



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

**“DETECCIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* EN CEREBRO DE RATAS
SPRAGUE-DAWLEY AFECTADAS DE PERIODONTITIS
EXPERIMENTAL”**

Constanza Javiera Muñoz Manríquez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Jaime Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Andrea Paula-Lima

Prof. Samanta Melgar Rodríguez

**Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2017-2019
FONDECYT 1181780**

Santiago Chile

2020



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

**“DETECCIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* EN CEREBRO DE RATAS
SPRAGUE-DAWLEY AFECTADAS DE PERIODONTITIS
EXPERIMENTAL”**

Constanza Javiera Muñoz Manríquez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Jaime Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Andrea Paula-Lima
Prof. Samanta Melgar Rodríguez

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2017-2019
FONDECYT 1181780

Santiago Chile

2020

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Gerardo y Nadia, por su amor y apoyo incondicional durante todo este camino, celebrando conmigo los pequeños triunfos y alentándome durante los momentos difíciles, gracias por todo el esfuerzo que han hecho por darme una buena educación y por siempre creer en mí.

A mis amigos que conocí en esta etapa, gracias por alegrar mis días buenos y también mis días malos, por ser un apoyo muy importante durante estos años de universidad, entregándome buenos momentos y grandes consejos que atesoraré con mucho cariño.

Al Dr. Jaime Díaz y a la Dra. Samanta Melgar, gracias por su excelente disposición y por permitirme ser parte de su proyecto de investigación. Gracias por guiarme en este proceso, por su paciencia, ayuda y dedicación.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | |
| 2. MARCO TEORICO | 1 |
| 2.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 1 |
| 2.2. <i>P. gingivalis</i> y su capacidad invasora | 3 |
| 2.3. Detección de microorganismos en tejidos cerebrales | 3 |
| 2.4. Planteamiento del problema | 5 |
| 3. HIPÓTESIS | 7 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 7 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 7 |
| 6. METODOLOGÍA | 8 |
| 6.1 Cultivo bacteriano | 8 |
| 6.2 Modelo de periodontitis experimental | 8 |
| 6.3 Extracción de líquido cerebro-espinal, sangre periférica y cerebro | 9 |
| 6.4 Obtención de DNA purificado | 10 |
| 6.5 Detección del gen 16S DNA de <i>P. gingivalis</i> y genes <i>rgpA</i> y <i>kgp</i> | 10 |
| 6.6 Inmunofluorescencia | 11 |
| 6.7 Detección de gingipaína <i>RgpA</i> mediante citometría de flujo. | 11 |
| 6.8 Análisis de datos | 12 |
| 7. RESULTADOS | 13 |
| 7.1 Detección de la gingipaína <i>RgpA</i> de <i>P. gingivalis</i> mediante citometría de flujo | 13 |
| 7.2 Detección del gen 16S DNA de <i>P. gingivalis</i> mediante qPCR | 14 |
| 7.3 Detección de genes <i>rgpA</i> y <i>kgp</i> mediante qPCR | 14 |
| 7.4 Detección de gingipaína <i>RgpA</i> de <i>P. gingivalis</i> en región CA1 de hipocampo | 15 |
| 8. DISCUSIÓN | 17 |
| 9. CONCLUSIONES | 22 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 23 |
| 11. ANEXOS | 33 |
| Anexo N°1: Certificado Comité Institucional de Cuidado y uso de Animales de la Universidad de Chile | 33 |

| | |
|---|----|
| <i>Anexo N° 2: Certificado Comité institucional de Bioseguridad, Administración conjunta Campus Norte, Universidad de Chile</i> | 34 |
| <i>Anexo N°3: Partidores específicos utilizados para detección por qPCR</i> | 35 |

1. RESUMEN

Introducción: La periodontitis es una patología de naturaleza inflamatoria crónica multifactorial, una de las patologías más prevalentes en la cavidad oral y es causada por microbiota subgingival disbiótica conformada por una gran variedad de bacterias. Una de ellas corresponde a *Porphyromonas gingivalis*, patógeno clave asociado al inicio y progresión de la enfermedad periodontal, pudiendo además afectar a otros tejidos. Diversos estudios han confirmado la relación entre diferentes infecciones microbianas, el deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer (EA), estipulando un posible origen infeccioso. Además, recientemente se ha detectado a *P. gingivalis* en el cerebro de individuos que fallecieron y estaban afectados de EA. Debido a ello es necesario determinar si *P. gingivalis* puede ser detectada en distintos tejidos cerebrales y no cerebrales de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis experimental inducida por inoculación mono infecciosa de los distintos serotipos capsulares y cepas no encapsuladas de *P. gingivalis*.

Objetivo: Determinar si mediante la inoculación palatina de los distintos serotipos capsulares o la cepa no encapsulada de *P. gingivalis* es posible detectar la bacteria en sitios extraorales en ratas Sprague-Dawley *wild-type*.

Materiales y métodos: Se utilizaron 30 ratas Sprague-Dawley *wild-type* macho de 4 semanas de edad, a las cuáles se les indujo periodontitis experimental mediante la inoculación palatina de los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*. Para esto, a un total de 30 ratas se les inoculó 100 μ L del serotipo K1 (6), K2 (6), K4 (6) y la cepa mutante carente de cápsula GPA (6). En el caso del grupo control negativo de inyección (*Sham*) se inyectaron 100 μ L de medio de cultivo sin bacterias (6). Luego de 55 días desde la primera inoculación de las bacterias todas las ratas se eutanasiaron según las muestras a aislar. Se obtuvieron muestras biológicas de sangre periférica, hipocampo, corteza cerebral y líquido cerebro-espinal (LCE) para cuantificar la presencia de gingipaína RgpA, el gen 16S DNA de *P. gingivalis* y los genes *rgpA* y *kgp* mediante qPCR y citometría de flujo, e identificar *P. gingivalis* mediante inmunofluorescencia. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA).

Resultados: En todas las muestras biológicas se detectó un incremento en la carga bacteriana de *P. gingivalis*, en la detección de los genes *rgpA* y *kgp* y en la cuantificación de gingipaína RgpA de las ratas inoculadas con los distintos serotipos de *P. gingivalis* en comparación con las ratas *sham*, sin diferencias significativas entre los distintos serotipos. Todos los serotipos bacterianos fueron capaces de invadir el cerebro de las ratas Sprague-Dawley *wild type*.

Conclusiones: Estos datos sugieren que todos los distintos serotipos de *P. gingivalis* (K1, K2, K4 y la cepa no encapsulada GPA), pudieron ser detectados en tejidos extra-orales de ratas Sprague-Dawley *wild type* mediante distintas técnicas moleculares.

2. MARCO TEORICO

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible desencadenada por una microbiota subgingival disbiótica que genera la alteración de la respuesta inmune (Hajishengallis et al., 2012, Hajishengallis, 2014, Hajishengallis, 2015). La disbiosis de la microbiota oral induce una respuesta inmune que produce la destrucción de los tejidos que le otorgan soporte al diente, tales como el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar y puede provocar, eventualmente, la pérdida de los dientes (Socransky, 1998, Armitage, 1999, Schenkein, 2000, Cochran, 2008, Hajishengallis, 2014, Hajishengallis, 2015). Entre las bacterias que generan la disbiosis de la microbiota subgingival se encuentran *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Fusobacterium nucleatum*. Entre ellas, *P. gingivalis* se identifica como un patógeno clave asociado al inicio y progresión de la enfermedad (Socransky & Haffaje, 2002; Herrera et al., 2008).

2.1. *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis es un cocobacilo anaerobio facultativo Gram negativo, asociado a la etiología de la periodontitis. Este microorganismo expresa una serie de factores de virulencia, tales como fimbria, enzimas proteolíticas (gingipaínas), hemaglutininas, lipopolisacárido (LPS) y cápsula extracelular (Yoshino et al., 2007), y exhibe una diversidad genotípica y serotípica que permite una variabilidad intra-especie con la potencialidad de inducir inflamación y destrucción periodontal (Teixeira et al., 2009). Se ha demostrado que la cápsula extracelular cumple un rol importante en la virulencia de *P. gingivalis*. En efecto, en estudios experimentales se ha evaluado el efecto de las cepas encapsuladas y no encapsuladas de *P. gingivalis* inoculadas por vía subcutánea; mientras las cepas encapsuladas más virulentas generaron abscesos en sitios distintos al de la inoculación, la cepa no encapsulada fue menos virulenta y sólo generó abscesos localizados en la zona de la inoculación (Laine & Van Winkelhoff., 1998). Sobre la base de la antigenicidad de su cápsula extracelular, en *P. gingivalis* se han descrito diferentes serotipos,

denominados K1 a K6 (Winkelhoff et al., 1996). Cuando células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos periféricos fueron estimuladas con los distintos serotipos K de *P. gingivalis*, se detectó que los serotipos K1 y K2 indujeron una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias en comparación con los otros serotipos, demostrando una variable inmunogenicidad (Vernal et al., 2009). Posteriormente, en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos capsulares, se detectó que ante los serotipos K1 o K2 se indujo la diferenciación de los linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) 1 o Th17 asociados a inflamación y osteo-destrucción, ante los serotipos K3, K4, K5 o K6, una respuesta Th2 inmuno-moduladora y, ante la cepa no encapsulada GPA, una respuesta T reguladora (Treg) asociada a inmuno-regulación (Vernal et al., 2014). Finalmente, se observó que los serotipos K1 o K2 inducen una mayor frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria en pacientes afectados de periodontitis, en comparación con el serotipo K4 o la cepa no encapsulada GPA, que se asoció a un aumento en la frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria en sujetos sanos (Vernal et al., 2014).

Otro factor de virulencia importante para *P. gingivalis* son las gingipaínas, un grupo de proteasas pertenecientes al grupo de *trypsin-like cystein proteinases*, que cumplen un rol funcional en la regulación de la virulencia del microorganismo, incluida la obtención de aminoácidos de las proteínas del hospedero y la maduración de las fimbrias (Imamura et al., 2003). Las gingipaínas RgpA y RgpB son codificadas por los genes *rgpA* y *rgpB*, respectivamente, y son específicas para péptidos ricos en arginina. Por otro lado, la gingipaína Kgp está codificada por el gen *kgp* y es específica para péptidos ricos en lisina (Poltorak et al., 1998).

RgpA y RgpB son capaces de inactivar citoquinas y sus receptores, estimular la agregación plaquetaria, atenuar la actividad antibacteriana de los neutrófilos por medio de la inhibición del receptor de LPS —CD14—, incrementar la permeabilidad vascular, aumentar la apoptosis de los queratinocitos gingivales y destruir macrófagos CD14⁺ (Stathopoulou et al., 2009). Kgp es capaz de promover la adhesión e invasión bacteriana y, en conjunto con RgpA y RgpB, se asocian al incremento de neutrófilos en los sitios periodontales afectados y al sangrado gingival (Imamura et al., 1997; Beikler et al., 2005). Estas gingipaínas pueden encontrarse

adheridas a la cápsula de *P. gingivalis* o secretadas en forma de complejos (Stathopoulou et al., 2009).

2.2. *P. gingivalis* y su capacidad invasora

P. gingivalis es una bacteria que tiene la capacidad de colonizar la microbiota subgingival, invadir al hospedero, evadir los mecanismos de defensa inmunológica y activar respuestas inmunológicas mediadas por células, induciendo una respuesta inmuno-inflamatoria local, mediante la producción de citoquinas proinflamatorias y liberación de endotoxinas, para destruir los tejidos periodontales y, posteriormente, ingresar a la circulación periférica pudiendo inducir la aterogénesis aórtica y coronaria, la secreción de proteína C reactiva e interleuquina (IL)-6 a nivel hepático y colonizar los vasos placentarios generando riesgo de parto prematuro (López et al., 2002, López et al., 2005, Thanakun & Izumi, 2016, Udagawa et al., 2018, Bagavad Gita et al., 2019, Pizzo et al., 2005, Srinivas et al., 2009). En efecto, *P. gingivalis* es capaz de colonizar la placenta e inducir inflamación mediante el incremento en la producción del factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*, TNF)- α e IL-6 en la placenta y en el cordón umbilical, produciendo también bajo peso al nacer, uno de los principales determinantes de la morbilidad y mortalidad infantil neonatal (López et al., 2002, López et al., 2005, Udagawa et al., 2018). Recientemente, algunos estudios en cadáveres han demostrado la presencia de *P. gingivalis* en el líquido cerebro espinal (LCE) o en el IV ventrículo, sugiriendo que esta bacteria podría ser capaz de colonizar el cerebro (Dominy et al., 2019, Poole et al., 2013).

2.3. Detección de microorganismos en tejidos cerebrales

Mediante diversos estudios se han logrado detectar distintos microorganismos en el cerebro, confirmando la relación entre diferentes infecciones microbianas y el deterioro cognitivo. El Virus herpes simplex tipo 1 (VHS1) reside en el sistema nervioso periférico en el 90% de la población adulta después de la infección que ocurre en la infancia (Itzhaki et al., 2005). Recientemente, se demostró la presencia de VHS1 en muestras de cerebro *post-mortem* de sujetos que estaban afectados o no de enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, se descubrió que el DNA de

VHS1 rara vez está presente en el cerebro de personas jóvenes, por lo que se postula que VHS1 migra al cerebro probablemente en la mediana edad, donde permanece en un estado latente, con una transcripción muy limitada y probablemente una síntesis de proteínas muy baja o nula. La reactivación por latencia ocurre de manera intermitente, causada por eventos como inmunosupresión, infección periférica e inflamación, lo que produce un daño neuronal consecuente, disfunción sináptica progresiva y la pérdida neuronal (Itzhaki et al., 2016, Costa et al., 2017).

Además, las espiroquetas como *Treponema denticola*, son microorganismos comúnmente aislados de sitios afectados de periodontitis. Estos microorganismos patógenos neurotrópicos se han detectado en el ganglio trigeminal, en el hipocampo y en la corteza cerebral, sugiriendo que además de la diseminación hematógene, las espiroquetas podrían migrar mediante las fibras nerviosas (Riviere et al., 2002, Itzhaki et al., 2016). También se ha determinado que la infección por *Treponema pallidum* causa demencia progresivamente lenta, atrofia cortical y amiloidosis local (Miklossy et al., 2011). Tanto *T. pallidum* como *Borrelia burgdorferi* se identificaron dentro de axones de nervios periféricos en animales de experimentación y, ambas espiroquetas, pudieron invadir el sistema nervioso central (SNC). Además, se encontró la presencia de *B. burgdorferi* en la sangre y LCE de pacientes afectados de EA y se observó que células gliales y neuronales expuestas a *B. burgdorferi* aumentaron la síntesis de β -secretasa y proteína precursora de amiloide (del inglés *Amyloid Precursor Protein*, APP), generando una mayor producción del péptido amiloide β (A β) y la formación de placas seniles, e incrementaron los niveles de la proteína Tau fosforilada que originó ovillos neurofibrilares (del inglés *neurofibrillar tangles*, NFTs), los cuales son marcadores histopatológicos de la EA (Selkoe et al., 2016, Tse et al., 2017). Las microglías son las células fagocíticas del cerebro y se reconoce que la activación crónica de TLR2 o TLR4 —clásicamente activados por antígenos bacterianos— induce una respuesta secretora y un fenotipo pro-inflamatorio (Block and Hong, 2005, Heneka et al., 2014, Heneka et al., 2015). El incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias inducen una modificación en el fenotipo de los astrocitos, que son las células responsables de mantener la homeostasis de las neuronas. Así, en condiciones inflamatorias el astrocito de

fenotipo fisiológico se modifica a uno reactivo, que genera un desbalance energético, oxidativo y metabólico en las neuronas. El astrocito reactivo responde secretando mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias y una acumulación de A β extracelular (Glass et al., 2010, Heppner et al., 2015, Fang et al., 2016).

En este contexto, la detección de *P. gingivalis* en LCE y IV ventrículo sugiere la posibilidad de colonización, al menos transitoria, de bacterias anaerobias orales en el cerebro, lo que genera diversas teorías sobre como este microorganismo que habita en la cavidad oral puede migrar y acceder al cerebro (Poole et al., 2013, Dominy et al., 2019, Itzhaki et al., 2016).

2.4. Planteamiento del problema

Actualmente, existen diversos estudios epidemiológicos que han evaluado la salud oral de pacientes afectados de EA. En ellos, existe una asociación entre la severidad de la EA o el grado de deterioro cognitivo con una mayor pérdida de dientes, mayor pérdida del nivel de inserción clínica, mayor índice gingival y mayor índice de sangrado (Kamer et al., 2008, Gurav, 2013, Martande et al., 2014, Ide et al., 2016, Aragon et al., 2019), indicando que existe una relación entre el aumento en la severidad del daño cognitivo y la presencia de periodontitis (Holmes et al., 2009, Ide et al., 2016). Recientemente, se ha hipotetizado que la periodontitis podría estar relacionada con el inicio o progresión de EA mediante dos mecanismos. El primer mecanismo sería mediante la difusión o migración de los mediadores pro-inflamatorios generados en el tejido periodontal hacia el cerebro a través de la circulación sanguínea periférica. El segundo mecanismo sería mediante la invasión directa de patógenos hacia el cerebro, los que pueden ser reconocidos por las microglías, vía receptores tipo *Toll* (del inglés *Toll-like receptors*, TLRs) y así, iniciar una respuesta inflamatoria cerebral (Abbayya et al., 2015). En efecto, tanto *T. denticola* como *P. gingivalis* se han detectado en el LCE o IV ventrículo cerebral en cadáveres de sujetos afectados de EA (Poole et al., 2013, Riviere et al., 2002, Dominy et al., 2019). Además, se han detectado otros microorganismos como el VHS1 y *B. burgdorferi* en cerebro *post-mortem* de pacientes con EA (Miklossy, 2006, Itzhaki et al., 2016), por lo que se especula un posible origen infeccioso (Heneka et al., 2014, Heneka et al., 2015). Esto sugiere que una bacteria o una comunidad de

microorganismos podrían colonizar transitoria o permanentemente el cerebro e inducir una respuesta inflamatoria capaz de iniciar los eventos neuroinflamatorios.

En este contexto, se ha definido la colonización de microorganismos en el cerebro como neurobioma, siendo éste una posible causa de neuroinflamación, generando que se produzca un aumento en la liberación de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF- α por parte de células residentes del cerebro (Itzhaki et al., 2016, Fulop et al., 2018). De este modo, la presencia de un neurobioma podría ser un evento desencadenante de neuroinflamación y resulta necesario determinar si *P. gingivalis* u otra bacteria clave de la periodontitis podría migrar desde un sitio periodontal hacia el cerebro. Considerando que, la periodontitis se origina por la disbiosis de la microbiota subgingival y que existe susceptibilidad microbiológica, la cual depende del serotipo o cepa que coloniza al hospedero, sería interesante verificar si los diferentes serotipos poseen capacidades distintas para invadir el cerebro (Vernal et al., 2008, Vernal et al., 2009, Vernal et al., 2014, Díaz-Zúñiga et al., 2015, Rojas et al., 2019). En términos generales, las bacterias, los metabolitos microbianos, sus factores de virulencia o las citoquinas pro-inflamatorias inducidas ante ellas pueden llegar al SNC e iniciar los eventos neuroinflamatorios. Así, el presente estudio pretende determinar si *P. gingivalis* es detectada en distintos tejidos cerebrales y no cerebrales de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis experimental inducida por inoculación monoinfecciosa de los distintos serotipos capsulares y cepas no encapsuladas de *P. gingivalis*.

3. HIPÓTESIS

En un modelo de periodontitis experimental *in vivo*, los serotipos capsulares más virulentos de *Porphyromonas gingivalis*, K1 y K2, son capaces de migrar desde el sitio de inoculación en la mucosa palatina y ser detectados en sitios extraorales.

4. OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de los distintos serotipos capsulares o la cepa no encapsulada de *Porphyromonas gingivalis* o sus factores de virulencia en sitios extraorales de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis experimental.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la presencia de la gingipaína RgpA en muestras de suero, líquido cerebro-espinal e hipocampo de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas por periodontitis inducida por la inoculación de *P. gingivalis*.
2. Cuantificar la presencia del gen de la subunidad 16S en muestras de suero, líquido cerebro-espinal, hipocampo y corteza cerebral, y los genes *rgpA* y *kgp* en hipocampo y corteza cerebral de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas por periodontitis inducida por inoculación de *P. gingivalis*.
3. Identificar la presencia de la gingipaína RgpA de *P. gingivalis* mediante inmunofluorescencia en la región CA1 de hipocampos de ratas Sprague-Dawley *wild-type* afectadas de periodontitis experimental.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo bacteriano

Para la inoculación de bacterias en la mucosa palatina se utilizaron cepas encapsuladas y no encapsuladas de *P. gingivalis*, W50 (serotipo K1), HG184 (K2), ATCC®49417™ (K4) y la cepa W50 mutante carente de cápsula Δ PG0116-PG0120 (GPA), las que se cultivaron tal como se describió previamente (Vernal et al., 2009). Cada una de las cepas bacterianas se cultivaron en 10 mL de caldo de cultivo BHI suplementado con hemina y menadiona hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm (Halo RB-10 UV-VIS Spectrophotometer, Dynamica, Germany). Se realizaron mediciones espectrofotométricas en distintos tiempos hasta que el microorganismo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO se tomó una muestra de 100 μ L, la que se diluyó de forma seriada (\log_{10}) en tampón fosfato salino (PBS). De cada dilución se sembraron 100 μ L en agar sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona. Luego de 5-7 días, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se contrastó con las densidades ópticas correspondientes. Las curvas DO *versus* tiempo y DO *versus* UFC se graficaron para obtener un número conocido de bacterias en fase de crecimiento exponencial para realizar la inoculación con una concentración conocida de bacterias.

6.2 Modelo de periodontitis experimental

Para la inducción de la infección periodontal se utilizaron 30 ratas Sprague-Dawley macho de 4 semanas de edad, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas se alojaron en jaulas separadas, con filtros de aire y en condiciones estándar bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad a $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 40-70% de humedad relativa, con agua y alimentación *ad libitum*, excepto cuando se indicaron otras condiciones. La periodontitis experimental se indujo mediante la inoculación directa de cada una de las cepas de *P. gingivalis* (Díaz-Zúñiga et al., 2020, Monasterio et al., 2018; Garlet et al., 2010; Trombone et al., 2009), resuspendidas en medio de cultivo, a una concentración de

1×10^{10} UFC/mL en un volumen de 100 μ L a través de una jeringa de calibre 26G en la mucosa palatina, entre el primer y segundo molar, bajo anestesia general con isoflurano 2%. Este procedimiento se repitió 7 días después para completar una cantidad de 2 inoculaciones. Se realizaron inoculaciones de los serotipos K1, K2, K4 y la cepa no encapsulada GPA de *P. gingivalis* (6 ratas por cada condición). Como control de inyección negativo se utilizaron ratas inyectadas con 100 μ L de medio de transporte de bacterias (Ratas *sham*, 6 ratas).

El protocolo se encuentra aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (17085-ODO-UCH) (Anexo N°1) y CBA 755 (FMUCH) y por el Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo N°2).

6.3 Extracción de líquido cerebro-espinal, sangre periférica y cerebro

Luego de 55 días desde la primera inoculación de las bacterias todas las ratas se eutanasiaron según las muestras a aislar. Cuatro ratas por grupo se anestesiaron con Isoflurano al 2% utilizando sistema de anestesia controlada y se posicionaron en el esterotáxico para extraer aproximadamente 200-250 μ L de LCE (Liu and Duff 2008, Nirogi, Kandikere et al., 2009, Mahat, Ahamed et al., 2012). Luego, bajo los efectos anestésicos, se extrajeron de 2,5 a 3,5 mL de sangre periférica mediante punción cardíaca y se continuó con la eutanasia mediante dislocación cervical. La sangre se traspasó a un tubo tipo Falcon de 50 mL y se incubó durante 30 min a 60°C, seguido de 5 min a 4°C y centrifugó a 1.500 xg por 5 min para obtener el suero. El LCE y el suero obtenido se almacenó a -80°C. Inmediatamente después de ser eutanasiadas, el cerebro *ad integrum* se extrajo y mantuvo en una solución de disección, compuesta por KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ mM, Sacarosa 7,28%, y dextrosa 0,18% suplementado con 2 mL de MgCl₂ 1M, 100 μ L de CaCl₂ 1M y 1 mL de Piruvato 0,3 mM. De cada cerebro se aislaron el hipocampo y la corteza e inmediatamente se preservaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C.

6.4 Obtención de DNA purificado

Para la extracción del DNA, muestras de corteza cerebral, hipocampo, LCE y suero de ratas se digirieron con 180 μ L de tampón de digestión genómica PureLink® y 20 μ L de proteinasa K. Luego, las muestras se incubaron a 55°C por 1–4 horas y, posteriormente, se centrifugaron a velocidad máxima durante 3 min a temperatura ambiente (TA). El *pellet* se resuspendió en 20 μ L de RNAsa A, se mezcló mediante un vórtice e incubó a TA durante 2 min. El *pellet* resultante se resuspendió en 200 μ L de tampón de unión/lisis genómica PureLink® y se agregaron 200 μ L de etanol al 96–100%. Luego, se centrifugó a 10.000 xg durante 1 min a TA. Seguido, se desechó el tubo de recolección y la columna de centrifugado se ubicó en un tubo de recolección PureLink®. Para el lavado del DNA se agregaron 500 μ L de Genomic Wash Buffer 1 preparado con etanol 100% en la columna, se centrifugó la columna a 10.000 xg durante 1 min a TA. Luego, se agregaron 500 μ L de Genomic Wash Buffer 2 preparado con etanol 100% a la misma columna y se centrifugó a velocidad máxima durante 3 min a TA. Para obtener el DNA purificado se colocó la columna de centrifugado en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml, se agregaron 25–200 μ L de PureLink® Genomic Elution Buffer e incubaron a TA durante 1 min y centrifugaron a velocidad máxima durante 1 min a TA. El DNA obtenido se almacenó en PureLink® Genomic Elution Buffer a –20°C.

6.5 Detección del gen 16S DNA de *P. gingivalis* y genes *rgpA* y *kgp*

A partir de 50 ng de DNA obtenidos de hipocampo y corteza se cuantificaron los genes codificantes para *rgpA* y *kgp* y a partir de DNA obtenido de hipocampo, corteza, suero y LCE se cuantificó el gen 16S DNA mediante qPCR utilizando partidores específicos (Anexo N°3), un *kit* KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, USA) según las indicaciones del fabricante y utilizando un equipo StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) se realizó el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos.

6.6 Inmunofluorescencia

Dos ratas por cada grupo se destinaron para análisis mediante inmunofluorescencia. Para el análisis histológico del cerebro, las ratas se perfundieron con 300 mL de solución salina (NaCl) 0,9% p/v seguido de 300 mL de paraformaldehído (PFA) 4% p/v. Luego de aislar el cerebro *ad integrum* se incubó durante 2 hrs en PFA 4% y posteriormente, en solución de sacarosa 30% p/v con 1mL de Azida. Posteriormente se obtuvieron cortes de 10 μ m de grosor en crióstato y se almacenaron en PBS 1x a 4°C hasta su uso.

Para las inmunofluorescencias se utilizaron anticuerpos primarios contra β -tubulina de clase III para poder visualizar neuronas (anti-TubIII, Abcam, Ab18207, 1:500), contra gingipaína RgpA de *P. gingivalis* (anti-RgpA, 1:200, RgpA R1, Biorbyt, UK), seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón, cabra o conejo (Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 594 o Alexa Fluor® 647, Abcam US, 1:300). Para poder visualizar los núcleos se utilizó un medio de montaje que contiene DAPI (Abcam, ab104139). La obtención de las imágenes se realizó mediante el Microscopio Confocal C2 Plus Espectral (Nikon, USA) y el análisis de las imágenes se realizó con los software NIS Elements Viewer (Nikon Instruments Inc., Mitsubishi, JPY) e ImageJ 5.0 (NIH, MD, USA).

6.7 Detección de gingipaína RgpA de *P. gingivalis* mediante citometría de flujo

En muestras de suero, hipocampo y LCE, se detectó la presencia de gingipaína (RgpA) mediante citometría de flujo. Se centrifugaron 100 μ L de cada muestra a 2.000 xg durante 5 min a 4°C. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 200 μ L de PBS 1X, 5% de suero bovino fetal y anti-RgpA (1:200, RgpA R1, Biorbyt, UK), incubó durante 30 min a 4°C y centrifugó a 2.000 xg durante 5 min a 4°C. Luego, el pellet se resuspendió en 200 μ L de anticuerpo anti-rabbit (Alexa Fluor® 647) durante 30 min a 4°C y se centrifugó a 2.000 xg durante 5 min a 4°C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 200 μ L de PBS 1x y realizó la lectura en el citómetro de flujo (FACSCantoA, BD, Biosciences, NJ, USA). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo LLC, OR, USA).

6.8 Análisis de datos

Los datos de carga bacteriana se expresan en valores promedio \pm desviación estándar de la UFC/mL, la detección de genes se representa como el valor promedio de la cuantificación relativa \pm desviación estándar. Los datos de citometría se expresan en valores promedio \pm desviación estándar del porcentaje de células positivas/células totales. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Levene y analizó 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.

7. RESULTADOS

7.1 Detección de la gingipaína RgpA de *P. gingivalis* mediante citometría de flujo

Una vez establecida la periodontitis experimental como se indica en los resultados previos (Díaz-Zúñiga et al., 2020; Monasterio et al., 2018; Garlet et al., 2010; Trombone et al., 2009), en muestras de suero, LCE e hipocampo de ratas inoculadas con los serotipos K1, K2, K4 o la cepa no encapsulada GPA, se cuantificó la presencia de la gingipaína RgpA (Figura 1). En todas las muestras biológicas se detectó un incremento en la presencia de RgpA en las ratas inoculadas con los distintos serotipos de *P. gingivalis* en comparación con las ratas *sham*. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales.

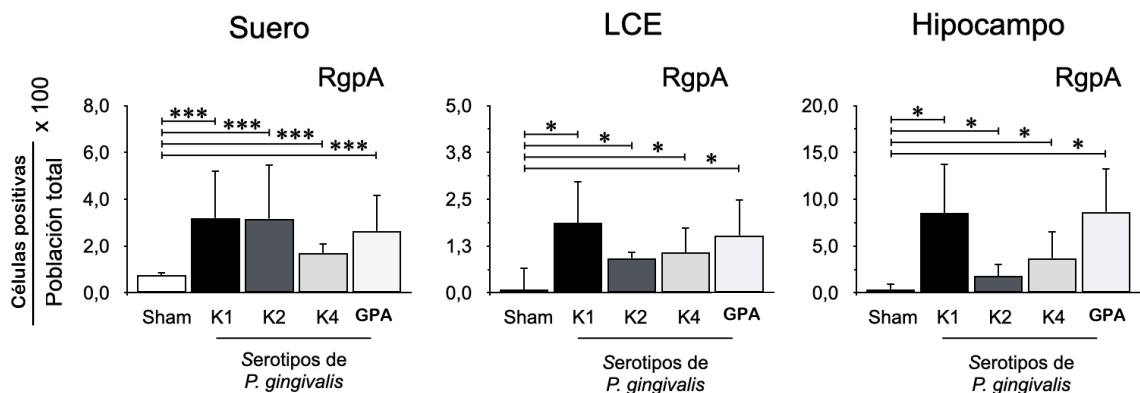


Figura 1. Detección de gingipaína RgpA de *P. gingivalis* mediante citometría. Detección de gingipaína R1 (RgpA) mediante citometría de flujo en suero, LCE e hipocampo de ratas sham (4) e infectadas con el serotipo K1 (4), K2 (4), K4 (4) o la cepa no encapsulada GPA (4). LCE: líquido cerebro-espinal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

7.2 Detección del gen 16S DNA de *P. gingivalis* mediante qPCR

Luego, se detectó la carga bacteriana en muestras de suero, LCE, hipocampo y corteza cerebral (Figura 2). En todas las muestras biológicas se detectó un incremento en la carga bacteriana en las ratas inoculadas con los distintos serotipos de *P. gingivalis* en comparación con las ratas *sham*. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales.

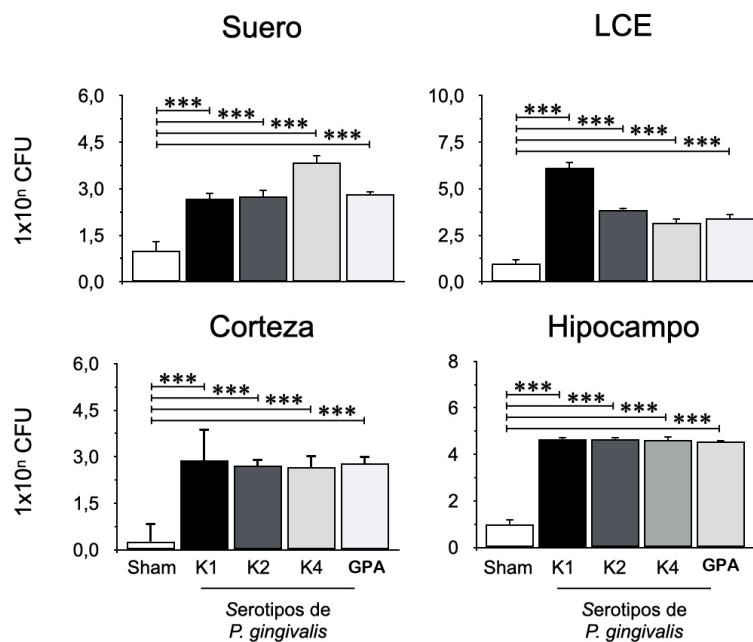


Figura 2. Cuantificación absoluta del gen 16S DNA de *P. gingivalis*. Cuantificación absoluta del gen 16S DNA de *P. gingivalis* en suero, LCE, hipocampo y corteza cerebral de ratas sham e infectadas con el serotipo K1 (4), K2 (4), K4 (4) o la cepa no encapsulada GPA (4). UFC: unidades formadoras de colonias, LCE: líquido cerebro-espal. * $p < 0,05$.

7.3 Detección de genes *rgpA* y *kgp* mediante qPCR

Posteriormente, en el hipocampo y corteza de las ratas infectadas con los serotipos K1, K2, K4, la cepa no encapsulada GPA y las ratas *sham*, se cuantificaron los genes *rgpA* y *kgp*, que codifican para las gingipaínas RgpA y Kgp, respectivamente (Figura 3). En los hipocampos de las ratas experimentales se detectó un incremento de *rgpA* y *kgp* sin detectar diferencias significativas entre los distintos grupos. Del mismo modo, en la corteza cerebral de las ratas infectadas con los serotipos K1, K2, K4 y la cepa no encapsulada GPA se detectó un incremento

de *rgpA* y *kgp*, en comparación con las ratas *sham* y no se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

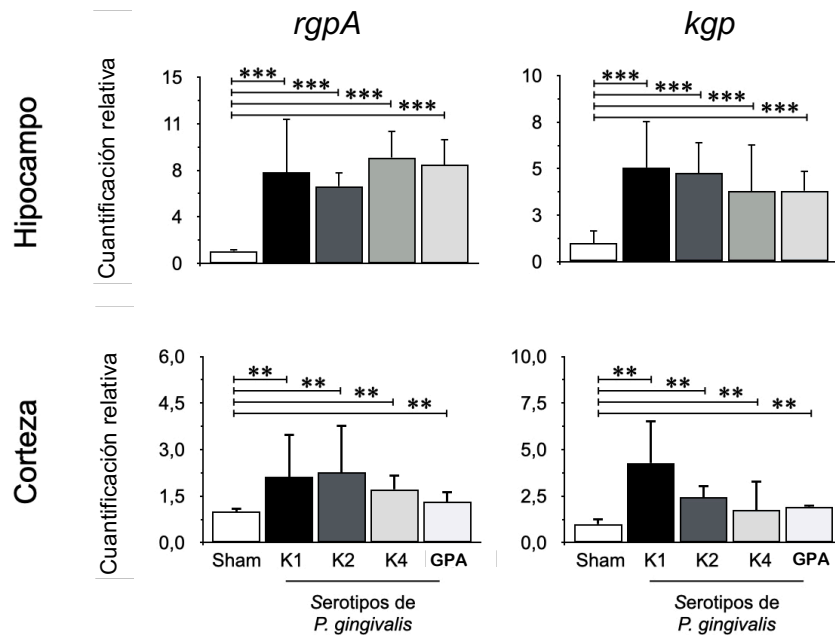


Figura 3. Detección de genes *rgpA* y *kgp* de *P. gingivalis* en hipocampo y corteza. Niveles de *rgpA* y *kgp* de *P. gingivalis* en hipocampo y corteza de ratas *sham* e infectadas con el serotipo K1 (4), K2 (4), K4 (4) o la cepa no encapsulada GPA (4). *** $p < 0,001$.

7.4 Detección de gingipaína RgpA de *P. gingivalis* en región CA1 de hipocampo

Finalmente, y para visualizar la presencia de la bacteria, mediante inmunofluorescencia se identificó a la gingipaína RgpA de *P. gingivalis* en la región CA1 de los hipocampos de todas las condiciones experimentales y controles (Figura 4). En todas las condiciones experimentales existe un aumento en la inmunodetección de RgpA en la región CA1, la cual colocaliza con distintos grupos celulares, siendo las neuronas uno de los detectados en las imágenes.

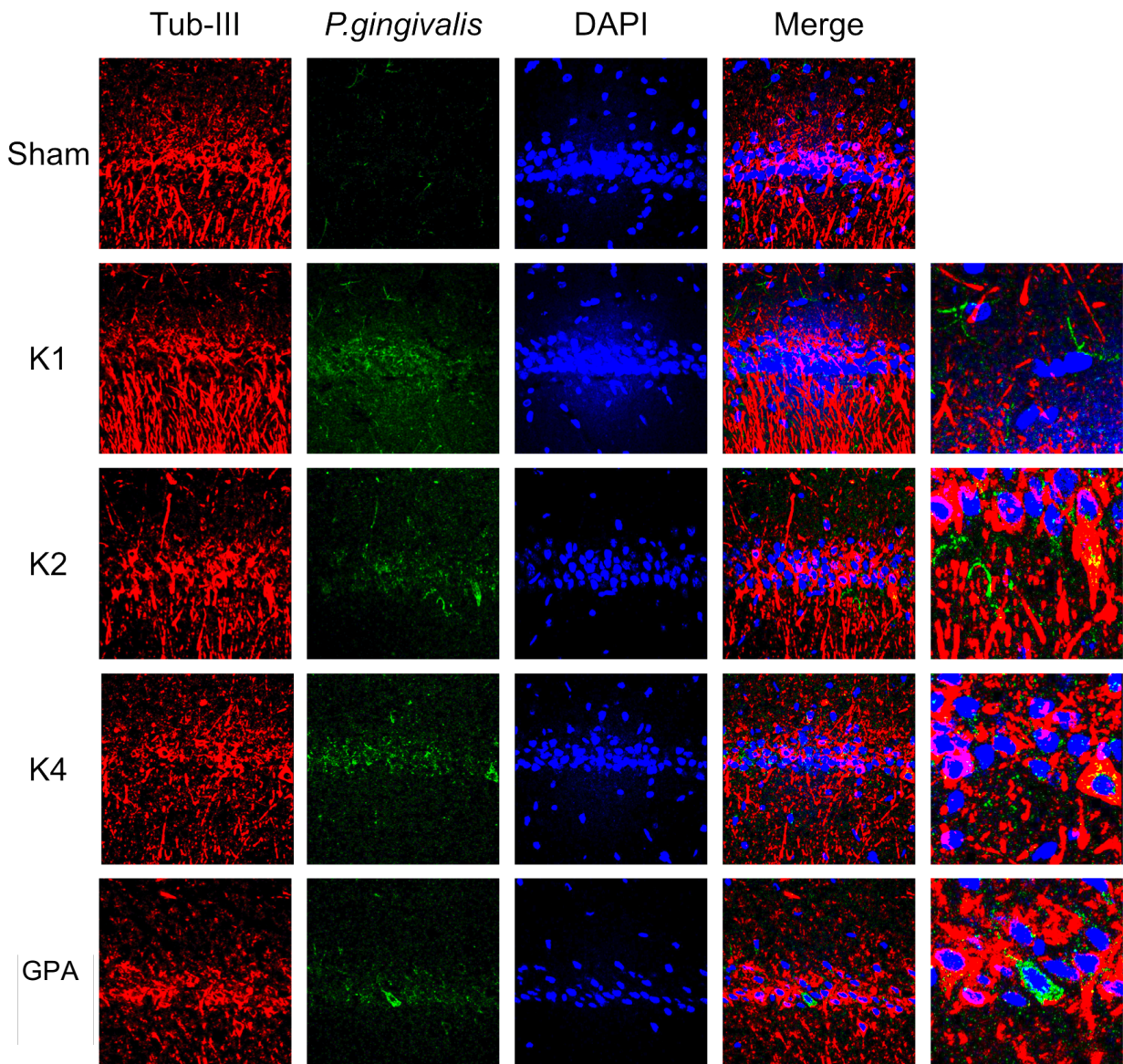


Figura 4. Detección de *P. gingivalis* mediante inmuno-fluorescencia. Inmuno-fluorescencia de la región CA1 del hipocampo de ratas Sprague-Dawley para la detección de gingipaína R1 (RgpA) mediante inmuno-fluorescencia. En rojo las neuronas (Tubulina III), en verde *P. gingivalis* (RgpA), en azul los núcleos (DAPI), en merge la sobreposición de los 3 canales y la quinta columna corresponde al acercamiento de merge (cuarta columna), en zona donde se aprecia la gingipaína RgpA de *P. gingivalis*. Imágenes 2D obtenidas de la proyección 3D de 35 cortes.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo logramos demostrar que en un modelo de periodontitis experimental inducido por la inoculación de distintos serotipos de *P. gingivalis* es posible detectar la presencia de la bacteria en distintos tejidos posterior a 55 días desde la primera inoculación. En particular, logramos determinar que *P. gingivalis* es capaz de ser detectada en el suero, el LCE, el hipocampo y la corteza cerebral, siendo este el primer trabajo que logra demostrarlo con distintas técnicas en diferentes tejidos extra-orales.

Por décadas, el método de preferencia para identificar y cuantificar patógenos periodontales ha sido el cultivo anaeróbico (Lau et al., 2004). Sin embargo, muchas de las especies bacterianas presentes en la microbiota subgingival no son cultivables, ya sea por sus condiciones ambientales estrictas o por las limitaciones inherentes al cultivo bacteriano. Actualmente, existen métodos moleculares de diagnóstico microbiológico como qPCR, cuya precisión ha sido comparada con el cultivo bacteriano, para identificar y cuantificar *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, utilizando muestras clínicas de sujetos sanos y con periodontitis, siendo utilizado no sólo en muestras de microbiota subgingival, sino también en muestras de sangre periférica (Figuro et al., 2014, Boutaga et al., 2005, Lau et al., 2004, Westphal et al., 2005). Estos estudios han demostrado que el PCR convencional o el qPCR proporciona una alta precisión diagnóstica, con alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo, lo que respalda el uso de qPCR como la técnica más apropiada para la identificación de patógenos periodontales u otro microorganismo (Atieh et al., 2008, Tomas et al., 2017).

Diferentes estudios han demostrado que *P. gingivalis* es capaz de ejercer efectos en tejidos no periodontales. Así, se ha descrito la presencia de *P. gingivalis* en la capa íntima de las arterias coronarias donde es capaz de causar inestabilidad de la placa ateromatosa y aumentar el riesgo de infarto agudo al miocardio (Dorn et al., 1999). La bacteria dentro de las lesiones ateroscleróticas produce endotoxinas y expresa factores de virulencia que interactúan con receptores TLR2 en las células endoteliales, induciendo la respuesta inmuno-inflamatoria en el hospedero, creando un entorno pro-trombótico (Chapple et al., 2013). También se ha descrito que puede

colonizar los vasos placentarios, asociándose a parto prematuro, permitiendo especular que la bacteria por sí sola podría inducir estos desenlaces, independiente si existe periodontitis o no (López et al., 2002, López et al., 2005, Thanakun & Izumi, 2016, Udagawa et al., 2018, Bagavad Gita et al., 2019, Pizzo et al., 2005, Srinivas et al., 2009). En efecto, estudios de bacteremia mediante diferentes métodos de diagnóstico han demostrado que las bacterias orales pueden ingresar a la circulación sistémica posterior al cepillado dental (Marín et al., 2016).

Recientemente, *P. gingivalis* y sus factores de virulencia se identificaron en el LCE y en el IV ventrículo de sujetos que fallecieron como consecuencia de la EA (Poole et al., 2013). Además, se demostró la presencia de las gingipaínas RgpB y Kgp de *P. gingivalis* en la corteza cerebral, LCE e hipocampo de humanos diagnosticados con EA, lo que ha proporcionado mayor evidencia de la migración de *P. gingivalis* hacia el SNC (Dominy et al., 2019). Dada esta evidencia se plantea que la presencia de *P. gingivalis* en el cerebro podría ser capaz de iniciar la neuroinflamación, debido a un posible origen infeccioso (Itzhaki et al., 2016).

Actualmente, se ha especulado que la hipótesis de la cascada amiloide — que se origina con la neuroinflamación—, podría tener un origen infeccioso. En efecto, distintos microorganismos se han detectado en el cerebro tales como virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) (Itzhaki et al., 2016), citomegalovirus (Lövheim et al., 2018), *Candida albicans* (Pisa et al., 2016, 2017, Alonso et al., 2017) y bacterias orales y no orales como *T. denticola*, *T. pallidum*, *B. burgdorferi*, (Miklossy et al., 2016), *Chlamydophila pneumoniae* (Balin et al., 1998, 2008) y *Streptococcus aureus* (Singh Rao et al., 2015, Zhan et al., 2016). La infección cerebral crónica por VHS-1 produce neuroinflamación y neurodegeneración no controlada, causada por la acción viral directa y por la inflamación inducida por el virus, lo que conlleva a la disfunción sináptica progresiva, la pérdida neuronal y, en última instancia, a la EA. Tal daño incluye la producción de péptidos de A β mediada por astrocitos, que, inicialmente, parece ser sólo un mecanismo de defensa (Harris et al., 2015, Itzhaki et al., 2016). Parte de la hipótesis neuroinflamatoria es explicada mediante el nuevo concepto de neurobioma, que define a la colonización cerebral por microorganismos como consecuencia de la alteración de la microbiota respiratoria, oral o intestinal, los cuales migrarían hacia el cerebro a través del nervio olfatorio, trigémino o mesentéricos (Mori et al., 2005, Riviere et al., 2002, Foschi et al., 2006, Lee et al.,

2008, Doens and Fernández, 2014, Heneka et al., 2015, Oberstein et al., 2015). La microbiota periodontal posee ciertas bacterias que tienen la capacidad de migrar a otros tejidos, evadir la respuesta inmune e inducir una respuesta pro-inflamatoria y, por lo tanto, podrían migrar y ser detectadas en el cerebro de pacientes afectados o no de EA (Pritchard et al., 2017). Como analogía con las comunidades microbianas periodontales disbióticas que impulsan la enfermedad periodontal, el neurobioma podría reflejar rasgos similares, un ejemplo de ello es *P. gingivalis*, considerada una bacteria clave o *keystone pathogen*, que es capaz de evadir la respuesta inmune e inducir la secreción de IL-2 en células inmunes, la producción de β secretasa y contribuir al deterioro cognitivo (Wu et al., 2016, Olsen et al., 2016).

Algunos estudios han propuesto el posible rol antimicrobiano del péptido de A β , secretado por astrocitos reactivos ante el ingreso de bacterias, virus u hongos al cerebro (Itzhaki et al., 2016, Carter, 2017, Lövheim et al., 2018). Al ingresar estos microorganismos se establece una respuesta potencialmente inflamatoria mediada por microglías, las cuales reconocen polisacáridos capsulares vía TLR4, generando la liberación de mediadores inflamatorios tales como IL-1 β , TNF- α e IL-6, activando astrocitos que responden ante esta inflamación mediante la secreción del péptido de A β (Fulop et al., 2018). El péptido de A β se uniría de forma inespecífica al microorganismo infectante creando una red proteica que lo inmovilizaría y facilitaría su fagocitosis, conformando un complejo constituido por el núcleo central del microorganismo invasor rodeado de A β , que posteriormente puede ser modificado enzimáticamente para transformarse en una estructura proteica sobre la cual los diferentes microorganismos se adherirían y colonizarían. Así, la secreción del péptido de A β tendría un rol antimicrobiano, el cual podría cambiar dependiendo de la virulencia del microorganismo infectante. Por ejemplo, las gingipaínas RgpA y Kgp de *P. gingivalis*, actúan directamente sobre el péptido A β mediante la proteólisis de Arg y Lis respectivamente, generando residuos insolubles de A β , lo que podría constituir una de las causas que genere la formación de placas seniles en el hipocampo posterior a la infección por esta bacteria (Kadowaki et al., 1998, Li et al., 2011).

Recientes investigaciones han evaluado la capacidad de las gingipaínas RgpB y Kgp para inducir la producción y posterior degradación de los péptidos de A β y su efecto en células cerebrales, posterior a la inyección intracerebral de un

homogenizado de *P. gingivalis* (Dominy et al., 2019). En efecto, se detectó un incremento en la producción del péptido de A β y de la proteína Tau fosforilada en los cerebros de los ratones inyectados con homogenizados de *P. gingivalis* y, que la administración oral de inhibidores de gingipaínas, bloquea la neurodegeneración inducida por gingipaínas, disminuye la carga bacteriana de *P. gingivalis* en el cerebro y disminuye significativamente la respuesta del hospedero mediante la producción de A β a la infección cerebral por *P. gingivalis* (Dominy et al., 2019).

En el presente estudio, logramos demostrar que *P. gingivalis* se detecta en la región CA1 del hipocampo, independiente de su patogenicidad. En este sentido, nuestro grupo determinó previamente que aquellas ratas infectadas con los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* presentan neuroinflamación, mayores niveles de marcadores de EA en el hipocampo y deterioro cognitivo, en comparación con las ratas inoculadas con los serotipos K4, la cepa no encapsulada GPA o las ratas *sham* (Díaz-Zúñiga et al., 2020). En el presente estudio, al no detectarse diferencias en los niveles de carga bacteriana, proteína RgpA o genes *rgpA* y *kgp* entre los distintos grupos experimentales, se sugiere que el efecto observado depende de la variable patogenicidad de cada serotipo y no a una mayor concentración de bacteria en el sitio afectado. En efecto, la presencia de las cepas pertenecientes a los serotipos K1 o K2 en la microbiota podría indicar una susceptibilidad microbiológica para desarrollar la periodontitis, que no existiría en aquellas personas colonizadas con las cepas pertenecientes a los otros serotipos o con cepas no encapsuladas (Vernal et al., 2014). Así, resulta importante poder determinar en los pacientes afectados de periodontitis, cuál es el serotipo infectante que poseen de *P. gingivalis*, para poder establecer medidas terapéuticas que busquen re-establecer el equilibrio de la microbiota y evitar o disminuir los riesgos de disbiosis. No obstante, cada serotipo posee una virulencia e inmunogenicidad asociada a salud o enfermedad periodontal, se desconoce cuáles son los mecanismos que le permiten a *P. gingivalis* migrar al cerebro. En este sentido, se propone que la migración podría ser por circulación sanguínea, por terminaciones nerviosas o por circulación linfática (Riviere et al., 2002, Poole & Singhrao., 2016). Actualmente, no existe evidencia que sustente ninguna de estas posibles hipótesis, quedando a criterio de los factores de virulencia de *P. gingivalis* las explicaciones de su capacidad migratoria. Así, los serotipos capsulares K1 o K2 poseen los genes para fimbria más extensa y

secretan una mayor concentración de gingipaínas, lo que les permite degradar moléculas de matriz extracelular, madurar la fimbria y anclarse a las estructuras de matriz para poder adherirse y movilizarse por las células o los tejidos del hospedero (Enersen et al., 2013, Hall et al., 2018, Aduse-Opoku et al., 2006, Laine et al., 1998, Chen et al., 2017, O'Brien-Simpson et al., 2001, Reife et al., 2006). Además, la presencia de proteínas no fimbriales les permiten formar *clusters* bacterianos (Ito et al., 2010, Jia et al., 2019), la capacidad fibrinolítica les otorga una capacidad para formar mallas de fibrina que utilizan como medio de transporte en la circulación periférica y su metabolismo asacarolítico les permite migrar a fuentes de proteínas para su metabolismo (Imamura et al., 2000, Potempa et al., 1998, Imamura et al., 2003). En conjunto, los serotipos más inmunogénicos poseen los factores de virulencia más virulentos y de esta manera, son capaces de inducir mayor daño en el hospedero. Sin embargo, aún queda por resolver cuál es el factor de virulencia más importante para la migración y cuál es la vía por la cual, desde los tejidos periodontales podrían migrar a los tejidos cerebrales.

La evidencia en conjunto con nuestros datos nos permite sugerir que la presencia de los serotipos patogénicos de *P. gingivalis* podrían constituir un riesgo no solo de periodontitis, sino que también de EA (Díaz-Zúñiga et al., 2020, Liu et al., 2017, Wu et al., 2017, Ishida et al., 2017, Dominy et al., 2019). De comprobarse esta susceptibilidad deberían implementarse nuevas medidas de salud pública, que aseguren el tratamiento y mayor control de enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad periodontal, desde una edad temprana para disminuir la incidencia de EA u otro tipo de demencia en la población. Sin embargo, son necesarios más estudios para lograr demostrar el riesgo de infección de cada serotipo de *P. gingivalis* y entender los mecanismos por los cuales este riesgo diferenciado ocurriría a pesar de que todos sean capaces de migrar al cerebro.

9. CONCLUSIONES

1. En muestras de suero, LCE e hipocampo de las ratas inoculadas con los serotipos K1, K2, K4 y la cepa no encapsulada GPA, se detectó la presencia de la gingipaína RgpA.
2. En muestras de suero, LCE, hipocampo y corteza cerebral de las ratas inoculadas con los serotipos K1, K2, K4 y la cepa no encapsulada GPA se detectó la presencia *P. gingivalis* a distintas UFC/mL y, en hipocampo y corteza se detectaron los genes *rgpA* y *kgp*.
3. En la región CA1 de los hipocampos de las ratas inoculadas con los serotipos K1, K2, K4 y la cepa no encapsulada GPA se identificó la presencia de la gingipaína RgpA de *P. gingivalis*.
4. Luego de 55 días de la inoculación de los distintos serotipos de *P. gingivalis*, todas las cepas pudieron ser detectadas, mediante distintas técnicas moleculares, en los tejidos extra-orales.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbayya, K., Puthanakar, N. Y., Naduwinmani, S., & Chidambar, Y. S. (2015). Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North American journal of medical sciences*, 7(6), 241–246.
- Abusleme, L, Blanc, V, Léon, R, Gamonal, J, & Silva, N. (2012). Genotyping of rgpA and kgp genes encoding *Pophyromonas gingivalis* gingipains. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 5(3), 135-138.
- Abusleme L., Dupuy A. K., Dutzan N., et al. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*; 7(5):1016–1025.
- Aduse-Opoku, J., Slaney, J. M., Hashim, A., Gallagher, A., Gallagher, R. P., Rangarajan, M., Boutaga, K., Laine, M. L., van Winkelhoff, A. J. & Curtis, M. A. (2006) Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Pophyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 74, 449-460.
- Aragon, F., Zea-Sevilla, M. A., Montero, J., Sancho, P., Corral, R., Tejedor, C., Albaladejo, A. (2019). Oral health in Alzheimer's disease: a multicenter case-control study. *Clinical Oral Investigations*. 2018 Dec;22(9):3061-3070.
- Armitage, G. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*.
- Atieh, M. A. (2008). Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: A meta-analysis. *The Journal of Periodontology*, 79(9), 1620–1629.
- Bagavad Gita, J., George, A. V., Pavithra, N., Chandrasekaran, S. C., Latchumanadhas, K. & Gnanamani, A. (2019) Dysregulation of miR-146a by periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome. *Journal of Periodontology*.
- Beikler T, Peters U, Prior K, Eijmke B, Flemmig TF (2005). Sequence variations in rgpA and rgpB of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*; 40(3): 193-198.
- Block, M. L. and J. S. Hong (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology* 76(2): 77-98.

Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 191–199.

Chapple IL, Genco R; Working group 2 of joint EFP/AAP workshop. (2013). Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 40 Suppl 14:S106-12.

Costa, A. S., Agostini, S., Guerini, F. R., Mancuso, R., Zanzottera, M., Ripamonti, E., et al. (2017). Modulation of immune responses to herpes simplex virus type 1 by IFNL3 and IRF7 polymorphisms: a study in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 60, 1055–1063.

Chen, T., Siddiqui, H. & Olsen, I. (2017) In silico comparison of 19 *Porphyromonas gingivalis* strains in genomics, phylogenetics, phylogenomics and functional genomics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00028.

Cochran DL. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology*; 79(Suppl. 8):1569-76.

Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., Ciuchi, P., Garcia, M., Arias, J., Sanz, M. & Vernal, R. (2015) Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *Journal of Periodontology* 86, 108-119.

Díaz-Zúñiga J, Muñoz Y, Melgar-Rodríguez S, More J, Bruna B, Lobos P, Monasterio G, Vernal R, Paula-Lima A. (2019) Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Triggers Pro-Inflammatory Responses and Amyloid Beta Secretion in Hippocampal Cells: A Novel Link Between Periodontitis and Alzheimer's Disease? *Journal of Oral Microbiology*. 11(1):1586423.

Díaz-Zúñiga J, More J, Melgar-Rodríguez S, Jiménez M, Villalobos F, Monasterio G, Valdés JL, Vernal R, Paula-Lima A. (2020) Alzheimer's disease-like features triggered by oral *Porphyromonas gingivalis* infection depends on the bacterial serotype.

Dominy SS., Lynch C., Ermini F., Benedyk M., Marczyk A., Konradi A., Nguyen M., Haditsch U., Raha D., Griffin C., Holsinger LJ., Arastu-Kapur S., Kaba S., Lee A., Ryder MI., Potempa B., Mydel P., Hellvard A., Adamowicz K., Hasturk H., Walker GD., Reynolds EC., Faull RLM., Curtis MA., Dragunow M., Potempa J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's

- disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*; 5(1):eaau3333.
- Dorn BR, Dunn WA, Progulske-Fox A. (1999) Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun*; 67(11):5792-5798.
- Enersen, M., Nakano, K., & Amano, A. (2013). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of oral microbiology*, 5, 10.3402/jom.v5i0.20265
- Fang, Y., et al. (2016). The blockage of the Nogo/NgR signal pathway in microglia alleviates the formation of A β plaques and tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation* 13(1): 56.
- Figuro E., Lindahl C., Marín MJ., Renvert S., Herrera D, Ohlsson O., et al. (2014). Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *Journal of Periodontology*; 85:1182-93.
- Fulop, T., Witkowski, J. M., Bourgade, K., Khalil, A., Zerif, E., Larbi, A., ... Frost, E. H. (2018). Can an Infection Hypothesis Explain the Beta Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease?. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 224.
- Garlet, G. P. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research* 89, 1349-1363.
- Glass, C. K., et al. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140: 918-934.
- Gurav, Abhijit N. (2014). Alzheimer's disease and periodontitis – an elusive link. *Revista da Associação Médica Brasileira*; 60(2):173-180.
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725.
- Hajishengallis G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*, 35(1), 3–11.
- Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(1), 30–44.

- Hall, M., Hasegawa, Y., Yoshimura, F., & Persson, K. (2018). Structural and functional characterization of shaft, anchor, and tip proteins of the Mfa1 fimbria from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific reports*, 8(1), 1793.
- Harris, S. A., and Harris, E. A. (2017). Herpes simplex virus type I and other pathogens are key causative factors in sporadic Alzheimer's disease. *Handbook of Infection and Alzheimer's Disease*, ed. J. Miklossy (Amsterdam: IOS Press), 241–278.
- Heneka, M. T., et al. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*. 14(7): 463-477.
- Heneka, M. T., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*. 14(4): 388-405.
- Heppner, F. L., et al. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 16(6): 358-372.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al. (2009) Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73: 768–774.
- Ide, M., Harris, M., Stevens, A., Sussams, R., Hopkins, V., Culliford, D. Holmes, C. (2016). Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PloS one*, 11(3), e0151081.
- Imamura, T., Potempa, J., Tanase, S., & Travis, J. (1997). Activation of Blood Coagulation Factor X by Arginine-specific Cysteine Proteinases (Gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 16062–16067.
- Imamura, T., Potempa, J., & Travis, J. (2000). Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial pathogenesis*, 29(3), 155–163.
- Imamura, T. (2003) The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology* 74, 111-118.
- Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y., Hagiwara, M., Ferdous, T., Absullah, M., Mitani, A., Michikawa, M. & Matsishita, K. (2017) Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease* 6.
- Ito, R., Ishihara, K., Shoji, M., Nakayama, K., and Okuda, K. (2010). Hemagglutinin/adhesin domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 60, 251–260.

- Itzhaki, R. F., Lathe, R., Balin, B. J., Ball, M. J., Bearer, E. L., Braak, H., Whittum-Hudson, J. A. (2016). Microbes and Alzheimer's Disease. *In Handbook of Infection and Alzheimer's Disease* (Vol. 5, pp. 3-8). *Advances in Alzheimer's Disease; Vol. 5. IOS Press.*
- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9.
- Kadowaki, T., Nakayama, F., Yoshimura, F., Okamoto, N. A., & Yamamoto, K. (1998). Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 29072-29076.
- Kamer, A., Craig, R., Dasanayake, A., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L., & de Leon, M. J. (2008). Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's and Dementia*, 4(4), 242-250.
- Laine ML., Appelmelk BJ., Van Winkelhoff AJ. (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 31(4): 278-284.
- Laine, M. L. & van Winkelhoff, A. J. (1998) Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology* 13, 322-325.
- Liu, L. & Duff, K. (2008) A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *Journal of Visualized Experiments* 21, e960.
- Loeffelholz MJ, Tang YW. (2020). Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections — the state of the art. *Emerg Microbes Infect* 9:747-756.
- López, N., Silva, I. D., Ipinza, J. & Gutierrez, J. (2005) Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight women with pregnancy-associated gingivitis. *Journal of Periodontology* 76, 2144-2153.
- López, N., Smith, P. & Gutierrez, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* 73, 911-924.
- Lövheim, H., Olsson, J., Weidung, B., Johansson, A., Eriksson, S., Hallmans, G., et al. (2018). Interaction between cytomegalovirus and herpes simplex virus type 1 associated with the risk of Alzheimer's disease development. *Journal of Alzheimer's Disease*. 61, 939–945.

- Mahat, M. Y. A., Ahamed, F. A., Chandrasekaran, S., Rajagopal, S., Narayanan, S. & Surendran, N. (2012) "An improved method of transcutaneous cisterna magna puncture for cerebrospinal fluid sampling in rats". *Journal of Neuroscience Methods* 211, 272-279.
- Marín, J., Ambrosio, M., O'Connor, N., Herrera, A., Sanz, D. & Figuero, E. (2019). Validation of a multiplex qPCR assay for detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque samples. A comparison with anaerobic culture. *Archives of Oral Biology*.
- Martande, S. S., Pradeep, A. R., Singh, S. P., Kumari, M., Suke, D. K., Raju, A. Chatterji, A. (2014). Periodontal Health Condition in Patients With Alzheimer's Disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 29(6), 498–502.
- Miklossy J., Kis A., Radenovic A., Miller L., Forro L., Martins R. (2006) Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiology of Aging*. 27:228-36.
- Miklossy, J. Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. (2011) *Journal of Neuroinflammation* 8:90.
- Miklossy, J. (2016). Bacterial amyloid and DNA are important constituents of senile plaques: further evidence of the spirochetal and biofilm nature of senile plaques. *Journal of Alzheimer's Disease*. 53, 1459–1473.
- Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, A., Hernández, M., Bravo, D., & Vernal, R. (2019). Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *Journal of periodontology*, 90(5), 522–534.
- Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y. (2005). Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of Neurovirology*; 11:129–137.
- Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., & Silva, A. (2003). Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 38(5), 518–524.
- Nirogi, R., Kandikere, V., Mundigonda, K., Bhyrapuneni, G., Muddana, N., Saralaya, R. & Benade, V. (2009) A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 178, 116-119.

- O'Brien-Simpson, N. M., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Slakeski, N., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. (2001). Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model. *Infection and immunity*, 69(12), 7527–7534.
- Olsen, I., Taubman, M. A., and Singhrao, S. K. (2016). *Porphyromonas gingivalis* Suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Journal of Oral Microbiology*. 8:33029.
- Pizzo G., La Cara M., Conti Nibali M., Guiglia R. (2005). Periodontitis and preterm delivery. A review of the literature. *Minerva Stomatologica*; 54:1–14.
- Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavazlu, L., Curtis, M. A., and Crean, S. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term post-mortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease*. 36, 665–677.
- Poltorak A, He X, Smirnova I et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/ HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science*; 282: 2085-2088.
- Potempa, J., Mikolajczyk-Pawlinska, J., Brassell, D., Nelson, D., Thøgersen, I. B., Enghild, J. J., & Travis, J. (1998). Comparative properties of two cysteine proteinases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), 21648–21657.
- Pritchard AB, Crean S, Olsen I and Singhrao SK (2017) Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neuroscience*. 9:336.
- Riviere, G.R., Riviere, K., and Smith, K. (2002). Molecular and immunological evidence of oral Treponema in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiology and Immunology*. 17, 113–118.
- Reife, R., Coats, S., Al-Qutub, M., Dixon, D., Braham, P., Billharz, R., Howald, W. & Darveau, R. (2006). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cellular microbiology*, 8(5), 857–868.
- Rojas L, Melgar-Rodríguez S, Díaz-Zúñiga J, Alvarez C, Monasterio G, Rojas C, Carvajal P, Vernal R. (2018) Serotype a of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* down-regulates the increased serotype b-induced cytokine and chemokine production in dendritic cells. *Archives in Oral Biology*; 93: 155-162.
- Schenkein HA. (2006) Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000*, Vol. 40, 77–93.

- Selkoe, D. J. & Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* 8, 595-608.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144.
- Socransky, S., & Haffajee, A. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, 28(1), 12-55.
- Srinivas, SK., Sammel, MD., Stamilio, DM., Clothier, B., Jeffcoat, MK., Parry, S., (2009) Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: is there an association? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*; 200:497 e491–98.
- Stathopoulou, P. G., Galicia, J. C., Benakanakere, M. R., Garcia, C. A., Potempa, J., & Kinane, D. F. (2009). *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiology*, 9(1).
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Aragno, M., Borghi, R., Autelli, R., Giliberto, L., et al. (2008). Oxidative stress activates a positive feedback between the γ - and β -secretase cleavages of the β -amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry*. 104, 683–695.
- Teixeira SRL., Mattarazo F., Ferez M., Figueredo LC., Favari M., Simionato MRL., Mayer MPA. (2009). Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*; 26: 482-487.
- Thanakun, S. & Izumi, Y. (2016) Effect of Periodontitis on Adiponectin, C-Reactive Protein, and Immunoglobulin G Against *Porphyromonas gingivalis* in Thai People With Overweight or Obese Status. *Journal of Periodontology* 87, 566-576.
- Tomas, A. C., Andrade, C. A., Diaz, A. B. F., Abad, M. M., Shaheen, I., Farfan, L. C., ... Herrero, C. C. (2017). 70-gene signature, an encouraging prognostic tool to guide adjuvant therapy in early breast cancer. *Annals of Oncology*, 28.
- Trombone, A. P., Ferreira, S. B. J., Raimundo, F. M., de Moura, K. C., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S., Campanelli, A. P., de Franco, M. & Garlet, G. P. (2009) Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *Journal of Periodontal Research* 44, 443-451.

- Tse, K.-H., & Herrup, K. (2017). Re-imagining Alzheimer's disease - the diminishing importance of amyloid and a glimpse of what lies ahead. *Journal of Neurochemistry*, 143(4), 432–444.
- Udagawa, S., Katagiri, S., Maekawa, S., Takeuchi, Y., Komazaki, R., Ohtsu, A., Sasaki, N., Shiba, T., Watanabe, K., Ishihara, K., Sato, N., Miyasaka, N. & Izumi, Y. (2018) Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. *Acta Odontologica Scandinavica* 76, 433-441.
- Van Winkelhoff AJ., Laine ML. (1998) Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*; 13(5): 322-325.
- Vernal T, León R, Herrera D, García-Sanz JA, Silva A, Sanz M. (2008) Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research*; 43: 689-697.
- Vernal R., León R., Silva, A., Van Winkelhoff, A., Garcia-Sanz, J., & Sanz, M. (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal Of Clinical Periodontology*, 36(10), 823-829.
- Vernal, R., Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Pujol, M., Diaz-Guerra, E., & Silva, A. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(5), 451-459.
- Westphal, J. F., Nonnenmacher, C., & Jehl, F. (2005). Quality of antibiotic utilization for pneumonia in mental healthcare setting: Assessment through a computerized surveillance program in a university-affiliated psychiatric hospital. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 77(2) P71-P71.
- Winkelhoff, A., Appelmelk, B., Kippuw, N., & Graaff, J. (1993). K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiology and Immunology*, 8(5), 259-265.
- Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F., Collcutt, A., Ibbett, P. & Nakanishi, H. (2017) Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain, Behaviour, and Immunity* 65, 350-361.

Yoshino T., Laine M., van Winkelhoff AJ., Dahlén G. (2007) Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses. *FEMS Microbiol Lett*; 270: 75-81.

11. ANEXOS

Anexo N°1: Certificado Comité Institucional de Cuidado y uso de Animales de la Universidad de Chile



Santiago, a 16 de noviembre de 2017

Certificado n°: 17085-ODO-UCH

CERTIFICADO

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

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

Se otorga la presente certificación para el uso de 42 ratas *Rattus norvegicus* (cepa *Sprague-Dawley*), provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde marzo de 2017 hasta marzo de 2019 tiempo estimado de ejecución del proyecto, el cual será financiado con por los siguientes proyectos **RDP-IADR 2017-2019, Fondecyt 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: Certificado Comité institucional de Bioseguridad, Administración conjunta Campus Norte, Universidad de Chile



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°102

Santiago, 10 de Mayo de 2017.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH 2016 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 Odontología Conservadora.

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* (ambas de NBS-2),
- Líneas celulares primarias de animales: neuronas de hipocampo de Sprague Dawley.
- Muestras Biológicas de Sprague Dawley: Líquido Cefalorraquídeo, Sangre, Tejido Animal, Biopsia Animal.
- Compuestos Químicos de tipo irritantes, inflamables, tóxicos y que producen vapores tóxicos.
- Instrumento que utiliza Rayos X.

Los ensayos se realizarán en el Laboratorio de Biología Periodontal y Laboratorio de Biología Celular y 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, inyecciones palatinas, extracción de cerebros de los embriones, infecciones periodontales y eutanasia se realizarán en la Estación Experimental dirigida por el Dr. José Luis Valdés, la cual está ubicada en Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Por lo tanto, la bioseguridad y ética animal respecto a los ensayos mencionados anteriormente son competencia de los Comités pertenecientes a dicha Facultad.

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

Anexo N°3: Partidores específicos utilizados para detección por qPCR

Partidores basados en estudio:

Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, A., Hernández, M., Bravo, D., & Vernal, R. (2019). Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *Journal of periodontology*, 90(5), 522–534 (16S).

Abusleme, L, Blanc, V, León, R, Gamonal, J, & Silva, N. (2012). Genotipificación de los genes *rgpA* y *kgp* que codifican para las gingipaínas de *Porphyromonas gingivalis*. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 5(3), 135-138 (*rgpA* y *kgp*)

| Molécula | Partidor <i>Forward</i> | Partidor <i>Reverse</i> |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 16S | 5'gcgctcaacggtcagcc3' | 5'cacgaattccgcctgc3' |
| <i>rgpA</i> | 5'agtgagcgaaacttcggagc3' | 5'ggtatcactgggtataaacctgtcc3' |
| <i>kgp</i> | 5'gaactgacgaacatcattg3' | 5'gctggcattagcaacacctg3' |