48. <https://doi.org/10.4317/medoral.23940>

Septiawidjati T & Bachtiar E. The Role of *Porphyromonas gingivalis* Virulence Factors in Periodontitis Immunopathogenesis. *Dentika Dental Journal*. 2020; 23(1): 6-12. <https://doi.org/10.32734/dentika.v23i1.3421>

Singhrao S, Harding A, Poole S, Kesavalu L & Crean S. Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. *Mediators of inflammation*. 2015; 15(2): 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/137357>

Singhrao S & Olsen I. Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. *Journal of Oral Microbiology*. 2019; 11(1): 1563405. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563405>

Scheiblich H, Trombly M, Ramirez A & Heneka M. Neuroimmune Connections in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Trends in Immunology* 2020, 41(4), 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.02.002>

Schifferle R, Reddy M, Zambon J, Genco R & Levine M. Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol*. 1989; 143(9):3035-3042

Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L , Wong A, Cappell J & Herrmann N. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. 2010; 68(10): 930-941. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.012>

Tang Y & Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016; 53(1), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>

Tsai C, Tang C, Tan T, Chen K, Liao K, Liou M. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018;51(2):226-234. [doi:10.1016/j.jmii.2016.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.04.007)

Van Winkelhoff A, Loos B, Van Der Reijden W & Van Der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of clinical periodontology*. 2002; 29(11): 1023-1028. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2002.291107.x>

Vega I, Cabrera L, Wygant C, Velez-Ortiz D & Counts S. Alzheimer's disease in the Latino community: Intersection of genetics and social determinants of health. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 58(4): 979-992. [10.3233/jad-161261](https://doi.org/10.3233/jad-161261)

Venâncio, A. Infecção bacteriana neonatal como fator de risco para predisposição à doença de Alzheimer em camundongos. *Repositorio Institucional UFSC*. 2017; <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/186846>

Vernal R, Diaz-Guerra E, Silva A, Sanz M & Garcia-Sanz J. Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013; 41(1): 19-30. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12176>

Verkhatsky A, Rodrigues J, Pivoriunas A. y cols.. Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2019; 471 (1): 1247–1261 <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02310-2>

Vernal R, León R, Silva A, van Winkelhoff A, Garcia-Sanz J, & Sanz M. Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009; 36(10): 823-829. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2009.01462.x>

Vernal R, Díaz-Zuñiga J, Melgar-Rodriguez S, Pujol M, Diaz-Guerra E, Silva A, Garcia-Sanz J. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T

lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*. 2014; 41(5): 451-459. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12236>

Vincent R, Appukuttan D, Victor D & Balasundaram A. Oxidative stress in chronic periodontitis patients with type II diabetes mellitus. *European Journal of Dentistry*. 2018; 12(02): 225-231. https://doi.org/10.4103/ejd.ejd_244_17

Wang P & Ohura K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts—CD14 and Toll-like receptors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002; 13(2): 132-142. <https://doi.org/10.1177/154411130201300204>

Wang Y, Kang X, Cao Y, Zheng D, Lu, Y., Pang C & Peng Y. Porphyromonas gingivalis induces depression via downregulating p75NTR-mediated BDNF maturation in astrocytes. *Brain, behavior, and immunity*. 2019; 81(2), 523-534. [10.1016/j.bbi.2019.07.012](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.012)

White D, Tsakos G, Pitts N, Fuller E, Douglas G, Murray J y cols. Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact on the population. *Br Dent J*. 2012; 213 (11): 567–572. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2012.1088>

Wolf S, Boddeke H y Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*. 2017; 79(1): 619-643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>

Zhang J, Yu C, Zhang X, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *J Neuroinflammation*. 2018; 15(1): 15- 37. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1052-x>

Zhou B, Zuo Y & Jiang R. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2019; 25(6): 665-673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>