



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

**“ASOCIACIÓN MICROBIOLÓGICA ENTRE LA PERIODONTITIS Y LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA”**

**Valeria Parra Torres**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Jaime Díaz Zuñiga**

**TUTORES ASOCIADOS**

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

**ASESOR**

**Emilio A. Cafferata Chea**

**Adscrito a Proyecto FIOUCh C19-0  
Santiago - Chile  
2020**

## ***Agradecimientos***

En primer lugar quiero agradecer a Dios por estar presente en mi vida y permitirme finalizar esta etapa tan importante, se que si no fuera por su ayuda no habría sido posible alcanzar este logro. De la misma manera quiero agradecer a mi familia, principalmente a mis padres por darme su apoyo incondicional constantemente, siempre recordaré todo su esfuerzo y el amor que me han entregado a lo largo de todos los años de mi vida. En mi memoria y en mi corazón guardaré cada vez que dejaron de lado cosas personales que necesitaban poniéndome en primer lugar dentro de sus prioridades, cada vez que se levantaron temprano y se acostaron tarde solo para darme apoyo y ayudarme a seguir adelante. Gracias por sus consejos, sus valores y su infinito amor.

A pesar de la distancia, el apoyo de mis abuelitos, tíos y primos estuvo siempre presente. Gracias por pensar en mi y enviarme muestras de amor y apoyo desde el sur de Chile, por medio de mensajes de texto, llamadas o videollamadas, que es lo que está de moda ahora. Gracias por la linda familia que hemos construido en base al amor y la unidad. Debo mencionar que para mi es una alegría inmensa poder tener a mis abuelitos ya avanzados en edad, y quisiera agradecerles de manera especial todo el cariño que me han entregado desde muy niña y dedicarles el logro de este sueño, se que deben estar muy felices y eso para mi ya es uno de los mejores regalos que Dios me ha podido dar.

También quisiera dejar un agradecimiento a todas aquellas personas, amigos, vecinos y hermanos de la iglesia, que aún sin ser mis familiares se preocuparon por mi y siempre desearon mi bien, mostrándome su cariño y apoyo de diferentes maneras, ya sea con palabras de ánimo, con su oración, con presentes o con su ayuda al momento de necesitar pacientes, para mi cada una de esas acciones fueron muy valiosas.

En la universidad tuve la oportunidad de conocer gente hermosa, dentro de las cuales se encuentran mis mejores amigas y compañeras, Mile, Sofi y Clau. Agradezco a Dios haberlas puesto en mi camino y tenerlas como mis amigas. Desde los primeros días de universidad hasta la actualidad nos hemos acompañado y apoyado. Recordaré todas esas noches de estudio y tardes enteras que pasábamos

entendiendo y riendo, dándonos ánimo para no rendirnos, a pesar de que a veces nos quería ganar el sueño o el desánimo quería quitarnos las esperanzas, pero siempre había una de nosotras que levantaba a las demás. Gracias por darme lindos recuerdos.

Otras personas hermosas pude conocer en el Grupo Bíblico Universitario. El amor y compañerismo de cada uno de ustedes siempre lo agradeceré. Compartir del amor de Dios y apoyarnos mutuamente fue importante en mi vida universitaria. Recordaré cada oración y cada palabra de ánimo que recibí de parte de ustedes, espero que Dios los bendiga grandemente y cumplan todas sus metas y sueños, siempre guardando su corazón para Dios, los amo mucho en el amor del Señor.

También en la universidad tuve la oportunidad de conocer grandes docentes que más allá de su profesionalismo y de sus conocimientos o títulos, destacaron por su trato humano y su compromiso hacia los alumnos. Podría mencionar muchos nombres, pero quisiera destacar algunos docentes que tuve mayor ocasión de conocer, Dra. Isabel Mardones, Dra. Marta Gajardo, Dr. Cristián Covarrubias, Dr. Nicolás Amestica, Dr. Walter Díaz, Dr. Miguel Fernández, Dra. Claudia Lefimil y mi tutor de tesis Dr. Jaime Díaz. Como alumna agradezco sinceramente su apoyo y compromiso como docentes, que me ha permitido formarme profesionalmente y humanamente.

Continuando con los agradecimientos no puedo olvidar a los funcionarios de la universidad, muchas gracias por todo su cariño hacia los alumnos, gracias por cada buenos días, por cada sonrisa y por cada palabra de “tú puedes”, sin duda alguna cada muestra de cariño significo para mi una “inyección” de esperanza, de fuerza y de energía en momentos que realmente lo necesitaba.

Antes de finalizar también quiero agradecer a todos los docentes que fueron parte de esta investigación (adscrita al Proyecto FIOUCh C19-0), a la Dra. Andrea Paula-Lima, la Dra. Samanta Melgar Rodríguez, el Dr. Emilio Cafferata Chea y principalmente al tutor principal el Dr. Jaime Díaz Zúñiga. Adicionalmente agradezco la colaboración de mi compañero Benjamin Sanhueza, que participó en la búsqueda y revisión de los artículos. Gracias Benja por tu compañerismo y buena disposición, se que serás un gran profesional.

Finalmente, puedo decir que el camino a lo largo de la carrera ha sido difícil, pero hermoso. Me llena de alegría poder finalizar una etapa de mi vida y comenzar

una nueva. Espero poder ser un aporte en esta sociedad, que vaya más allá de solo velar por mantener o devolver la salud oral de las personas. Pongo en las manos de Dios mi vida y mi futuro, porque se que con él todo es posible y mi vida está completa con su presencia.

Muchas gracias de corazón!!!

## ÍNDICE

1. RESUMEN	
2. MARCO TEÓRICO	1
2.1 Microbiota	1
2.2 Disbiosis de la microbiota subgingival y periodontitis	3
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	6
4. OBJETIVO GENERAL.	6
5. METODOLOGÍA.	7
5.1. Criterios de elegibilidad: inclusión y exclusión	7
5.2. Estrategia de búsqueda	8
5.3 Selección de estudios	8
5.4 Extracción de datos	9
5.5. Análisis de los datos	9
6. RESULTADOS	11
6.1 Detección de bacterias orales	12
6.2 Detección de bacterias en modelos experimentales de periodontitis	18
6.3 Detección de bacterias orales en tejido cerebral humano	21
6.4 Concordancia entre revisores	22
6.5 Análisis del riesgo de sesgo de los estudios	22
7. DISCUSIÓN	28
7.1. Posible rol de las bacterias orales detectadas en el cerebro.	28
7.2. Vías de migración bacterianas.	34
7.3. Neurobioma: colonización transitoria o persistente.	40
7.4. Heterogeneidad de los estudios.	43
7.5. Análisis del riesgo de sesgo	45
8. CONCLUSIONES	47
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible causada por la disbiosis de la microbiota subgingival. Las bacterias que causan la disbiosis pueden difundir a la circulación sanguínea periférica y colonizar otros tejidos u órganos y favorecer el inicio o progreso de otras patologías, tal como la Enfermedad de Alzheimer (EA). Las bacterias orales podrían colonizar el cerebro de forma permanente o transitoria e inducir una respuesta inmune. En esta revisión analizamos la teoría infecciosa de la neuroinflamación y el rol de las bacterias orales en la susceptibilidad microbiológica para desarrollar la EA.

**Metodología:** La investigación se realizó siguiendo las pautas dictadas por la guía PRISMA-P. Se seleccionaron estudios basados en modelos experimentales de periodontitis o infecciones orales y estudios descriptivos de pacientes con EA, que tenían por finalidad la detección de bacterias orales a nivel cerebral o la evaluación de su rol en la EA. Se incluyeron artículos de los últimos 20 años, en idioma inglés o castellano. La búsqueda se realizó en la base de datos Pubmed, Latindex, SciELO y Cochrane Library (CENTRAL) utilizando términos MeSh. Los estudios fueron revisados por dos revisores independientes y un tercer revisor tomó la decisión final en situaciones dudosas. Finalmente, por medio de las herramientas Newcastle-Ottawa y SYRCLE se evaluó el riesgo de sesgo.

**Resultados:** Se encontraron 2405 artículos de los cuales se seleccionaron 23 según los criterios de inclusión y exclusión, presentando un riesgo de sesgo moderado. La infección con patógenos periodontales en animales se relacionó con el desarrollo de características neuropatologías de la EA. En pacientes con EA, se detectaron bacterias orales en el líquido cerebro-espinal, fluido crevicular gingival, plasma, suero y tejido cerebral, y niveles aumentados de anticuerpos contra periodontopatógenos o citoquinas pro-inflamatorias.

**Conclusiones:** Existe un posible vínculo entre el desarrollo o progreso de la EA y las bacterias orales. La presencia de bacterias en el cerebro se relaciona con las características patológicas de la EA, lo que podría sugerir la existencia de un eje oral-cerebral. Así, las enfermedades orales podrían relacionarse con neuroinflamación mediante este eje.

## 2. MARCO TEÓRICO

El microbioma humano está compuesto por una amplia variedad de bacterias que se distribuyen en todas las superficies del hospedero. El microbioma cumple un rol importante en nuestro desarrollo, fisiología, inmunidad y nutrición (Morales y cols, 2010; La Rosa Hernández y cols, 2014; Alarcón y cols, 2016). Recientemente, se ha propuesto que gran parte de las enfermedades crónicas no transmisibles tendrían su origen en el microbioma de hospederos susceptibles. Así, la composición del microbioma podría predisponer o favorecer el desarrollo y progresión de ciertas enfermedades (Kho y Lal, 2018).

### 2.1 Microbiota

El microbioma humano se divide en distintas microbiotas, las que se consideran como el conjunto de microorganismos que residen en un tejido o superficie especializada. De esta manera, reconocemos principalmente la microbiota intestinal, respiratoria y oral, las cuales contienen tanto bacterias protectoras como potencialmente dañinas para el hospedero, denominadas patobiontes. El equilibrio homeostático de la microbiota es beneficioso para el hospedero; sin embargo, cualquier cambio en el medio podría modificar la expresión de factores de virulencia de algunas bacterias generando la disbiosis, definida como un desbalance del equilibrio microbiano de la microbiota normal (Petersen y Round, 2014). Las bacterias con la capacidad para inducir la disbiosis se conocen como bacterias clave o *keystone pathogens* (Hajishengallis, 2014; Hajishengallis, 2015). Para ejercer su patogenicidad estas bacterias necesitan de condiciones ambientales que favorezcan la sinergia microbiana, como ocurre en la periodontitis, donde se observa la contribución de varias bacterias Gram-negativas a la progresión de la enfermedad (Hajishengallis y Lamont, 2012). En términos generales, la disbiosis ocurre por la disminución de la diversidad bacteriana, que genera la pérdida de microorganismos beneficiosos, el incremento de bacterias clave o una combinación de ambos eventos (Petersen y Round, 2014; DeGruttola y cols, 2016).

La disbiosis de la microbiota intestinal se produce por una modificación de la composición bacteriana, la cual se encuentra bajo la influencia de factores tales

como la dieta, los fármacos ingeridos o el sistema inmune. Las variaciones en la microbiota intestinal se consideran naturales, siempre y cuando no disminuya la diversidad bacteriana e incrementa el riesgo de disbiosis (Carding y cols, 2015). La disbiosis se considera como la principal causa de un conjunto de enfermedades inflamatorias intestinales, tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y las sensibilidades o intolerancias alimentarias (Ohkusa y cols, 2002; Neut y cols, 2002; Collado y cols, 2008). En pacientes afectados de enfermedades inflamatorias intestinales se analizó la microbiota intestinal utilizando técnicas convencionales de cultivo y aislamiento bacteriano en muestras de heces o mucosas, demostrando que existe un incremento en las concentraciones de las bacterias anaerobias, específicamente del grupo *Bacteroides spp* y *Enterobacteriaceae spp* (Ohkusa y cols, 2002; Neut y cols, 2002). Además, pacientes con enfermedad de Crohn presentan una disminución de bacterias simbióticas, como las especies de *Bifidobacterium spp* y *B. longum* (Collado y cols, 2008). En términos generales, existe un conjunto de patologías intestinales donde el re-establecimiento del equilibrio homeostático mejoraría la captación de alimentos y, en algunos casos, la evolución favorable de la enfermedad (Wilhelm y cols, 2008; Carding y cols, 2015).

La disbiosis de la microbiota respiratoria se debe a la adquisición de bacterias o virus, factores ambientales o alteraciones inmunológicas que pueden potencialmente alterar el equilibrio homeostático, lo que lleva al crecimiento excesivo y la diseminación de patógenos (Bogaert y cols, 2011). Esto resulta en el desarrollo de enfermedades tales como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la neumonía típica y atípica, entre otras (Hilty y cols, 2010; Huong y cols, 2014; De Steenhuijsen Piters y cols, 2016; Wagner y cols, 2018). En estas enfermedades, al evaluar la microbiota de nariz, orofaringe, aspirados bronquiales o muestras de lavados broncoalveolares de las vías aéreas inferiores se reveló que las especies de *Haemophilus spp*, *Streptococcus pneumoniae*, *Rothia spp*, *Lactobacillus spp*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* están presentes con mayor frecuencia (Hilty y cols, 2010; Huong y cols, 2014; De Steenhuijsen Piters y cols, 2016; Wagner y cols, 2018). Además, una microbiota nasal con diversidad reducida de especies, especialmente cuando se

acompaña de la presencia de *Moraxella spp*, se asocia con una mayor prevalencia de asma (Depner y cols, 2017).

De igual manera como ocurre en las microbiotas intestinal y respiratoria, la disbiosis de la microbiota oral puede desarrollarse por factores propios del hospedero, factores genéticos o ambientales, tales como el consumo de medicamentos, higiene oral, estrés, alimentación, entre otros (Hajishengallis y Lamont, 2012). A medida que se desarrolla una comunidad, el metabolismo microbiano y los mediadores de la respuesta inmune del hospedero pueden causar cambios en el medio local que facilitan el crecimiento o la virulencia de microorganismos asociados con un estado disbiótico, lo que favorece el desarrollo de enfermedades prevalentes como la caries y la periodontitis. Entre las bacterias que se asocian con estas enfermedades se identifican *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Filifactor alocis* (Herrera y cols, 2008; Abusleme y cols, 2013; Silva y cols, 2015; Espinoza y cols, 2018; Eriksson y cols, 2018).

## **2.2 Disbiosis de la microbiota subgingival y periodontitis**

La disbiosis de la microbiota subgingival es originada por una serie de patógenos clave o patobiontes que residen permanentemente en la microbiota (Hajishengallis, 2014; Hajishengallis, 2015). Entre estas bacterias se describen *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y *F. alocis*. Distintos estudios demuestran la virulencia, inmunogenicidad y patogenicidad tanto de *A. actinomycetemcomitans* como de *P. gingivalis*, evidenciando que existen serotipos asociados a enfermedad y a salud (Vernal y cols, 2009; Díaz-Zúñiga y cols, 2014). En efecto, las bacterias más virulentas son capaces de desencadenar una respuesta pro-inflamatoria y resorción ósea mediante la activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> colaboradores (del inglés *T helper*) Th1, Th17 y Th22. En particular, los linfocitos Th17 expresan el ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL) el cual participa directamente en los procesos de estimulación de la diferenciación osteoclástica y en la activación de osteoclastos maduros (Vernal y cols, 2009; Vernal y cols, 2014; Díaz-Zúñiga y cols, 2017; Melgar-Rodriguez y cols,

2016; Monasterio y cols, 2018a; Monasterio y cols, 2018b). La presencia de mediadores inflamatorios y de anticuerpos anti-patógenos orales se asocia también con otras condiciones o patologías, tales como alteraciones en el control metabólico en pacientes con diabetes mellitus, riesgo de parto prematuro con bajo peso al nacer y, recientemente, con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Marakoglu y cols, 2008; Ide y cols, 2016).

Distintos estudios evaluaron muestras de cerebro de pacientes fallecidos y afectados de EA, detectando bacterias en distintos tejidos dentro del cerebro (Riviere y cols, 2002; Hammond y cols, 2010; Poole y cols, 2013; Zhan y cols, 2016). Entre las bacterias detectadas, *P. gingivalis* y *T. denticola* se identificaron en la corteza cerebral, hipocampo, ganglio trigeminal, líquido cerebro-espinal (LCE) y IV ventrículo (Riviere y cols, 2002; Poole y cols, 2013). En ese contexto, existe una hipótesis que sugiere el origen infeccioso del proceso neuroinflamatorio. Diversos estudios han descrito que los pacientes afectados de EA tienen condiciones de susceptibilidad para desarrollar enfermedades del tipo respiratorias o intestinales y que bacterias clave que desencadenan la disbiosis también pueden detectarse en el cerebro (Hammond y cols, 2010; Zhan y cols, 2016). Más aún, la teoría infecciosa sugiere que los patógenos involucrados en enfermedades respiratorias e intestinales, migrarían al cerebro, potenciando la respuesta inmune inflamatoria crónica, acelerando la neurodegeneración y la progresión de la EA (Hammond y cols, 2010; Zhan y cols, 2016). Hay estudios que demuestran cómo algunos factores de virulencia de *E. coli*, *C. pneumoniae* y *B. burgdorferi* son más abundantes en cerebros de pacientes que fallecieron con EA, localizándose en placas amiloides, alrededor de vasos sanguíneos, corteza frontal, temporal y entorrinal y el hipocampo (Hammond y cols, 2010; Zhan y cols, 2016). Además, algunos estudios en células cerebrales estimuladas con bacterias orales demuestran un incremento en los niveles de producción de mediadores pro-inflamatorios, expresión de genes de oxidación y de la proteína precursora amiloide (APP), de secreción de péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y niveles de la proteína Tau fosforilada (Miklossy y cols, 2006; Díaz-Zúñiga y cols, 2019). A pesar que algunas bacterias intestinales, respiratorias u orales se detectan en el cerebro de personas afectadas de EA, aún no se define cuál es la vía de migración. En este contexto, proponemos que existen 3 posibles

vías: por migración neural retrógrada, por migración mediante circulación sanguínea periférica o circulación linfática, siendo más probable la vía nerviosa.

En términos generales, se puede especular que la microbiota oral también podría estar vinculada con la EA y que las bacterias que desencadenan la disbiosis a nivel subgingival podrían migrar al cerebro por el nervio trigémino. Si bien no se puede establecer una relación de causalidad entre alguna bacteria y la EA, la hipótesis en que *P. gingivalis* migra al cerebro y establece una microbiota transitoria, denominada neurobioma, surge como una posible vía de asociación. Estudiar y comprender este posible vínculo entre la periodontitis y EA a nivel microbiológico representa una oportunidad que contempla la posibilidad de que por medio de acciones preventivas o tratamientos odontológicos se pueda prevenir o evitar el progreso de esta enfermedad neurodegenerativa, otorgando al profesional Cirujano Dentista la responsabilidad de ser parte del equipo de salud en el tratamiento de dicha patología.

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Pueden las bacterias orales migrar al cerebro y establecer un neurobioma patogénico en pacientes con enfermedad de Alzheimer?

### **4. OBJETIVO GENERAL.**

Analizar la teoría neuroinflamatoria de origen infeccioso y la posible susceptibilidad microbiológica para desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

## 5. METODOLOGÍA.

La siguiente revisión sistemática cualitativa se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo PRISMA-P (Shamseer y cols, 2015).

El estudio se basó en la pregunta PICO: Población (pacientes con EA y Periodontitis o animales afectados de periodontitis o lesión periapical experimental), Intervención o exposición (bacterias orales), Comparación (pacientes que no padecen la EA o periodontitis y animales no afectados por periodontitis o lesión periapical experimental) y *Outcome measures* o Resultado (Detección de bacterias orales en tejidos o fluidos cerebrales).

### 5.1. Criterios de elegibilidad: inclusión y exclusión

Los trabajos seleccionados fueron estudios experimentales en animales, estudios de intervención u observacionales en humanos sobre la detección de bacterias orales en tejidos o compartimentos cerebrales de pacientes afectados o no de EA.

Como criterios de selección se eligieron los artículos publicados en los últimos 20 años, ya que la investigación de una posible asociación entre bacterias orales y la EA se ha desarrollado desde el año 2013 y existe escasa evidencia específica sobre este tema. Se seleccionaron aquellos estudios en idioma castellano por ser la lengua nativa e inglés por ser el idioma universal de la ciencia.

Los criterios de inclusión y exclusión aplicados en el análisis de texto completo fueron los siguientes:

- Se incluyeron todos los estudios que describían la asociación entre la EA y la enfermedad periodontal o lesión periapical en modelos experimentales, o
- El rol y/o la presencia de alguna bacteria oral en cerebros o fluidos de pacientes afectados de EA.
- Se excluyeron todos los estudios en idiomas distintos al castellano o inglés.

## **5.2. Estrategia de búsqueda**

Se realizó una búsqueda electrónica en las bases de datos Latindex, SciELO, Cochrane Library (CENTRAL) y Medline via Pubmed, hasta el 15 de noviembre de 2020. La estrategia de búsqueda fue realizada utilizando términos Mesh en la Base de datos Medline y en las demás bases de datos se adaptó dicha estrategia de búsqueda.

La estrategia utilizando términos MeSH fue la siguiente:

1. "Bacteria" [MeSH terms]
2. "Microbiota" [MeSH terms]
3. "Host-pathogens interactions" [MeSH terms]
4. #1 OR # 2 OR #3
5. "Periodontitis" [MeSH terms]
6. "Mouth" [MeSH terms]
7. #4 OR # 2 OR #3
8. "Alzheimer's Disease" [MeSH terms]
9. "Brain" [MeSH terms]
10. #8 OR # 9
11. #4 AND #7 AND #10

## **5.3 Selección de estudios**

Los estudios fueron examinados por dos revisores independientes y en duplicado. Cuando hubo dudas para la inclusión de algún estudio por parte de los revisores, un tercer revisor se encargó de decidir su inclusión o exclusión. Los diversos artículos obtenidos de cada base de datos fueron agrupados y se eliminaron aquellos que se encontraban duplicados. Luego, se evaluaron los títulos y resúmenes, eliminando los registros no relacionados con los objetivos de la

revisión. Finalmente, se descargaron los artículos seleccionados para su análisis a texto completo. Se usó el coeficiente *Kappa* de Cohen para calcular la concordancia entre los dos revisores, basándose en la fórmula del Manual Cochrane para revisiones sistemáticas (Higgins y Green, 2011).

#### **5.4 Extracción de datos**

La extracción de datos fue realizada por dos revisores de manera independiente y en duplicado, y un tercer revisor verificó y confirmó la precisión de la información. Cuando hubo desacuerdos entre los revisores, se discutió para llegar a un acuerdo y el tercer revisor tomó la decisión final. La extracción de datos siguió un enfoque estructurado y se creó una plantilla para extraer características clave de cada documento incluido. La lista de elementos de datos que se incluyeron en la plantilla fueron el nombre del primer autor, el año de publicación, el diseño del estudio, población estudiada, intervención o exposición, comparación y resultados sobre la presencia y ubicación de bacterias orales en pacientes con EA y en animales con periodontitis experimental. El manual Cochrane (Higgins y Green, 2011) se utilizó como guía para el proceso de recopilación de datos.

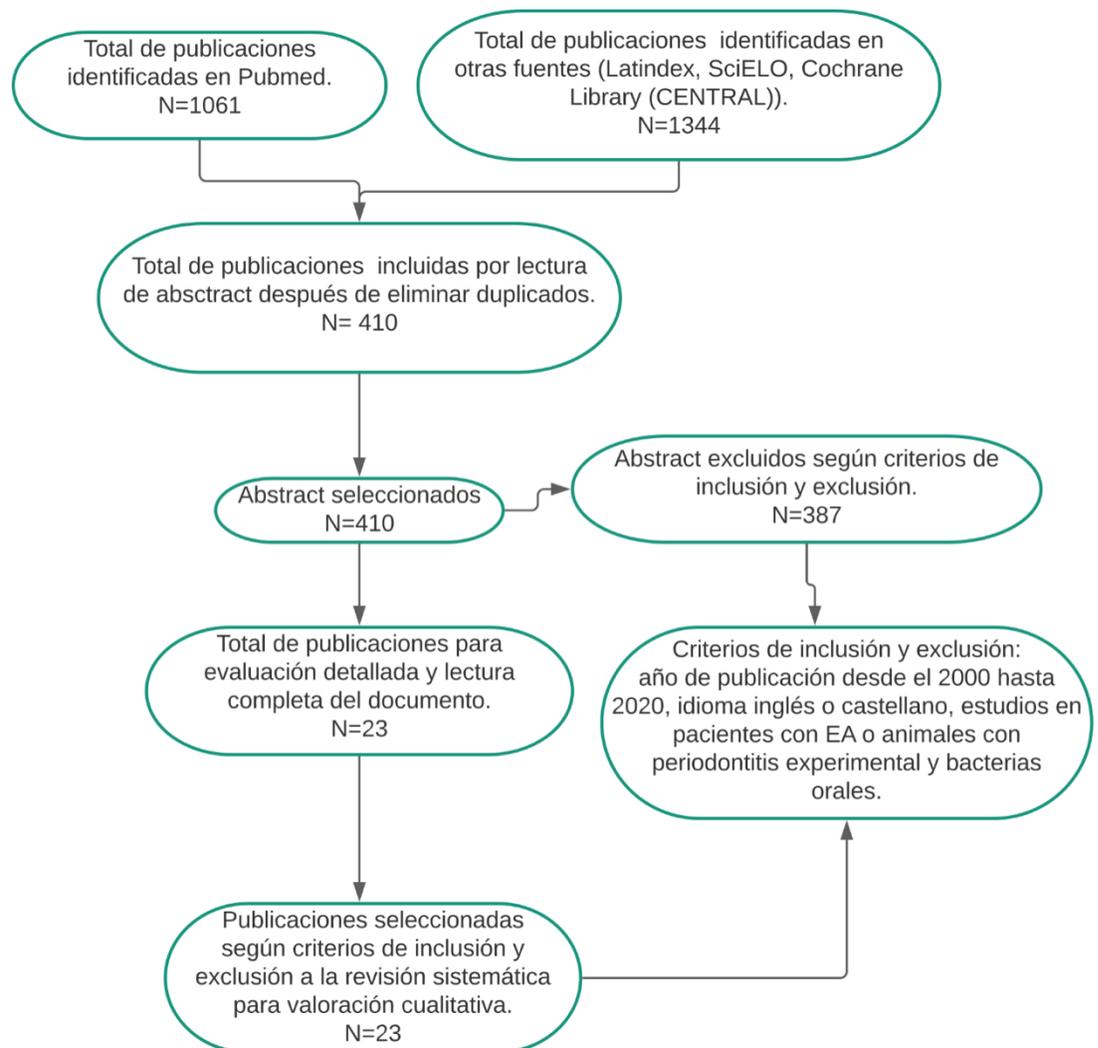
#### **5.5. Análisis de los datos**

Los artículos seleccionados fueron evaluados cualitativamente para investigar la posibilidad de migración hacia el cerebro y establecimiento de un neurobioma por parte de bacterias orales. Para calificar el riesgo de sesgo de los experimentos en animales se utilizó la herramienta SYRCLE (*Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation*) y para estudios clínicos, del tipo cohorte o casos-contróles, la herramienta Newcastle-Ottawa (Wells y cols, 2014). SYRCLE (Hooijmans y cols, 2014) se deriva de la herramienta de riesgo de sesgo de Cochrane para estudios clínicos (Higgins y cols, 2011) y se adaptó para su aplicación en estudios con animales. La herramienta resultante consta de 10 preguntas o dominios principales relacionadas con el sesgo de selección, sesgo de realización, sesgo de detección, sesgo de deserción, sesgo de notificación y otros sesgos. Se utilizaron preguntas de señalización para apoyar las preguntas principales con el fin de determinar el riesgo de sesgo. Las respuestas a las

preguntas de la herramienta se respondieron como Sí (pregunta adecuadamente respondida), No (pregunta no respondida) o Poco claro (no hay suficiente información para responder sí o no). Según las respuestas a las preguntas de señalización, los dominios de riesgo de sesgo se clasificaron como bajo, alto o poco claro. No se evaluó el riesgo de sesgo general debido a la dificultad de asignar valoración para los distintos dominios. Para evaluar el riesgo de sesgo de estudios no aleatorizados como los observacionales se utilizó la herramienta Newcastle-Ottawa. Con esta herramienta, cada estudio se evaluó en base a nueve ítems, categorizados en tres grupos: la selección de los grupos de estudio, la comparabilidad de los grupos y la determinación de la exposición o el resultado de interés. Las estrellas otorgadas por cada artículo de calidad sirven como una evaluación visual rápida. Según el número de estrellas se clasifican en calidad alta, moderada o baja. “Alta” corresponde a una puntuación de superior a 7 estrellas; “Moderada” corresponde a una puntuación de 5 a 7 estrellas; y “Baja” corresponde a una puntuación inferior a 5 estrellas.

## 6. RESULTADOS

Inicialmente se identificaron un total de 2.405 registros en las bases de datos Medline via Pubmed, Latindex, SciELO, y Cochrane Library (CENTRAL). Tras la eliminación de duplicados y la lectura de los resúmenes, se seleccionó un total de 410 resúmenes potencialmente elegibles. Al aplicar los criterios de inclusión, se seleccionaron 23 artículos y se excluyeron 387 artículos. Después del análisis a texto completo de los estudios, todos fueron seleccionados, quedando finalmente 23 artículos para el análisis cualitativo. Los procedimientos de selección de los estudios se describen en el diagrama de flujo PRISMA (Figura N°1).



**Figura N°1. Diagrama de flujo PRISMA.** Proceso de selección de estudios para su análisis cualitativo.

### 6.1 Detección de bacterias orales

Los 23 estudios correspondieron a 13 estudios en modelos animales (Foschi y cols, 2006; Poole y cols, 2015; Ishida y cols, 2017; Liu y cols, 2017; Rokad y cols, 2017; Singhrao y cols, 2017; Wu y cols, 2017; Ilievski y cols, 2018; Ding y cols, 2018; Zhang y cols, 2018; Han y cols, 2019; Dominy y cols, 2019; Díaz-Zúñiga y cols, 2020) y 10 estudios epidemiológicos observacionales o descriptivos en pacientes con EA (Riviere y cols, 2002; Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Poole y cols, 2013; Noble y cols, 2014; Ide y cols, 2016; Emery y cols, 2017; Laugisch y cols, 2018; Siddiqui y cols, 2019; Leblhuber y cols, 2020). El estudio de Dominy y cols (2019), se determinó como experimental y observacional, ya que consideró como población de estudio tanto pacientes con EA como animales con periodontitis experimental.

Los datos de los estudios incluidos, correspondientes al nombre del primer autor, el año de publicación, el diseño del estudio, población estudiada, intervención o exposición, comparación y resultados sobre la presencia y ubicación de bacterias orales en modelos de infección experimental y pacientes con EA se presentan en la tabla N°1.

**Tabla N°1. Tabla de extracción P.I.C.O. de los estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* y observacionales.** A partir del análisis de la literatura seleccionada en esta sección se resumen los principales hallazgos que se relacionan con la pregunta de investigación. ApoE: Apolipoproteína E, hAPP J20: ratones transgénicos para la proteína precursora de amiloide humana, SCID: ratones afectados de Inmunodeficiencia combinada severa, EA: Enfermedad de Alzheimer, BHE: Barrera hematoencefálica, LCE: Líquido Cerebro Espinal, LPS: Lipopolisacárido, FCG: Fluido Crevicular Gingival, Rgp: Arg-gingipaína, Kgp: Lys-gingipaína.

Referencia	Diseño del estudio	Población	Intervención	Comparación	Resultados
Ishida y cols, 2017	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones hAPP-J20 infectados con <i>P. gingivalis</i> .	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones hAPP-J20 no infectados.	Detección de LPS en el suero y cerebro de ratones inoculados con <i>P. gingivalis</i> .

Poole y cols, 2015	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones ApoE-/- infectados con distintas bacterias orales.	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> y <i>Fusobacterium</i> .	Ratones ApoE-/- control.	Se detectó DNA de <i>P. gingivalis</i> en microglia y neuronas piramidales del hipocampo.
Singh Rao y cols, 2017	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones macho ApoE-/- infectados con <i>P. gingivalis</i> .	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones macho ApoE-/- control.	Detección intracerebral de <i>P. gingivalis</i> y de gingipainas en vasos sanguíneos del hipocampo.
Ding y cols, 2018	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones C57BL/6J hembra de 4 semanas y 12 meses de edad infectados con <i>P. gingivalis</i> .	Administración por medio de sonda oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones C57BL/6J hembra sin infección.	TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ en los tejidos cerebrales fueron mayores en ratones infectados con <i>P. gingivalis</i> de mediana edad que en ratones control.
Han y cols, 2019	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones macho C57BL, de 6 semanas de edad infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	Inyección cardiaca de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	Ratones macho C57BL, de 6 semanas de edad sin infección.	Detección de <i>A. actinomycetemcomitans</i> en la corteza cerebral.
Wu y cols, 2017,	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones de 2 y 12 meses de edad.	Inyección intravenosa de LPS purificado de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones de <i>wild-type</i> sin bacterias.	Aumento de la expresión de <i>CatB</i> en las microglías y neuronas de ratones de mediana edad.
Ilievski y cols, 2018	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones C57BL/6 <i>wild-type</i> .	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones <i>wild-type</i> sin bacterias.	La gingipaina de <i>P. gingivalis</i> se detectó en el hipocampo, microglías y astrocitos.

Zhang y cols, 2018	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones C57BL/6 <i>wild-type</i> infectados con <i>P. gingivalis</i> .	Inyección intraperitoneal de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones C57BL/6 control.	Astroцитos y microglías se activaron en la corteza e hipocampo secretando citoquinas pro-inflamatorias ante el LPS de <i>P. gingivalis</i>
Foschi y cols, 2006	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones SCID y <i>wild-type</i> jóvenes infectados con bacterias orales.	Infección intracanal de <i>T. denticola</i> , <i>P. gingivalis</i> y <i>T. forsythia</i> .	Ratones sin infección bacteriana.	Se detectó DNA de <i>T. denticola</i> en el bazo, el corazón y el cerebro de ratones inmunodeficientes y en el bazo de ratones <i>wild-type</i> .
Rokad y cols, 2017	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones macho ApoE <sup>-/-</sup> Infectados con <i>P.gingivalis</i> .	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones macho ApoE <sup>-/-</sup> control.	Microvasculatura del hipocampo de ratones ApoE <sup>-/-</sup> infectados presenta estrés oxidativo y pérdida de integridad de la BHE.
Liu y cols, 2017	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratones CX3CR1 <sup>+/G</sup>	Micro-inyección de <i>P. gingivalis</i> en la corteza somatosensorial.	Ratones CX3CR1 <sup>+/G</sup> control.	Las gingipainas Rgp y Kgp activan a las microglías y contribuyen a la migración celular y respuesta inflamatoria mediante la secreción de quimioquinas y mediadores pro-inflamatorios.

Díaz-Zúñiga y cols, 2020	Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	Ratas Sprague-Dawley <i>wild-type</i> .	Inducción de periodontitis mediante inoculación palatina de serotipos de <i>P. gingivalis</i> .	Ratas sin periodontitis.	Los serotipos más virulentos inducen periodontitis, neuroinflamación, deterioro cognitivo, marcadores histopatológicos de la EA. Independiente de su virulencia, todas las bacterias inoculadas se detectan en el cerebro.
Poole y cols, 2013	Estudio observacional	Tejido cerebral de pacientes afectados de EA.	Identificar <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> y <i>P. gingivalis</i> en tejido cerebral <i>post mortem</i> .	Sujetos que fallecieron por una causa distinta a EA.	Se detectó LPS de <i>P. gingivalis</i> en el tejido cerebral <i>post mortem</i> de pacientes con EA.
Dominy y cols, 2019	Estudio observacional  Ensayo experimental <i>in vivo</i> .	1) Tejido cerebral <i>post mortem</i> de pacientes con EA.  2) Voluntarios humanos con periodontitis y EA.  3) Ratones hembra BALB/c de 4 semanas infectados con <i>P. gingivalis</i> .	1) Identificar la presencia de gingipainas de <i>P. gingivalis</i> en cerebro <i>post mortem</i> y en LCE de pacientes con EA.  2) Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	1) Tejido cerebral <i>post mortem</i> de pacientes sin EA.  2) Pacientes sin EA.  3) Ratones hembra BALB/c control.	1) Detección de <i>P. gingivalis</i> en cerebro y LCE de pacientes con EA afectados de periodontitis.  2) Aumento de la producción de A $\beta$ <sub>1-42</sub> . La inhibición de la gingipaina redujo la carga bacteriana y la neuroinflamación.
Siddiqui y cols, 2019	Ensayo observacional	Tejido cerebral de pacientes afectados de EA.	Identificar <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> y <i>P. gingivalis</i> en	Tejido cerebral de pacientes sanos.	Detección de <i>Treponema</i> y <i>Veillonella</i> en el tejido cerebral con EA.

			tejido cerebral <i>post mortem</i> .		
Emery y cols, 2017	Estudio observacional	Tejido de corteza cerebral <i>post mortem</i> de pacientes afectados por EA.	Detección de subunidad 16S DNA de bacterias orales en tejido <i>post mortem</i> de corteza temporal.	Tejido cerebral de pacientes sin EA.	Detección de <i>Firmicutes</i> y <i>Actinobacterias</i> en los cerebros de pacientes con EA.
Riviere y cols, 2002	Estudio observacional	Tejido cerebral de pacientes afectados de EA.	Detección de <i>Treponema</i> oral.	Tejido cerebral de pacientes sin EA.	Se detectó <i>Treponema</i> oral en ganglios del trigémino, protuberancia, corteza cerebral e hipocampo.
Laugisch y cols, 2018	Estudio observacional	Personas afectadas de EA.	Detección de anticuerpos ante bacterias periodontales en muestras de FCG, suero y LCE.	Pacientes con otras formas de demencia	Los patógenos periodontales pueden ingresar al cerebro y estimular una respuesta inmune local.
Sparks y cols, 2012	Estudio observacional	Pacientes con deterioro cognitivo leve o EA.	Detección de anticuerpos contra <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>C. rectus</i> , <i>F. denticola</i> , <i>T. nucleatum</i> , <i>T. forsythia</i> y <i>P. intermedia</i> .	Niveles de anticuerpos en sujetos sanos.	Presencia de anticuerpos contra <i>F. nucleatum</i> y <i>P. intermedia</i> en suero de pacientes con EA.

Kamer y cols, 2009	Estudio observacional	Pacientes afectados de EA.	Cuantificación de niveles de TNF- $\alpha$ y anticuerpos contra bacterias periodontales.	Controles sanos	Mayores niveles de TNF- $\alpha$ en plasma y anticuerpos contra las bacterias periodontales en pacientes con EA.
Noble y cols, 2014	Estudio observacional	Personas afectadas de EA.	Detección de IgG en suero contra <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>T. denticola</i> , <i>C. rectus</i> , <i>E. nodatum</i> y <i>A. naeslundii</i> .	Pacientes sanos.	Mayores niveles séricos de IgG contra bacterias periodontales en pacientes con EA.
Leblhuber y cols, 2020	Estudio observacional	Pacientes afectados de EA.	Muestra de FCG para determinar la presencia de <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	Controles sanos.	<i>P. gingivalis</i> se asoció con mayor deterioro cognitivo.
Ide y cols, 2016	Estudio observacional	Pacientes con enfermedad periodontal afectados por EA a los 0 y 6 meses.	Evaluación cognitiva y toma de muestra de sangre para detectar marcadores inflamatorios sistémicos.	Estado inicial de cada sujeto.	El deterioro cognitivo en sujetos con EA es 6 veces mayor en presencia de periodontitis en comparación con sujetos afectados de EA.

## **6.2 Detección de bacterias en modelos experimentales de periodontitis**

Diferentes estudios se han diseñado en los últimos años para inducir la periodontitis experimental. Actualmente se describen 3 métodos para inducir la periodontitis experimental: ligadura, inoculación palatina y *oral gavage* (Garlet, 2010). De ellos, la ligadura crea lesiones osteo-resortivas asociada a la disbiosis de la microbiota oral, un proceso inflamatorio agudo y su período máximo de observación es de 15 días, previo a la pérdida del diente ligado (Lindhe y cols 1992; Galvão y cols, 2003; Abe y Hajishengallis, 2013). La inoculación palatina crea una respuesta inflamatoria local, resorción ósea cuantificable a partir del día 30 y un proceso inflamatorio crónico (Nakamura y cols, 2008; Ossola y cols, 2012; Garlet y cols, 2005). El *oral gavage* crea una disbiosis intestinal y sepsis, observando resorción ósea en algunos casos desde el día 15 en adelante (Storrer y cols, 2010; De Molon y cols, 2016). Cada uno de estos métodos tiene una indicación específica, cuando se desea experimentar en terapias regenerativas o preventivas, la ligadura es el *gold standard* (Abe y Hajishengallis, 2013; De Molon y cols, 2016). Sin embargo, cuando el objetivo es analizar el efecto de una bacteria *keystone* o un factor de virulencia particular, la metodología a elegir es la inoculación palatina. De esta manera, si se desea evaluar el efecto sistémico de una bacteria o el grado de sepsis, el *oral gavage* puede ser una forma de inducirla. Cada uno posee tiempos y metodologías distintas; sin embargo, si se desea evaluar la capacidad de migración de una bacteria en particular, tanto la inoculación palatina como el *oral gavage* son estudios que permiten evaluar ese resultado. Se considera que la inoculación palatina sería lo más cercano a una periodontitis, considerando el tiempo que demora en generarse la resorción ósea, el infiltrado de linfocitos Th1 y Th17 en los tejidos periodontales subyacentes a la lesión y el patrón de citoquinas secretadas y cuantificadas a nivel local o sistémico (Garlet, 2010; Monasterio y cols, 2018a). Si bien, la ligadura es el *gold standard* para inducir la periodontitis, existen animales en los cuales la ligadura no es suficiente. Tal es el caso de los conejos, donde la ligadura no genera disbiosis y es necesario inocular una bacteria en conjunto con la aplicación de la ligadura para poder inducir la disbiosis (Hasturk y cols, 2009; Kantarçi y cols, 2015).

Recientes investigaciones en distintos modelos de ratones transgénicos evaluaron el efecto de la periodontitis inducida mediante diferentes técnicas en el deterioro cognitivo (Tabla N°1). En ratones ApoE<sup>-/-</sup> afectados de periodontitis se detectó la presencia de *P. gingivalis* o sus gingipaínas —principales moléculas a cargo de la proteólisis asociada al metabolismo— en el cerebro y cerca a las neuronas piramidales y vasos sanguíneos del hipocampo (Poole y cols, 2015; Shingarao y cols, 2017; Rokad y cols, 2017), observándose un aumento en los niveles de estrés oxidativo en estructuras de la microvasculatura del hipocampo (Rokad y cols, 2017). Además, en ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína precursora de amiloide (del inglés *amyloid precursor protein*, APP) humana mutada (hAPP-J20) infectados por vía oral con *P. gingivalis*, se mostró un incremento en los niveles del péptido amiloide  $\beta$  (A $\beta$ )<sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> en hipocampo y corteza (Ishida y cols, 2017). En otro estudio, tras la exposición sistémica de ratones a *P. gingivalis* se observó que la catepsina B (*CatB*) cumple un rol crítico en el inicio de la neuroinflamación y disfunción neuronal. En efecto, en ratones C57BL/6 *CatB*<sup>-/-</sup> expuestos a lipopolisacárido (LPS) de *P. gingivalis* diariamente durante 5 semanas consecutivas se detectó un incremento en la expresión de *CatB* en las microglías y neuronas (Wu y cols, 2017). En ratones CX3CR1<sup>+/GFP</sup> tras una microinyección de *P. gingivalis* en la corteza somatosensorial se evaluó el efecto de las gingipaínas Arg-gingipaína (Rgp) y Lys-gingipaína (Kgp), en la activación de las microglías y se evidenció que contribuyen a la migración celular y respuesta inflamatoria mediante la secreción de quimioquinas y mediadores pro-inflamatorios (Liu y cols, 2017). Finalmente, en ratones a los cuales se inyectó *A. actinomycetemcomitans* en el corazón se demostró que el RNA bacteriano logró traspasar la barrera hematoencefálica (BHE) por medio de vesículas de membrana externa y observó que las cargas de RNA aumentaron la expresión del factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*) TNF- $\alpha$  en el cerebro (Han y cols, 2019).

Resultados similares se observaron al evaluar el efecto de *P. gingivalis* en modelos de periodontitis experimental en ratones *wild-type* (Tabla N°1). En ratones C57BL/6J de 4, 8 o 12 meses de edad infectados con LPS purificado de *P. gingivalis* o *P. gingivalis ad integrum* se detectaron mayores niveles de expresión de las

citoquinas interleuquina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en los tejidos cerebrales, la presencia de gingipaínas de *P. gingivalis* intra y perinuclear en microglías, astrocitos, neuronas o mayores niveles de proteína Tau fosforilada (Ilievski y cols, 2018; Zhang y cols, 2018). En esta misma especie de ratones se evaluó la capacidad de las gingipaínas RgpB y Kgp de *P. gingivalis* para inducir la producción y degradación de A $\beta$  o proteína asociada a microtúbulos Tau y su efecto en células cerebrales posterior a la administración oral de *P. gingivalis* (Dominy y cols, 2019). En estos animales se detectó un incremento en la producción del péptido A $\beta$  y de la proteína Tau fosforilada en los cerebros de los ratones infectados con *P. gingivalis* y se observó 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 inflamatoria del hospedero (Dominy y cols, 2019). Recientemente, nuestro grupo de investigación utilizó distintas cepas de *P. gingivalis*, virulentas y no virulentas, y evaluó la capacidad de éstas para producir periodontitis y deterioro cognitivo (Díaz-Zúñiga y cols, 2020). En efecto, los serotipos K1 y K2 desarrollaron periodontitis, deterioro cognitivo, neuroinflamación y marcadores de EA en comparación a las otras cepas. Además, se logró demostrar que, independiente de su virulencia, todas las cepas inoculadas fueron detectadas en el hipocampo.

De igual manera que las investigaciones mencionadas anteriormente enfocadas en periodontitis experimental que detectan *P. gingivalis* o sus factores de virulencia, otro estudio en un modelo de lesión endodóntica experimental confirmó la presencia de bacterias orales en el cerebro. En efecto, en el modelo de mono-infección pulpar con *P. gingivalis*, *T. forsythia* o *T. denticola* en ratones *wild-type* afectados o no de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) se detectó una alta incidencia de abscesos orofaciales en ratones *wild-type* mono-infectados con *T. denticola* en comparación con las otras condiciones. Además, en distintos tejidos de ambos grupos de ratones se detectó la presencia de DNA de *T. denticola*, indicando que esta bacteria posee una alta patogenicidad y una capacidad para migrar a órganos distantes como el cerebro (Foschi y cols, 2006).

Finalmente, al evaluar el efecto que las bacterias o sus factores de virulencia inducen en cultivos de células cerebrales, distintos estudios han trabajado con *P. gingivalis*. Al estimular cultivos enriquecidos en neuronas con LPS de *P. gingivalis* se detectaron mayores niveles de producción de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> y, en cultivos de microglías, un incremento en la producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y de expresión de *APP* y *CatB* (Ishida y cols, 2017; Wu y cols 2017).

### **6.3 Detección de bacterias orales en tejido cerebral humano**

Diversos estudios se han encargado de identificar la presencia de factores de virulencia o bacterias íntegras en el tejido cerebral *post mortem*, suero o líquido cerebro-espinal (LCE) de pacientes afectados o no de EA y cuyos principales hallazgos se resumen en la tabla N<sup>o</sup>1. Brevemente, la presencia de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *Veillonella spp*, *Firmicutes spp* y *Actinobacterias spp* se cuantificó en distintos tejidos cerebrales, identificándose *P. gingivalis* y *T. denticola* en el hipocampo, corteza cerebral, IV ventrículo o LCE y, las demás bacterias, en el LCE de pacientes afectados o no de EA (Riviere y cols, 2002; Poole y cols, 2013; Emery y cols, 2017; Dominy y cols, 2019; Siddiqui y cols, 2019). En este mismo sentido, distintos estudios detectaron la presencia de anticuerpos anti-bacterias periodontales en pacientes afectados de EA (Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012, Noble y cols, 2014). Además, en estudios observacionales demostraron la presencia de anticuerpos contra *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* y *P. intermedia* en suero o fluido crevicular gingival (FCG) de pacientes afectados de EA con o sin periodontitis, demostrando que existe un incremento de estos anticuerpos cuando los pacientes se encuentran afectados de EA y periodontitis (Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Noble y cols, 2014; Laugisch y cols, 2018). Al analizar un estudio de casos y controles se determinó la presencia de *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* en FCG de pacientes con y sin EA. De estas bacterias, la mayor carga de *P. gingivalis* se asoció con mayor deterioro cognitivo de pacientes con EA (Leblhuber y cols, 2020). En efecto, en pacientes afectados de periodontitis y EA el deterioro cognitivo fue 6 veces mayor al detectado en pacientes con EA y sin periodontitis (Ide y cols, 2016).

#### 6.4 Concordancia entre revisores

Para definir si existió concordancia en el proceso de selección de los artículos, se calculó el coeficiente *Kappa* de Cohen, el cual fue de  $\kappa = 0,91$  (Tabla N°2).

**Tabla N° 2. Cálculo de *k* de Cohen.** Proporción de acuerdo (*Pra*) = 0,99, acuerdo esperado (*Pe*) = 0,89; Acuerdo *K* = 0,91. Sin acuerdo: 0,0–0,20; leve acuerdo: 0,21–0,40; acuerdo equitativo: 0,41–0,60; acuerdo moderado: 0,61–0,80; acuerdo sustancial: 0,81–1,00. El acuerdo *K* se calculó a partir de 410 artículos para incluir 23 artículos con la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión.

		Revisor 2		Total
		SI	NO	
Revisor 1	SI	20	1	21
	NO	2	387	389
Total		22	388	

#### 6.5 Análisis del riesgo de sesgo de los estudios

En la evaluación del riesgo de sesgo, mediante la herramienta SYRCLE (Tabla N°3), la mayoría de los dominios (N°1, 3, 5, 6, 7 y 8) se calificaron como “Poco claro”. La mayoría de los estudios en el dominio N°1 se calificaron como “No”, debido a que no se informaron los métodos de asignación al azar durante la secuencia de asignación; sin embargo, en cuatro de los estudios se mencionó que se realizó algún método de asignación al azar, pero no se aclaró cuál fue utilizado (Poole y cols, 2015; Singhrao y cols, 2017; Ding y cols, 2018; Zhang y cols, 2018); en consecuencia, éstos se calificaron como “Sí\*”. En el dominio N°2 se marcaron todos como “Sí”, ya que los grupos fueron similares al inicio del estudio. El dominio N°3 se marcó como “Poco claro” para todos los estudios debido a la ausencia total de informes sobre la aleatorización al asignar animales a los grupos de intervención/control. El dominio N°4 se marcó como “Sí” en todos los casos, debido

a que es poco probable que los resultados se vean influenciados por no albergar a los animales al azar. Los dominios N°5, N°6 y N°7 se referían al cegamiento durante la intervención o al evaluar el resultado del estudio, donde la mayoría de los estudios no indicaron de manera clara que los investigadores estaban cegados sobre las intervenciones, tampoco que eligieron un animal al azar ni que los evaluadores de resultados estaban cegados, por lo que se marcaron cómo “Poco claro”. Por otro lado, es poco probable que los datos de resultados faltantes (dominio N°8) de los estudios influyan en los resultados finales, solo en un estudio el número final de animales utilizados cambió, ya que se sacrificó uno de los animales al finalizar la intervención, pero no se aclaró la causa (Ilievski y cols, 2018), así, todos los estudios se marcaron como “Poco claro”. Finalmente, el informe selectivo de resultados u otras fuentes de sesgo, de manera general, se marcaron como “Si” (dominio N°9 y N°10). En términos generales los estudios se marcaron mayoritariamente como “Poco claro”.

**Tabla N°3. Herramienta SYRCLE para evaluación de riesgo de sesgo de estudios experimentales en animales.**

	Estudios												
	Ishida y cols	Poole y cols	Singharao y cols	Ding y cols	Han y cols	Wu y cols	Lliveski y cols	Zhang y cols	Foschi y cols	Rokad y cols	Dominy y cols	Liu y cols	Díaz-Zúñiga y cols
<b>1</b>	<b>SYRCLE's Tool</b>												
	<b>¿Se generó y aplicó adecuadamente la secuencia de asignación?</b>												
	No	Si*	Si*	Si*	No	No	No	Si*	No	No	No	No	No
	* ¿Los investigadores describieron un componente aleatorio en el proceso de generación de secuencias, como: ■ Una tabla de números aleatorios; ■ Un generador de números aleatorios por computadora.												
<b>2</b>	<b>¿Fueron los grupos similares al inicio del estudio o se ajustaron por factores de confusión en el análisis?</b>												
	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	* ¿Fue la distribución de las características basales relevantes equilibrado para los grupos de intervención y control? *De ser relevante, ¿los investigadores se ajustaron adecuadamente a la distribución desigual de algunas características de referencia relevantes en el análisis? *¿Fue adecuado el momento de la inducción de la enfermedad? *¿Se ocultó adecuadamente la asignación a los diferentes grupos durante? *¿El investigador que asigna los animales al grupo de intervención o control no puede prever la asignación debido a uno de los métodos siguientes o equivalentes? ■ Codificación de tercetos de la asignación al azar opacos y numerados secuencialmente. ■ Sobres cerrados,												
<b>3</b>	<b>¿Fueron los animales alojados al azar durante el experimento?</b>												
	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro
	*¿Los autores colocaron al azar las jaulas o los animales dentro de la sala / instalación de animales? ■ Los animales se seleccionaron al azar durante la evaluación de resultados. *¿Es poco probable que los resultados o la medición del resultados se vieran influidos por no alojar a los animales al azar?												
<b>5</b>	<b>¿Los cuidadores y / o investigadores estaban cegados al conocimiento de qué intervención recibió cada animal durante el experimento?</b>												
	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro
	* ¿Se aseguró el cegamiento de los cuidadores e investigadores, y era poco probable que se hubiera roto? *¿Se seleccionaron los animales al azar para el resultado? * ¿Los investigadores eligieron un animal al azar durante evaluación de resultados, o utilizaron un componente aleatorio en la generación de la secuencia para la evaluación de resultados?												



Posteriormente, para los estudios observacionales se utilizó la herramienta de Newcastle-Ottawa, que evalúa 9 aspectos. Cada estudio fue definido con una alta, moderada o baja calidad con relación al cumplimiento de cada sección (Tabla N°4). En la sección de selección, solo 3 estudios no tuvieron la puntuación máxima de 4 estrellas (Poole y cols, 2013; Ide y cols, 2016; Leblhuber y cols, 2020), principalmente por no realizar una validación independiente de los casos y no tener grupos de control comunitarios. En la sección de comparación, solo 3 estudios tuvieron la puntuación máxima de 2 estrellas (Sparks y cols, 2012; Noble y cols, 2014; Ide y cols, 2016) y un estudio tuvo 0 estrellas (Dominy y cols, 2019), ya que no consideró la edad y/o sexo ni otros tres factores de riesgo. En la sección de exposición, 5 estudios tuvieron el puntaje máximo de 3 estrellas (Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Noble y cols, 2014; Laugisch y cols, 2018). En resumen, en la más de la mitad de los estudios informaron de un investigador ciego que registró los resultados de la investigación (Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Noble y cols, 2014; Ide y cols, 2016; Laugisch y cols, 2018; Leblhuber y cols, 2020) y no se perdieron pacientes que pudieran afectar los resultados (Riviere y cols, 2002; Kamer y cols, 2009; Poole y cols, 2013; Noble y cols, 2014; Emery y cols, 2017; Laugisch y cols, 2018; Siddiqui y cols, 2019; Dominy y cols, 2019). Al sumar la puntuación de cada uno de los 11 estudios, se determinó que 4 poseen una calidad alta (Kamer y cols, 2009; Noble y cols, 2014; Laugisch y cols, 2018), 6 poseen una calidad moderada (Ide y cols, 2016; Sparks y cols, 2012; Poole y cols, 2013; Dominy y cols, 2019; Riviere y cols, 2002; Emery y cols, 2017; Siddiqui y cols, 2019) y uno de ellos una calidad baja (Leblhuber y cols, 2020). En términos generales la puntuación en la Escala Newcastle-Ottawa de los estudios observacionales fue de calidad moderada.

**Tabla N°4. Herramienta Newcastle-Ottawa para evaluación de riesgo de sesgo de estudios observacionales.**

Criterios de evaluación de la calidad	Aceptable	Estudio										
		Noble y cols.	Ide y cols.	Leblhuber y cols.	Laugisch y cols.	Kamer y cols.	Sparks y cols.	Poole y cols. (2013)	Dominy y cols.	Riviere y cols.	Emery y cols.	Siddiqui y cols.
<b>Selección</b>												
¿Es adecuada la definición de caso o exposición?	★	★	★	★	★	★	-	★	★	★	★	★
¿Representatividad de los casos?	★	★	-	★	★	★	★	★	★	★	★	★
¿Selección de controles?	★	-	-	★	★	★	-	★	★	★	★	★
¿Definición de controles?	★	-	-	★	★	★	★	★	★	★	★	★
<b>Comparabilidad</b>												
Controles del estudio por edad/ sexo	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★
¿Se estudia controles para al menos 3 factores de riesgo adicionales?	★	★	-	-	-	★	-	-	-	-	-	-
<b>Exposición</b>												
¿Evaluación de la exposición?	★	★	★	★	★	★	-	★	★	★	★	-
Mismo método de verificación para casos y controles	★	-	-	★	★	★	★	★	★	★	★	★
Tasa de no respuesta	★	-	-	★	★	★	★	★	★	★	★	★
Lo mismo para ambos grupos												
<b>Nivel de calidad general (Máximo = 9)</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
Categoría de calidad												
Alta Moderada Baja Alta Alta Alta Moderada Moderada Moderada Moderada Moderada Moderada												
Alta: >7; Moderada: 5-7; Baja <5												
<b>Nota:</b> Cada estrella significa que el criterio se cumple, la ausencia de estrella significa ausencia de cumplimiento.												

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Posible rol de las bacterias orales detectadas en el cerebro.

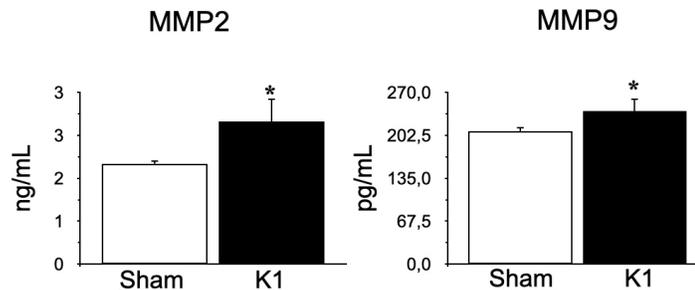
En la presente revisión sistemática pudimos evidenciar que existen tanto estudios experimentales como estudios descriptivos en humanos que demuestran la presencia de bacterias orales en el cerebro de pacientes afectados o no de EA, tales como *T. denticola* y *P. gingivalis*. En efecto, estudios experimentales demuestran que *P. gingivalis* desencadena o se relaciona con eventos pro-inflamatorios que podrían favorecer el desarrollo o progreso de la EA y, en algunos de ellos, *P. gingivalis* se detecta en tejidos cerebrales, tales como corteza cerebral o hipocampo (Foschi y cols, 2006; Kamer y cols, 2009; Poole y cols, 2015; Ishida y cols, 2017; Liu y cols, 2017; Wu y cols, 2017; Singhrao y cols, 2017; Rokad y cols, 2017; Iliovski y cols, 2018; Zhang y cols, 2018; Ding y cols, 2018; Han y cols, 2019; Dominy y cols, 2019; Díaz-Zúñiga y cols, 2020). Por otra parte, los estudios en humanos demuestran que bacterias orales como *P. gingivalis* o *T. denticola* se detectan en el ganglio trigeminal, núcleo pontino del nervio trigémino, hipocampo, corteza cerebral, IV ventrículo y LCE (Riviere y cols, 2002; Poole y cols, 2015).

Según lo observado en los estudios publicados, es posible que la infección crónica por periodonto-patógenos pueda resultar en el desarrollo de una neuropatología consistente con la EA. En efecto, posterior a la infección con *P. gingivalis* se ha evidenciado acumulación de A $\beta$  en el hipocampo y la corteza en ratones transgénicos para APP (Ishida y cols, 2017). Una hipótesis que surge al evaluar el incremento de A $\beta$  en el hipocampo y la astrogliosis posterior a la migración de bacterias orales sugiere que el péptido A $\beta$  cumpliría un rol antimicrobiano (Kumar y cols, 2016; Spitzer y cols, 2016). Así, los astrocitos secretarían este péptido con el objetivo de encapsular a la bacteria e impedir su difusión por el cerebro. Esta encapsulación permitiría el reconocimiento por TLR4 de las microglías, que fagocitarían tanto al péptido A $\beta$  como a la bacteria, evitando su acumulación y los efectos no deseados. Sin embargo, en el caso de bacterias con una mayor virulencia, el péptido de A $\beta$  podría proteolizarse y cumplir otras funciones. Tal es el caso de los serotipos más virulentos de *P. gingivalis* que secretan una mayor concentración de RgpA y Kgp en comparación con serotipos

menos virulentos. Uno de los sustratos de estas enzimas son las proteínas con arginina o lisina en su estructura primaria (Li y Collyer, 2011). En efecto, tanto el péptido de A $\beta$  como la proteína asociada a microtúbulos Tau poseen en su estructura primaria ambos aminoácidos (Dominy y cols, 2019). Una vez en el cerebro, las microglías y los astrocitos reaccionan a la presencia de *P. gingivalis* secretando mediadores pro-inflamatorios y péptido de A $\beta$ , este último encapsularía a *P. gingivalis*, la cual utilizaría sus gingipaínas para proteolizar A $\beta$ , insolubilizar uno de sus fragmentos y utilizar el otro como fuente de energía (Liu y cols, 2017; Dominy y cols, 2019). De esta manera, las microglías no podrían eliminar el A $\beta$  insoluble y *P. gingivalis* se acumularía en el cerebro incrementando los mediadores pro-inflamatorios, desencadenando eventos que podrían iniciar o afectar la progresión de la EA.

Por otra parte, *P. gingivalis* puede incrementar los niveles de estrés oxidativo en los vasos sanguíneos del hipocampo, lo cual puede conducir a una pérdida de la integridad funcional de la BHE debido a que el estado pro-inflamatorio podría inducir la secreción de metalo-proteinasas de matriz (del inglés *matrix metalloproteinases*, MMP)-2 y MMP-9. Estas MMPs secretadas por las microglías degradan a la agrina, distroglicano y lamininas que conforman la lámina basal a la cual se anclan los astrocitos para conformar la unidad neurovascular. En condiciones inflamatorias, existe evidencia de que ante la infección por *E. coli*, las microglías secretan mediadores inflamatorios, MMPs y, en particular, CCL5 (Carson y cols, 2014). En efecto, la disrupción de la BHE y la mayor concentración de CCL5 permitiría que macrófagos circulantes puedan migrar y apoyar a las microglías en la fagocitosis de los antígenos que están induciendo esa respuesta inflamatoria. De manera similar, *P. gingivalis* podría inducir la secreción de mayores niveles de MMP-2 y MMP-9. En un modelo de periodontitis experimental en ratas inducida por la inoculación palatina del serotipo K1 de *P. gingivalis*, luego de 55 días post-infección, se cuantificaron los niveles de MMP-2 y MMP-9 producidos en el hipocampo (Figura N°2). Niveles significativamente mayores de ambas MMPs se detectaron en las ratas que habían sido inoculadas con el serotipo K1 en comparación con las ratas *sham*. (Datos no publicados aún). Contrariamente, la evidencia sugiere que para que la BHE pierda su integridad, la presencia de MMP-2 y MMP-9 debe estar a una razón de 1:10 y en

condiciones inflamatorias, dada por un incremento de IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Song y cols, 2015).



**Figura N°2. Cuantificación de MMPs en hipocampos de ratas afectadas de periodontitis experimental.** En ratas afectadas de periodontitis experimental inducida por K1 (4 ratas) o sham (4 ratas) se cuantificaron los niveles producidos de MMP2 y MMP9 mediante ELISA. MMP: metalo-proteinasas de matriz, ng: nanogramo, pg: picogramo. \*p<0,05. Fuente: Datos no publicados aún.

Estudios recientes sugieren que para que la permeabilidad de la BHE suceda, la concentración de los mediadores descritos anteriormente debe estar sobre los 150 ng/mL (Song y cols, 2015). Actualmente, ningún estudio de los citados en la tabla N°1 midió todos los mediadores y MMPs para determinar si *P. gingivalis* induce una respuesta cerebral que permita la disrupción de la BHE, o bien, si *P. gingivalis* migra al cerebro debido a que la inflamación producida a nivel periodontal o sérico produce la disrupción de la BHE. En conjunto, los datos no permiten establecer que las bacterias orales puedan ingresar al cerebro por la BHE, ni que las bacterias puedan inducir la disrupción de esta. Así, este vacío de conocimiento debe ser estudiado para poder comprender de una mejor manera el potencial efecto que bacterias periodontales virulentas puedan generar en el hospedero. Esto es relevante ya que, al existir susceptibilidad microbiológica para desarrollar la periodontitis por ciertas bacterias, éstas mismas podrían generar susceptibilidad en el hospedero para originar los eventos neuroinflamatorios.

Aunque la mayoría de los estudios en animales se centraron en evaluar el rol de *P. gingivalis* en la EA, también se encontraron estudios que analizaron otras bacterias orales como *A. actinomycetemcomitans* y *T. denticola*. Con relación a *A. actinomycetemcomitans*, un estudio *in vivo* demostró que mediante las vesículas

extracelulares secretadas por este periodontopatógeno, microRNAs pueden difundir por la BHE y promover la neuroinflamación a través de la secreción de TNF- $\alpha$  (Han y cols, 2019). Por otra parte, en un modelo experimental de lesión apical se observó que *T. denticola* pudo migrar a órganos distantes como el cerebro (Foschi y cols, 2006). Si bien estos estudios demuestran que *A. actinomycetemcomitans* y *T. denticola* son capaces de producir neuroinflamación, se necesitan más investigaciones que evalúen si la periodontitis experimental inducida por ellos genera eventos cerebrales similares a los inducidos por *P. gingivalis* reportados en la literatura.

Cuando se evaluó la presencia de las distintas bacterias en el LCE, en ningún estudio experimental ni en muestras humanas se logró detectar bacterias vivas. En este sentido, la detección de la bacteria se realizó por cuantificación absoluta, por detección de LPS o algún otro factor de virulencia, lo que no implica necesariamente que la bacteria esté viva (Riviere y cols, 2002; Poole y cols, 2013; Dominy y cols, 2019; Díaz-Zúñiga y cols, 2020). Curiosamente, estos antígenos bacterianos se detectaron tanto en modelos o en pacientes con EA como en aquellos no afectados de EA. Tal es el caso de *P. gingivalis*, que en ambos tipos de estudios pudo ser detectada en el cerebro de pacientes o animales no afectados de neuroinflamación, lo que sugiere que las bacterias podrían migrar al cerebro aún en ausencia de periodontitis o EA (Dominy y cols, 2019; Díaz-Zúñiga y cols, 2020). Además, la detección de las gingipaínas RgpA y Kgp de *P. gingivalis* en los hipocampos de sujetos que fallecieron con o sin EA demostró que, independiente de si estaban o no afectados de EA, se detecta la presencia de estos factores de virulencia (Dominy y cols, 2019). Esto nos demuestra que podría existir una migración constante de bacterias orales al cerebro y, dependiendo de su virulencia, podrían afectar o no a las células cerebrales induciendo neuroinflamación o agravando un proceso neuroinflamatorio existente. La detección de estos factores de virulencia podría explicarse por las bacteremias transitorias que al cepillarse, hablar y masticar pueden inducir en distintos momentos del día. Este resultado indica que posiblemente los patógenos periodontales tienen mayor facilidad de migración en pacientes con EA y la migración de bacterias sería un evento temprano que puede explicar la patología presentada en individuos de mediana edad antes del deterioro

cognitivo (Dominy y cols, 2019). Más aún, la presencia de antígenos bacterianos en el LCE sugiere que existiría una depuración activa desde el hipocampo hacia el LCE, donde todos los desechos metabólicos son drenados por la circulación glinfática (neurona-astrocito-microglia) desde el cerebro hacia el LCE para evitar efectos no deseados (Nedergaard y Goldman, 2020). De esta manera, la detección de estos antígenos en el LCE es una clara evidencia de la presencia de bacterias orales en el cerebro. Sin embargo, ningún estudio en humanos ha identificado otra bacteria distinta a *P. gingivalis*, ni tampoco han logrado serotipificarla. Además, en muestras *post mortem*, existe un alto porcentaje de tejidos cerebrales con y sin EA que presentan LPS universal, sugiriendo que bacterias periodontales pueden migrar al tejido cerebral. Solo ciertos géneros bacterianos periodontales se aislaron exclusivamente en tejido cerebral con EA tales como *Actinomycetales spp* y *Bacteroides spp* (especies *Treponema* y *Veillonella*) (Siddiqui y cols, 2019). Otro estudio similar, también indicó que en cerebros con y sin EA se encontraron especies bacterianas, siendo la carga bacteriana mayor en el tejido cerebral con EA, observándose especies bacterianas asociadas a piel, periodonto y vía aérea, tales como *Firmicutes spp* y *Actinobacterias spp*. Si bien no se detectaron patógenos claves para el inicio y progreso de periodontitis, no se puede descartar que estas especies estuvieran presentes, ya que podrían haber estado en áreas no muestreadas de tejido cerebral (Emery y cols, 2017). En términos generales, las bacterias orales pueden ingresar al cerebro y estimular una respuesta inmune local.

Al evaluar la presencia de anticuerpos contra bacterias orales, diversos estudios han detectado la presencia de anticuerpos contra patógenos periodontales tanto en EA como en otros tipos de demencia (Laugisch y cols, 2018). En este contexto, anticuerpos contra *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* y *P. intermedia* se midieron a nivel sérico de pacientes afectados de EA, detectándose un incremento en comparación con sujetos sanos (Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Noble y cols, 2014).

Recientes estudios han analizado una posible asociación entre los patógenos periodontales y una reducción en la cognición. En efecto, la periodontitis se asocia con un aumento de seis veces la tasa de deterioro cognitivo en pacientes con EA,

además de un aumento relativo en el estado pro-inflamatorio (Ide y cols, 2016). Al evaluar la detección de *P. gingivalis* en FCG para determinar la presencia de periodonto-patógenos tanto en pacientes con y sin EA, la presencia de *P. gingivalis* se asoció con un mayor deterioro cognitivo en pacientes con EA y con bajas concentraciones séricas del biomarcador neopterinina y kinurenina —dos biomarcadores diagnósticos de EA— en pacientes con EA (Leblhuber y cols, 2020). Frente a estos datos se puede sugerir que el tratamiento de la periodontitis en pacientes afectados de EA podría disminuir su progresión, lo que respalda la necesidad de la realización de estudios para demostrar que la hipótesis infecciosa de la neuroinflamación es real y, al menos en parte, la periodontitis constituye un factor de riesgo microbiológico.

En términos generales, los resultados indican que existe una asociación microbiológica entre la periodontitis y la EA, sin embargo, no son suficientes para establecer una relación de causalidad. La infección con patógenos periodontales en animales se relacionó con el desarrollo de características neuropatológicas de la EA y en humanos con EA se detectaron dichas bacterias en LCE, FGC, suero y tejido cerebral, relacionándose con altos niveles de anticuerpos contra patógenos periodontales, aumento de IgG, de citoquinas pro-inflamatorias y deterioro cognitivo en comparación con pacientes con EA sin periodontitis o controles sanos. Es importante considerar que también se encontraron bacterias orales a nivel cerebral en animales con y sin periodontitis experimental y se identificaron patógenos periodontales en tejido cerebral, suero, FGC o LCE de pacientes sin EA y en otros tipos de demencia, aunque generalmente en menor cantidad que en EA. Los estudios tanto en animales como en humanos sobre la periodontitis y la EA son un gran aporte en el camino a comprender la etiología de la EA y sus factores de riesgo. En la actualidad, no existe un tratamiento o cura eficaz ni hay consenso sobre la etiología de la EA, por lo que es fundamental su estudio para el desarrollo de estrategias de intervención y para el tratamiento de esta enfermedad. Un mayor progreso en los estudios sobre la relación entre la periodontitis y las enfermedades cognitivas podría marcar el comienzo de nuevos cambios en el tratamiento y la prevención de los trastornos cognitivos. En conjunto, estos datos hacen suponer que existen otros factores involucrados, ya sea ambientales o genéticos, que hacen

más susceptible a un cierto grupo a desarrollar o acelerar el progreso de la EA por medio de una infección con bacterias orales.

## **7.2. Vías de migración bacterianas.**

Según los hallazgos de los estudios en animales y humanos mencionados anteriormente, distintas hipótesis se proponen para explicar las vías mediante las cuales estas bacterias podrían migrar hacia el cerebro: sanguínea, nerviosa o linfática. En la literatura generalmente se consideran las dos primeras vías donde se postula que las bacterias, sus factores de virulencia o las citoquinas proinflamatorias difunden desde el periodonto hacia la circulación sanguínea periférica o hacia las terminales del nervio trigémino. Con una menor plausibilidad biológica se propone la vía linfática, debido a que su flujo es en dirección al corazón y opuesta al cerebro y está compuesto por moléculas y células que afectarán la viabilidad bacteriana (Abbayya y cols, 2015). Sin embargo, se ha descrito recientemente la existencia del sistema glifático, que es un sistema de transporte de LCE muy organizado que comparte varias funciones clave, incluida la exportación del exceso de líquido intersticial y proteínas, con los vasos linfáticos de los tejidos periféricos (Ilfiff y cols, 2012; Nedergaard y Goldman, 2020). Este sistema permitiría el ingreso de bacterias desde el LCE hacia el neuropilo, que corresponde a una región comprendida entre varios cuerpos celulares o somas de neuronas de la sustancia gris del encéfalo y la médula espinal (Nedergaard y Goldman, 2020).

La cavidad oral es una de las principales vías de ingreso de microorganismos, especialmente bacterias (Loesche y Lopatin, 1998; Li y cols, 2000). En particular, algunos estudios han detectado la presencia de *P. gingivalis* en la circulación periférica posterior al cepillado de dientes, uso de hilo dental o masticar un alimento, en sujetos con o sin periodontitis, provocando bacteremia transitoria (Li y cols, 2000; Loos, 2005; Forner y cols, 2006). Este evento permite que *P. gingivalis* pueda migrar y establecerse en otros tejidos u órganos, tales como la capa íntima de las arterias coronarias, el hígado, el tejido adiposo o la placenta (Mahendra y cols, 2009; Katz y cols, 2009; Ishikawa y cols, 2013). En efecto, un estudio reciente demostró que el 100% de los pacientes con enfermedad cardiovascular tenían la capa íntima de sus arterias coronarias colonizadas por *P. gingivalis* (Mougeot y cols, 2017).

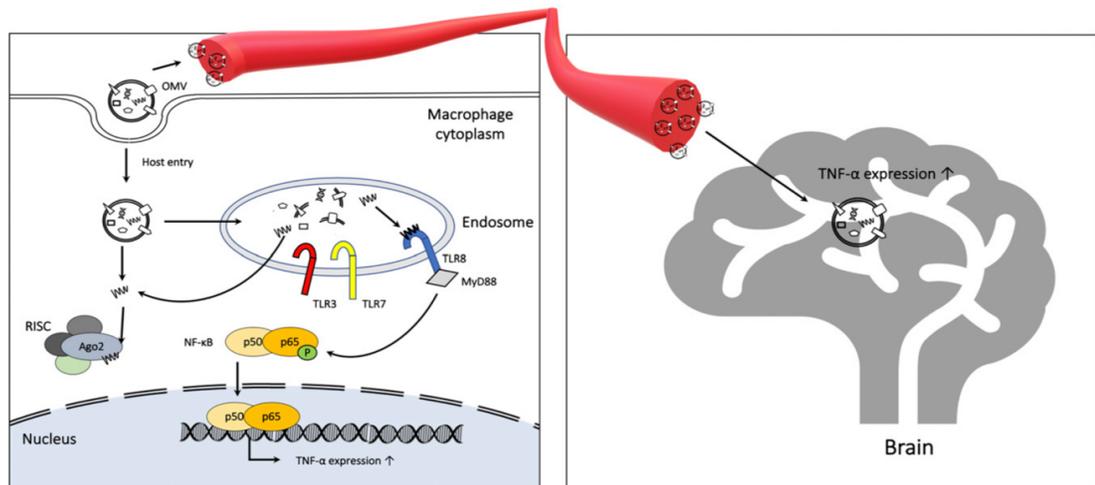
Una vez en la circulación sanguínea, las bacterias pueden inducir una respuesta de fase aguda caracterizada por un aumento en el recuento de linfocitos y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, las cuales podrían ingresar o influir en el funcionamiento del cerebro (Wu y cols, 2017; Ilievski y cols, 2018; Zhang y cols, 2018; Ding y cols, 2018). Aunque la BHE generalmente impide el ingreso de sustancias al cerebro, moléculas como las citoquinas pueden ingresar por medio de capilares de los órganos circumventriculares, usando transportadores específicos de citoquinas, incrementando la permeabilidad de la BHE o mediante transportadores de las células endoteliales del cerebro (Pan y Kastin, 1999; Banks y cols 2002; Perry, 2004). En pacientes afectados de EA, la permeabilidad de la BHE se encuentra alterada y tanto los mediadores pro-inflamatorios generados en el cerebro pueden salir, como los producidos en otros tejidos pueden ingresar. De esta manera, no resulta extraño que pacientes con EA y co-morbilidades tengan una mayor progresión de la enfermedad. Así, tampoco resulta extraño detectar bacterias, hongos o virus en el cerebro de pacientes con EA considerando que la BHE no está cumpliendo su rol protector. A pesar que esta ruptura de la BHE en pacientes afectados de EA carezca aún de una explicación biológica, ésta termina transformándose en un riesgo para una mayor progresión de la enfermedad.

Al analizar si *P. gingivalis* puede ingresar al cerebro de personas que no estén afectadas de EA, los estudios experimentales y algunos estudios descriptivos han demostrado que puede ser posible (Tabla N°5). Las bacteremias producidas por *P. gingivalis* a lo largo de la vida de la persona podrían generar la formación de ateromas. *P. gingivalis* secreta gingipaínas que son capaces de proteolizar receptores CD14 de células inmunes, colágeno tipo I y IV, fibrina, hemoglobina, lamininas, entre muchas proteínas de la matriz (Cardozo y cols, 2015). En efecto, *P. gingivalis* puede ingresar a la capa íntima de las arterias y colonizarlas mediante la acción directa de las gingipaínas (Imamura, 2003). Una vez en la arteria, las células endoteliales responden secretando mediadores pro-inflamatorios que permitirán la migración e ingreso de macrófagos al sitio afectado mediante la secreción de MMP-2 y MMP-9 (Sorsa y cols, 2004; Zhou y Windsor, 2006). De esta manera, el ingreso de *P. gingivalis* y la respuesta pro-inflamatoria inducida ante ella puede generar una respuesta inmuno-inflamatoria que afecte a los astrocitos de la

unidad neurovascular, induciendo su desacople y con ello, la ruptura de la BHE secundaria a la aterogénesis (Singhrao y cols, 2017; Rokad y cols, 2017). Recientemente se demostró que el LPS bacteriano puede ingresar al cerebro unido a lipoproteínas como mecanismo de transporte o mediante sus vesículas de membrana extracelular (Jaeger y cols, 2009; Vargas-Caraveo y cols, 2017; Vutukuri y cols, 2018). En efecto, el DNA de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* podría ingresar al cerebro mediante vesículas de membrana extracelular (Han y cols, 2019). En un estudio se observó que las vesículas de membrana extracelular de *A. actinomycetemcomitans* pueden ser captadas por macrófagos, lo que activa la expresión de TNF- $\alpha$  mediante la vía de señalización TLR-8/NF- $\kappa$ B. Los microRNAs presentes en las vesículas de membrana extracelular pueden unirse al Complejo silenciador inducido por RNA (CISR) del hospedero. También pueden difundir por la BHE, lo que permite que el DNA de las vesículas de membrana extracelular promuevan la neuroinflamación mediante la activación de TNF- $\alpha$  (Han y cols, 2019) (Figura N°3).

**Tabla N°5. Análisis P.I.C.O. de los estudios relacionados con posibles vías de diseminación de bacterias orales hacia el cerebro.** A partir del análisis de la literatura seleccionada en esta sección se resumen los principales hallazgos que se relacionan con la detección de bacterias orales en vasos sanguíneos del hipocampo, tejido cerebral y ganglios del trigémino. No se encontró evidencia que respalde la posible migración de bacterias orales por vía linfática. ApoE: Apolipoproteína E, SCID: ratones afectados de Inmunodeficiencia combinada severa, EA: Enfermedad de Alzheimer, BHE: Barrera hematoencefálica.

Referencia	Población	Intervención	Comparación	Resultados
Singhrao y cols, 2017	Ratones macho ApoE-/- infectados con <i>P. gingivalis</i> .	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones macho ApoE-/- control.	Detección intracerebral de <i>P. gingivalis</i> y de gingipainas en vasos sanguíneos del hipocampo.
Rokad y cols, 2017	Ratones macho ApoE-/- Infectados con <i>P. gingivalis</i> .	Administración oral de <i>P. gingivalis</i> .	Ratones macho ApoE-/- control.	Microvasculatura del hipocampo de ratones ApoE-/- infectados posee niveles elevados de estrés oxidativo, lo que produce pérdida de integridad funcional de la BHE.
Han y cols, 2019	Ratones macho C57BL, de 6 semanas de edad infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	Inyección cardiaca de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	Ratones macho C57BL, de 6 semanas de edad sin infección.	ARN de <i>A. actinomycetemcomitans</i> cruza BHE por medio de vesículas extracelulares.
Riviere y cols, 2002	Tejido cerebral de pacientes afectados de EA.	Detección de <i>Treponema</i> oral.	Tejido cerebral de pacientes sin EA.	Se detectó <i>Treponema</i> oral en ganglios del trigémino, protuberancia, corteza cerebral e hipocampo.
Foschi y cols, 2006	Ratones SCID y <i>wild-type</i> jóvenes infectados con bacterias orales.	Infección intracanal de <i>T. denticola</i> , <i>P. gingivalis</i> y <i>T. forsythia</i> .	Ratones sin infección bacteriana.	Se detectó DNA de <i>T. denticola</i> en el bazo, el corazón y el cerebro de ratones inmunodeficientes y en el bazo de ratones <i>wild-type</i> .



**Figura N°3. Modelo del mecanismo de acción del RNAs de Aa dentro de VME en macrófagos y el cerebro.** VME con microRNAs de *A. actinomycetemcomitans* pueden ser captados por macrófagos y traspasar la BHE. VME: Vesícula de membrana externa, CISR: Complejo silenciador inducido por RNA, BHE: Barrera Hematoencefálica. Fuente: Han y cols (2019).

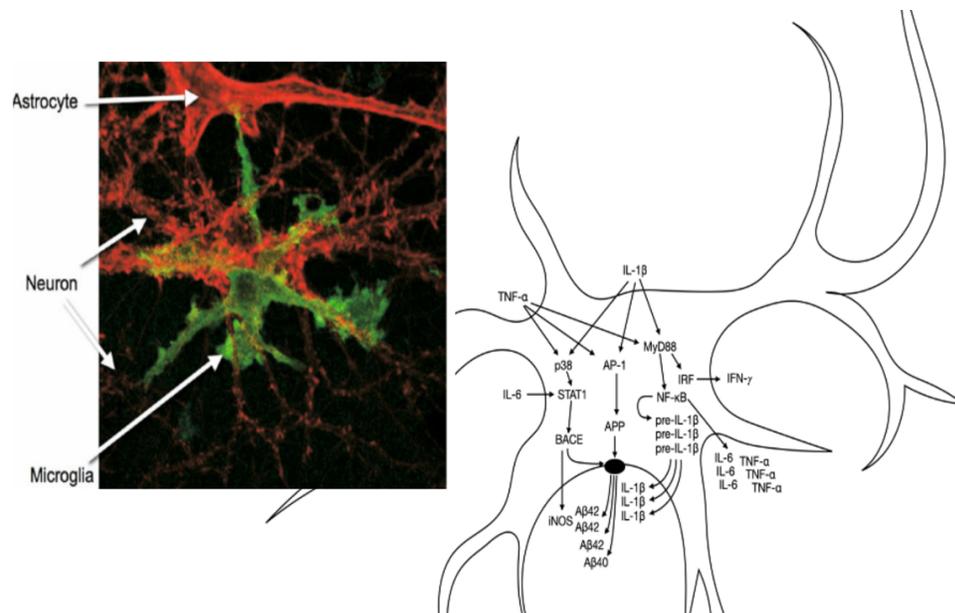
Con relación a la migración por la vía nerviosa de bacterias orales hacia el cerebro, existen antecedentes de espiroquetas no orales como *B. burgdorferi* o *T. pallidum* que se identificaron en los axones de los nervios periféricos y dentro del cerebro de animales experimentales (Sell y Salman, 1992; Cadavid y cols, 2000; Miklossy y cols, 2006). Aunque existe escasa evidencia publicada de que las espiroquetas orales puedan invadir los tejidos nerviosos, *T. denticola* se detectó en el núcleo pontino del nervio trigémino e hipocampo tanto de sujetos que fallecieron por EA como en ratones afectados de lesiones endodónticas (Rupf y cols 2000; Riviere y cols, 2002; Foshi y cols, 2006). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que *T. denticola* ingresa al cerebro utilizando las terminaciones periféricas del nervio trigémino. Aunque el punto de origen no puede determinarse a partir de estos estudios, los resultados sugieren que la mayoría de las *Treponema spp.* tienen la capacidad de invadir el sistema nervioso central y periférico. Además, en modelos experimentales se describe que bacterias que generan disbiosis respiratoria pueden migrar al cerebro mediante el bulbo olfatorio (Sundar y cols, 2020). Las células de la vaina olfativa son una prolongación externa del SNC considerándose parte de él. En efecto, las células de la vaina olfativa fagocitarían a las bacterias o virus, los que podrían migrar hacia el interior del cerebro debido a la gradiente de concentración

de TNF- $\alpha$  (Leung y cols, 2008). Es así que algunos estudios han detectado la presencia de depósitos de A $\beta$  y proteína Tau hiperfosforilada en el bulbo olfatorio, sugiriendo que bacterias respiratorias podrían iniciar los eventos neuroinflamatorios que finalicen en EA (Christen-Zaech y cols, 2003; Wesson y cols, 2010). No obstante, la evidencia sugiere que *T. denticola* puede migrar al cerebro mediante el nervio trigémino, aunque no existen estudios que demuestren esta vía de migración de *T. denticola* u otras bacterias orales.

Con relación a la vía linfática es escasa la evidencia que permita considerarla como una vía de diseminación de bacterias orales hacia el cerebro. Esta hipótesis surge como una alternativa al detectar la presencia de *Treponema* oral en el IV ventrículo cerebral y en el LCE (Riviere y cols, 2002). Anatómicamente, la cavidad oral y el cerebro se encontrarían comunicados mediante el sistema linfático, en particular, el IV ventrículo y los linfonodos de la cavidad oral drenan al linfonodo cervical profundo medio. La pérdida de dientes y la posterior disminución de la eficiencia masticatoria afectaría el retorno venoso y linfático pudiendo facilitar el ingreso de bacterias a la circulación linfática (Nisizaki, 2013; Nedergaard y Goldman, 2020). De esta manera, se acumularía una mayor concentración de mediadores pro-inflamatorios, bacterias y péptidos de A $\beta$  (Arbel-Ornath y cols, 2013; Hawkes y cols, 2011). También se describe que el envejecimiento conduce a una disfunción progresiva de los vasos linfáticos en los tejidos periféricos, así, en ratones viejos se mostró una mayor disminución en el diámetro y la cobertura de los vasos linfáticos meníngeos en comparación con los jóvenes (Nagai y cols, 2011; Louveau y cols, 2017; Da Mesquita y cols, 2018; Farber y cols, 2018). Si bien, no es clara la migración de bacterias desde la cavidad oral hacia el cerebro por vía linfática, la disminución en el flujo de drenaje podría favorecer la permanencia crónica de patógenos a nivel cerebral junto a depósitos A $\beta$ .

### **7.3. Neurobioma: colonización transitoria o persistente.**

Normalmente, las bacterias o sus factores de virulencia pueden ser reconocidos por distintos receptores de superficie de las células inmunes. Así, tanto el LPS como la cápsula de las bacterias Gram-negativas pueden ser reconocidas por los receptores TLR2, TLR4 o CD14 (Elson y cols, 2007; Díaz-Zúñiga y cols, 2015). En el cerebro, las microglías y los astrocitos expresan en su superficie los mismos receptores y poseen la capacidad para responder ante los antígenos bacterianos. Curiosamente, los péptidos de A $\beta$  inducen una respuesta pro-inflamatoria en estas células mediante la estimulación de TLR4 (Minagar y cols, 2002; Miyake, 2003). Inicialmente, las microglías se activan y secretan mayores niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , las que son reconocidas por los astrocitos que responden activando una serie de segundos mensajeros que terminarán en la producción de *APP* y *BACE* (Takeuchi y Akira, 2001; Takeuchi, 2010; Wu y cols, 2017; Ilievski y cols, 2018; Zhang y cols, 2018; Ding y cols, 2018) (Figura N°4). Una citoquina importante en este proceso es IL-17, que en conjunto con las citoquinas mencionadas, induce en las microglías la secreción de MMP-2 y MMP-9. En estas condiciones pro-inflamatorias, IL-17 induce en el astrocito la producción de A $\beta$  y las MMPs, la ruptura de la BHE y de esa manera se perpetúa el ciclo injurioso (Carson y cols, 2007).

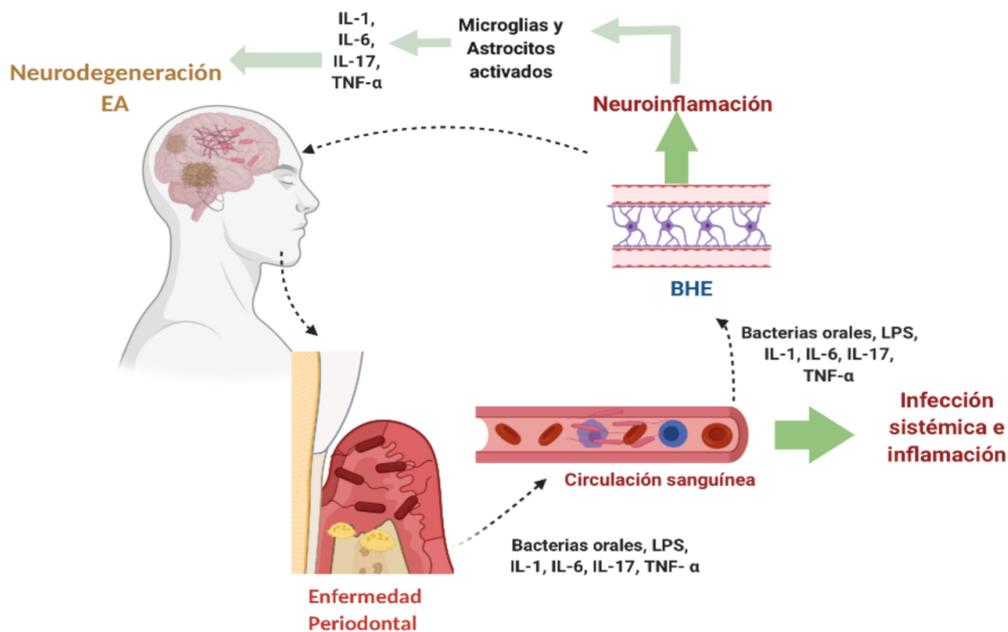


**Figura N°4. Microglia y Astrocito reactivo.** En la inmuno-fluorescencia se muestra una microglia activada posterior a la inyección intracerebral de LPS bacteriano. El esquema gráfico un astrocito reactivo respondiendo ante la presencia de mediadores pro-inflamatorios. IL: Interleuquina, TNF: Factor de Necrosis Tumoral, BACE:  $\beta$ -secretasa, APP: proteína precursora de amiloide, iNOS: Óxido nítrico sintasa inducida. Fuente: Carson y cols (2007).

De forma similar a como sucede con los péptidos de  $A\beta$ , las bacterias podrían generar los mismos eventos moleculares en las células cerebrales. El LPS bacteriano se asocia con la proteína de unión a LPS (del inglés *LPS binding protein*, LPB), y este complejo es reconocido por el receptor CD14 y TLR4/MD-2 presente en las microglia (Minagar y cols, 2002; Miyake, 2003). Las microglia se activan y secretan las citoquinas pro-inflamatorias con el objetivo de eliminar al agente infeccioso. Durante este proceso, las microglia secretan IL-17, lo que estimula al astrocito reactivo a que produzca  $A\beta$ . Se ha propuesto que el péptido  $A\beta$  podría actuar como un péptido antimicrobiano, enucleando al microorganismo infectante y facilitando su reconocimiento y posterior fagocitosis (Kumar y cols, 2016; Bourgade y cols, 2016; Gosztyla y cols, 2018; Eimer y cols, 2018). Sin embargo, tal como fue mencionado anteriormente, *P. gingivalis* es una bacteria que secreta gingipaínas, las que demostraron ser capaces de degradar  $A\beta$  e insolubilizarlo (Dominy y cols, 2019). En efecto, una vez en el cerebro, *P. gingivalis* podría ser rodeada de péptido de  $A\beta$ , utilizándolo como matriz para adherirse y como fuente de nutrientes para su

metabolismo. Luego, la Apolipoproteína E —principal transportador lipídico a cargo del *clearance* del cerebro— rodea este complejo de péptido A $\beta$ -bacteria para facilitar su fagocitosis microglial, pero al encontrarse degradado o insolubilizado se acumula alrededor de la bacteria (Luo y cols, 2010; Sochocka y cols, 2017; Pritchard y cols, 2017; Lopresti y cols, 2020; Gillet y cols, 2020). Recientemente, a partir de muestras de cerebros de pacientes que fallecieron o no con EA se identificó que en el núcleo de las placas seniles existían distintos micro-organismos, lo que sugiere que bacterias pueden migrar a lo largo de toda la vida del individuo, colonizar y establecer una microbiota caracterizada por un alto contenido localizado de péptido de A $\beta$  y no desencadenar EA (Pisa y cols, 2017). Surge entonces la hipótesis infecciosa de la neuroinflamación y de la susceptibilidad microbiológica de la EA (Ashraf y cols, 2019). Nuestro grupo de investigación logró demostrar mediante qPCR e inmunofluorescencia que en un modelo de periodontitis experimental, tanto los serotipos patogénicos como no patogénicos de *P. gingivalis* pueden migrar al cerebro e inducir distintas respuestas inmunes, algunas que generan deterioro cognitivo y otras que no (Díaz-Zúñiga y cols, 2020). Finalmente, la colonización cerebral de microorganismos en el cerebro ha recibido el nombre de neurobioma; sin embargo, aún quedan preguntas por resolver mediante modelos experimentales (Figura N°5).

En términos generales, existe evidencia que sustenta la presencia no solo de bacterias orales, sino también, de virus, bacterias respiratorias o intestinales y hongos en el cerebro. Así, las bacterias orales podrían ser detectadas en el cerebro en distintas etapas o condiciones de la vida del hospedero y, su efecto benéfico o patogénico, dependerá de su virulencia y de la susceptibilidad del hospedero para desarrollar una respuesta inmune ante éstas. Por lo tanto, la presente revisión logra demostrar la importancia del eje cavidad oral/cerebro y que se debe considerar el efecto de bacterias orales en el inicio o progresión de la EA.



**Figura N°5. Neurobioma: relación entre la enfermedad periodontal y la EA.** Las bacterias periodontales pueden promover la secreción de interleucinas como IL-1, IL-6, IL17 y TNF- $\alpha$ . Es posible que la secreción de citocinas implique una infección e inflamación sistémica que modifique el entorno cerebral protegido, provocando la activación de la microglía y neuroinflamación. EA: Enfermedad de alzheimer, BHE: Barrera hematoencefálica, LPS: Lipopolisacárido. Fuente: Elaboración propia.

#### 7.4. Heterogeneidad de los estudios.

Los estudios analizados en esta revisión sistemática de tipo cualitativa se caracterizaron por ser heterogéneos, por lo tanto, no se realizó análisis estadístico a los datos.

En los estudios experimentales en animales, la heterogeneidad metodológica se relacionó con los diferentes tipos de experimentos, la forma de inducir periodontitis, el tiempo y la duración de las infecciones, además del tipo de cepa bacteriana utilizada. En relación a la inducción de la periodontitis, los autores mencionaron que fue realizada, por administración oral (Poole y cols, 2015; Singhrao y cols, 2017; Ishida y cols, 2017; Rokad y cols, 2017; Iliovski y cols, 2018; Dominy y cols, 2019), sonda oral (Ding y cols, 2018), inyección en corteza somatosensorial (Lui y cols, 2017), inyección intravenosa (Wu y cols, 2017), inyección intraperitoneal (Zhang y cols, 2018), inyección cardiaca (Han y cols, 2019)

o inoculación palatina (Díaz-Zúñiga y cols, 2020); sin embargo, no especificaron mayor información. Además, cabe mencionar que en un estudio no se realizó inducción de periodontitis, si no que una lesión periapical; dicho estudio fue incorporado a la revisión sistemática, ya que analiza periodonto-patógenos y su migración a nivel cerebral (Foschi y cols, 2006). En cuanto al tiempo informado de recolección de muestras después de la infección también se encontraron diferencias y el tipo de cepa bacteriana utilizada fue diversa en los estudios: los patógenos mencionados fueron los siguientes *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *Fusobacterium spp* y *A. actinomycetemcomitans*.

Además, solo algunos estudios informaron explícitamente las estimaciones del tamaño de los efectos de la infección bacteriana con medidas de variabilidad, como la desviación estándar (Foschi y cols, 2006; Ishida y cols, 2017; Rokad y cols, 2017; Han y cols, 2019; Díaz-Zúñiga y cols, 2020) o error estándar de la media (Wu y cols, 2017; Ding y cols, 2018; Zhang y cols, 2018) y los valores de *p-value* se informaron con frecuencia. Es importante mencionar que al no informarse estimaciones en algunos estudios, el significado exacto de los valores *p-value* podría malinterpretarse fácilmente con respecto a lo que realmente significa.

En los estudios observacionales la heterogeneidad metodológica se basó en las características de la población de la investigación, las muestras evaluadas de los pacientes que podían corresponder a tejido cerebral *post-mortem*, suero, FGC o LCE, las diferentes cepas bacterianas o sus factores de virulencia (LPS y gingipaínas) estudiadas y las diferentes herramientas o pruebas para evaluar nivel cognitivo. En relación a las características de la población, en todos los estudios los pacientes presentaban EA y los controles generalmente eran sanos o presentaban otros tipos de demencia (Laugisch y cols, 2018), sin embargo, el rango de edad de los pacientes seleccionados fue diferente en cada estudio. También en algunos estudios se evaluó el estado periodontal de los pacientes, utilizando diferentes criterios tales como los proporcionados por el centro para el control de enfermedades y la academia americana de periodoncia (CDC/AAP) (Eke y cols, 2012) o por la actual clasificación y definición de caso de periodontitis de Tonetti y cols (2018). En cuanto a las muestras, 5 estudios se basaron en el análisis de tejido cerebral *post-mortem* (Riviere y cols, 2002; Poole y cols, 2013; Emery y cols, 2017;

Dominy y cols, 2019; Siddiqui y cols; 2019) y los demás en suero, FGC, LCE o plasma (Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Noble y cols, 2014; Ide y cols, 2016; Laugisch y cols, 2018; Leblhuber y cols, 2020). En relación a la evaluación cognitiva de los pacientes, ésta se realizó mediante diferentes métodos en los estudios, tales como: un mini examen del estado mental (MMSE), una prueba de dibujo del reloj (CDT) o una escala de evaluación cognitiva de la EA (ADAS-cog), herramientas que miden distintas formas de deterioro cognitivo y no son conducentes al diagnóstico de EA *per se*.

### **7.5. Análisis del riesgo de sesgo**

La evaluación del riesgo de sesgo de los estudios *in vivo* en animales se calificó generalmente como "Poco claro", debido a la falta o ausencia de información. Por ejemplo, en los dominios nº 1 y 3 de la herramienta SYRCLE, en ningún estudio se mencionó explícitamente algún método de asignación al azar y no se describió a ninguna persona a cargo de la asignación aleatoria de animales a los grupos de intervención. La mayoría de las calificaciones de "Poco claro" estaban relacionadas con los ítems del SYRCLE que evaluaban la aleatorización antes de la intervención o durante la evaluación de resultados. Estos hallazgos reconocen un importante "sesgo de información". Cabe mencionar que varias pautas para estudios con animales, como SYRCLE, consignan qué factores podrían influir en los resultados. Tanto el estrés producido por la exposición a la luz dentro de las jaulas como un aumento de la temperatura, serían capaces de generar cambios en el metabolismo o farmacodinamia en los animales (Hooijmans y cols, 2014). Por lo tanto, se debe prestar atención especial a las instalaciones de alojamiento de animales, la manipulación del personal y los protocolos de aleatorización, que podrían ayudar a evitar sesgos en los estudios.

La evaluación del riesgo de sesgo de los estudios observacionales en humanos, por medio de la herramienta Newcastle-Ottawa se calificaron generalmente con calidad moderada. En la sección de selección la mayoría de los estudios cumplieron los 4 ítem, lo que indica que la elección de los grupos fue generalmente adecuada. En relación a la sección de comparación solo un estudio no considero la edad o el sexo de los pacientes con EA (Dominy y cols, 2019), sin

embargo, casi la totalidad de los estudios no evaluaron otros factores de riesgo adicionales, debido a ello podría existir “sesgo de confusión”. En cuanto a la sección de exposición o de resultados, 4 de los 11 estudios no mencionaron en su metodología el cegamiento de los profesionales a cargo del registro de los resultados (Riviere y cols, 2002; Poole y cols, 2013; Emery y cols, 2017; Siddiqui y cols, 2019), lo cual significa que podrían presentar riesgo de “sesgo de información”. Por otra parte, cabe mencionar que en 9 de los 11 estudios no se perdieron pacientes de los estudios durante el seguimiento o los sujetos perdidos fueron menor o igual al 20% (Riviere y cols, 2002; Kamer y cols, 2009; Sparks y cols, 2012; Poole y cols, 2013; Noble y cols, 2014; Emery y cols, 2017; Laugisch y cols, 2018; Siddiqui y cols, 2019; Dominy y cols, 2019), por lo que es poco probable que induzca sesgo. Si bien la calidad de los estudios tuvo una tendencia a ser moderada es importante tener en consideración que algunas de estas investigaciones no están libres de presentar algún tipo de sesgo.

Los informes deficientes de las estimaciones y el riesgo de sesgo presentes en algunos estudios tanto *in vivo* como observacionales, indican la necesidad de una interpretación cautelosa de los resultados. Seguir pautas para estudios en animales u observacionales como SYRCLE o Newcastle-Ottawa en futuras investigaciones podrían ayudar a disminuir el riesgo de sesgo y homogeneizar los estudios permitiendo una evaluación y síntesis adecuadas de los resultados.

## 8. CONCLUSIONES

1. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *T. denticola* se detectan en cerebros tanto de roedores como de humanos, en presencia o ausencia de periodontitis.
2. Los estudios han demostrado la presencia de los factores de virulencia de *P. gingivalis* en el hipocampo, IV ventrículo y LCE, en pacientes con y sin EA, lo que sugiere que independiente del estado cognitivo, bacterias orales pueden migrar al cerebro.
3. Existe evidencia que sugiere la existencia del eje *cavidad oral/cerebro*, el cual se define como la comunicación de los tejidos orales con el cerebro, mediante la inervación de los tejidos o las circulaciones sanguíneas o linfáticas. Así, las bacterias orales podrían migrar al cerebro siguiendo la ruta nerviosa o vascular.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbayya, K., Puthanakar, N. Y., Naduwinmani, S. y Chidambar, Y. S. (2015). Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North American journal of medical sciences*, 7(6), 241–246.
- Abe, T. y Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*, 394(1-2), 49–54.
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A. y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Journal of the International Society for Microbial Ecology* 7(5), 1016-1025.
- Alarcón, P., González, M. y Castro, É. (2016). Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista médica de Chile*, 144(7), 910-916.
- Arbel-Ormath, M., Hudry, E., Eikermann-Haerter K. Hou, S., Gregory, J. L. y cols. (2013). Interstitial fluid drainage is impaired in ischemic stroke and Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathologica*, 126(3):353-364.
- Ashraf, G.M, Tarasov, V. V, Makhmutova, A. Chubarev, V. N., Avila-Rodriguez, M. y cols. (2019). The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. *Molecular Neurobiology*, 56(6):4479-4491.
- Banks, W. A., Farr, S. A. y Morley, J. E. (2002). Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation*, 10(6), 319–327.
- Bogaert, D., Keijsers, B., Huse, S., Rossen, J., Veenhoven, R. y cols. (2011). Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *Public Library of Science one*, 6(2).
- Bourgade, K., Le Page, A., Bocti, C., Witkowski, J. M., Dupuis, G. y cols. (2016). Protective Effect of Amyloid- $\beta$  Peptides Against Herpes Simplex Virus-1 Infection in a Neuronal Cell Culture Model. *Journal of Alzheimer's disease*, 50(4), 1227–1241.
- Cadavid, D., O'Neill, T., Schaefer, H. y Pachner, A. R. (2000). Localization of *Borrelia burgdorferi* in the nervous system and other organs in a nonhuman primate model of Lyme disease. *Laboratory investigation*, 80(7), 1043-1054.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M. y Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26191.
- Cardozo, M. O., Gil, M. A. P., Morales, Y. P. S., Guarín, E. M. y Henao, V. F. (2015). *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *Revista Corporación para estudios en la salud Odontología*, 28(1), 57-73.
- Carson, M. J., Thrash, J. C. y Lo, D. (2004). Analysis of microglial gene expression: identifying targets for CNS neurodegenerative and autoimmune disease. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice*, 4(5), 321–330.
- Carson, M. J., Bilousova, T. V., Puntambekar, S. S., Melchior, B., Doose, J. M. y cols. (2007). A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 4(4), 571–579.
- Christen-Zaech, S., Kraftsik, R., Pilleveit, O., Kiraly, M., Martins, R. y cols. (2003). Early olfactory involvement in Alzheimer's disease. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 30(1), 20-25.
- Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. y Sanz, Y. (2008). Imbalances in faecal and duodenal *Bifidobacterium* species composition in active and non-active coeliac disease. *BioMed Central microbiology*, 8, 232.
- DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A. y Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory bowel diseases*, 22(5), 1137-1150.

- Da Mesquita, S., Louveau, A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison, R. C. y cols. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717), 185–191.
- De Molon, R. S., Mascarenhas, V. I., de Avila, E. D., Finoti, L. S., Toffoli, G. B. y cols. (2016). Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clinical oral investigations*, 20(6), 1203–1216.
- De Steenhuijsen Piters, W. A., Huijskens, E. G., Wyllie, A. L., Biesbroek, G., Van Den Bergh, M. R. y cols. (2016). Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 10(1), 97-108.
- Depner, M., Ege, M. J., Cox, M. J., Dwyer, S., Walker, A. W. y cols. (2017). Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(3), 826-834.
- Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M. y cols. (2014). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of clinical periodontology*, 41(3), 242-251.
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A. y cols. (2015). Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *Journal of periodontology*, 86(1), 108-119.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Rojas, L., Alvarez, C., Monasterio, G. y cols. (2017). Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease. *Journal of periodontal research*, 52(5), 893-902.
- Díaz-Zúñiga, J., Muñoz, Y., Melgar-Rodríguez, S., More, J., Bruna, B. y cols. (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-Unión, M., Villalobos-Orchard, F. y cols. (2020). Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Frontiers in immunology*, 11, 588036.
- Ding, Y., Ren, J., Yu, H., Yu, W. y Zhou, Y. (2018). *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity & ageing : I & A*, 15, 6.
- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A. y cols. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science advances*, 5(1), eaau3333.
- Eimer, W. A., Vijaya Kumar, D. K., Navalpur Shanmugam, . K., Rodriguez, A. S., Mitchell, T. A. y cols. (2018). Alzheimer's Disease-Associated  $\beta$ -Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron*, 99(1), 56–63.e3.
- Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G., y Genco, R. J. (2012). Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*, 83(12), 1449–1454.
- Elson, G., Dunn-Siegrist, I., Daubeuf, B. y Pugin, J. (2007). Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood*, 109(4), 1574-1583.
- Emery, D. C., Shoemark, D. K., Batstone, T. E., Waterfall, C. M., Coghill, J. A. y cols. (2017). 16S rRNA Next Generation Sequencing Analysis Shows Bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 195.
- Eriksson, L., Lif Holgersson, P., Esberg, A. y Johansson, I. (2018). Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *Journal of dental research*, 97(3), 275-282.

- Espinoza, J. L., Harkins, D. M., Torralba, M., Gomez, A., Highlander, S. K. y cols. (2018). Supragingival plaque microbiome ecology and functional potential in the context of health and disease. *MBio*, 9(6), e01631-18.
- Farber, E., Raper, D., Viar, K. E., Powell, R. D., Baker, W. y cols. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717), 185–191.
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M. y Holmstrup, P. (2006). Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *Journal of clinical periodontology*, 33(6), 401–407.
- Foschi, F., Izzard, J., Sasaki, H., Sambri, V., Prati, C. y cols. (2006). *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *Journal of dental research*, 85(8), 761–765.
- Galvão, M. P. D. A., Chapper, A., Rösing, C. K., Ferreira, M. B. C. y Souza, M. A. L. D. (2003). Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17(1), 56-62.
- Garlet, G. P., Avila-Campos, M. J., Milanezi, C. M., Ferreira, B. R. y Silva, J. S. (2005). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes and infection*, 7(4), 738–747.
- Garlet G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*, 89(12), 1349–1363.
- Gillet, J. N. (2020). Alzheimer's disease: unraveling APOE4 binding to amyloid-beta peptide and lipids with molecular dynamics and quantum mechanics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-7.
- Gosztyla, M. L., Brothers, H. M. y Robinson, S. R. (2018). Alzheimer's Amyloid- $\beta$  is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *Journal of Alzheimer's disease*, 62(4), 1495–1506.
- Hajishengallis, G. y Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409–419.
- 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.
- Han, E. C., Choi, S. Y., Lee, Y., Park, J. W., Hong, S. H. y cols. (2019). Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF- $\alpha$  production in human macrophages and cross the blood-brain barrier in mice. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(12), 13412-13422.
- Hammond, C. J., Hallock, L. R., Howanski, R. J., Appelt, D. M., Little, C. S. y cols. (2010). Immunohistological detection of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's disease brain. *BioMed Central Neuroscience* 11, 121.
- Hasturk, H., Goguet-Surmenian, E., Blackwood, A., Andry, C. y Kantarci, A. (2009). 1-Tetradecanol Complex: Therapeutic Actions in Experimental Periodontitis. *Journal of periodontology*, 80(7), 1103-1113.
- Hawkes, C. A., Härtig, W., Kacza, J., Schliebs, R., Weller, R. O. y cols. (2011). Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta neuropathologica*, 121(4), 431–443.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A. y cols. (2008). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of clinical periodontology*, 35(2), 106-113.
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A. y cols. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *Public Library of Science one*, 5(1), e8578.

- Higgins, J. P., Altman, D. G., Gøtzsche, P. C., Jüni, P., Moher, D. y cols. (2011). The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *British Medical Journal*, 343, d5928.
- Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., de Vries, R. B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M. y cols. (2014). SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BioMed Central medical research methodology*, 14, 43.
- Huong, P. L. T., Hien, P. T., Lan, N. T. P., Binh, T. Q., Tuan, D. M. y cols. (2014). First report on prevalence and risk factors of severe atypical pneumonia in Vietnamese children aged 1–15 years. *BioMed Central public health*, 14(1), 1304.
- Ide, M., Harris, M., Stevens, A., Sussams, R., Hopkins, V. y cols. (2016). Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Public Library of Science one*, 11(3), e0151081.
- Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E. y cols. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *Public Library of Science One*, 13(10), e0204941.
- Illiff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W. y cols. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Science translational medicine*, 4(147), 147ra111.
- Imamura T. (2003). The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*, 74(1), 111–118.
- Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y. y cols. (2017). Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 3, 15.
- Ishikawa, M., Yoshida, K., Okamura, H., Ochiai, K., Takamura, H. y cols. (2013). Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2035-2043.
- Jaeger, L. B., Dohgu, S., Sultana, R., Lynch, J. L., Owen, J. B. y cols. (2009). Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain, behavior, and immunity*, 23(4), 507–517.
- Kantarci, A., Hasturk, H. y Van Dyke, T. E. (2015). Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology 2000*, 68(1), 66-82.
- Kamer, A. R., Craig, R. G., Pirraglia, E., Dasanayake, A. P., Norman, R. G. y cols. (2009). TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *Journal of neuroimmunology*, 216(1-2), 92–97.
- Katz J., Chegini N., Shiverick K.T. y Lamont R.J. Localization of P. gingivalis in preterm delivery placenta. (2009). *Journal of dental research*, 88(6):575-578.
- Kho, Z. Y. y Lal, S. K. (2018). The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in microbiology*, 9, 1835.
- Kumar, D. K., Choi, S. H., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S. y cols. (2016). Amyloid- $\beta$  peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science translational medicine*, 8(340), 340ra72.
- Laugisch, O., Johnen, A., Maldonado, A., Ehmke, B., Bürgin, W. y cols. (2018). Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 66(1), 105–114.
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, E. J., y Sánchez Castañeda, N. (2014). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana de Pediatría*, 86(4), 502-513.
- Leblhuber, F., Huemer, J., Steiner, K., Gostner, J. M. y Fuchs, D. (2020). Knock-on effect of periodontitis to the pathogenesis of Alzheimer's disease?. *Wiener klinische Wochenschrift*, 1-6.

- Leung, J. Y. K., Chapman, J. A., Harris, J. A., Hale, D., Chung, R. S. y cols. (2008). Olfactory ensheathing cells are attracted to, and can endocytose, bacteria. *Cellular and molecular life sciences*, 65(17), 2732.
- Li, N. y Collyer, C. A. (2011). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - Complex domain structures confer diverse functions. *European journal of microbiology & immunology*, 1(1), 41–58.
- Li, X., Kolltveit, K. M., Tronstad, L. y Olsen, I. (2000). Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 547–558.
- Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B. y Marinello, C. (1992). Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clinical oral implants research*, 3(1), 9–16.
- Liu, Y., Wu, Z., Nakanishi, Y., Ni, J., Hayashi, Y. y cols. (2017). Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. *Scientific reports*, 7(1), 11759.
- Loesche, W. J. y Lopatin, D. E. (1998). Interactions between periodontal disease, medical diseases and immunity in the older individual. *Periodontology 2000*, 16, 80–105.
- Lopresti, B. J., Campbell, E. M., Yu, Z., Anderson, S. J., Cohen, A. D. y cols (2020). Influence of apolipoprotein-E genotype on brain amyloid load and longitudinal trajectories. *Neurobiology of aging*, 94, 111–120.
- Loos B.G. (2005). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *Journal of periodontology*, 76(11 Suppl), 2106–2115.
- Louveau, A., Plog, B. A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M. y cols (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *The Journal of clinical investigation*, 127(9), 3210–3219.
- Luo, J., Maréchal, J. D., Wärmländer, S., Gräslund, A., y Perálvarez-Marín, A. (2010). In silico analysis of the apolipoprotein E and the amyloid beta peptide interaction: misfolding induced by frustration of the salt bridge network. *Public Library of Science computational biology*, 6(2), e1000663.
- Mahendra, J., Mahendra, L., Kurian, V. M., Jaishankar, K. y Mythilli, R. (2009). Prevalence of periodontal pathogens in coronary atherosclerotic plaque of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, 8(2), 108-113.
- Marakoglu, I., Gursoy, U. K., Marakoglu, K., Cakmak, H. y Ataoglu, T. (2008). Periodontitis as a risk factor for preterm low birth weight. *Yonsei medical journal*, 49(2), 200–203.
- Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G. y cols. (2016). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular oral microbiology*, 31(2), 162-174.
- Miklossy, J., Kis, A., Radenovic, A., Miller, L., Forro, L. y cols. (2006). Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiology of aging*, 27(2), 228-236.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. y cols. (2002). The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 202(1-2), 13-23.
- Miyake K. (2003). Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *International immunopharmacology*, 3(1), 119–128.
- Monasterio, G., Castillo, F., Ibarra, J. P., Guevara, J., Rojas, L. y cols. (2018a). Alveolar bone resorption and Th1/Th17-associated immune response triggered during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis are serotype-dependent. *Journal of periodontology*, 89(10), 1249-1261.
- Monasterio, G., Castillo, F., Rojas, L., Cafferata, E. A., Alvarez, C. y cols. (2018b). Th1/Th17/Th22 immune response and their association with joint pain, immunological bone loss, RANKL expression

and osteoclast activity in temporomandibular joint osteoarthritis: a preliminary report. *Journal of oral rehabilitation*, 45(8), 589-597.

Morales, P., Brignardello, J. y Gotteland, M. (2010). La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Revista médica de Chile*, 138(8), 1020-1027.

Mougeot, J. C., Stevens, C. B., Paster, B. J., Brennan, M. T., Lockhart, P. B. y cols. (2017). Porphyromonas gingivalis is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. *Journal of oral microbiology*, 9(1), 1281562.

Nakamura, H., Fukusaki, Y., Yoshimura, A., Shiraishi, C., Kishimoto, M. y cols. (2008). Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. *Oral microbiology and immunology*, 23(3), 190-195.

Nagai, T., Bridenbaugh, E. A. y Gashev, A. A. (2011). Aging-associated alterations in contractility of rat mesenteric lymphatic vessels. *Microcirculation*, 18(6), 463-473.

Nedergaard, M. y Goldman, S. A. (2020). Glymphatic failure as a final common pathway to dementia. *Science*, 370(6512), 50-56.

Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membré, J. M., Lederman, E. y cols. (2002). Changes in the bac (2002). Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*, 97(4), 939-946.

Nisizaki, S. (2013). Funciones de la masticación en el adulto mayor: su rol protagónico dentro de las funciones bucales. *Actas odontológicas*, 4-11.

Noble, J. M., Scarneas, N., Celenti, R. S., Elkind, M. S., Wright, C. B. y cols. (2014). Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident Alzheimer disease. *Public Library of Science one*, 9(12), e114959.

Ohkusa, T., Sato, N., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M. y cols. (2002). Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 17(8), 849-853.

Ossola, C. A., Surkin, P. N., Pugnali, A., Mohn, C. E., Elverdin, J. C y cols. (2012). Long-term treatment with methanandamide attenuates LPS-induced periodontitis in rats. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, 61(9), 941-948.

Pan, W. y Kastin, A. J. (1999). Penetration of neurotrophins and cytokines across the blood-brain/blood-spinal cord barrier. *Advanced drug delivery reviews*, 36(2-3), 291-298.

Perry V. H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, behavior, and immunity*, 18(5), 407-413.

Petersen, C. y Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024-1033.

Pisa, D., Alonso, R., Fernández-Fernández, A. M., Rábano, A. y Carrasco, L. (2017). Polymicrobial Infections In Brain Tissue From Alzheimer's Disease Patients. *Scientific reports*, 7(1), 5559.

Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A. y Crean, S. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(4), 665-677.

Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I. y cols. (2015). Active invasion of Porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in ApoE-/- mice brains. *Journal of Alzheimer's disease*, 43(1), 67-80.

Pritchard, A. B., Crean, S., Olsen, I. y Singhrao, S. K. (2017). Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 336.

Riviere, G. R., Riviere, K. H., y Smith, K. S. (2002). Molecular and immunological evidence of oral Treponema in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral microbiology and immunology*, 17(2):113-118.

- Rokad, F., Moseley, R., Hardy, R. S., Chukkapalli, S., Crean, S. y cols. (2017). Cerebral Oxidative Stress and Microvasculature Defects in TNF- $\alpha$  Expressing Transgenic and Porphyromonas gingivalis-Infected ApoE-/-Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(2), 359-369.
- Rupf, S., Kannengiesser, S., Merte, K., Pfister, W., Sigusch, B. y cols. (2000). Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endodontics & dental traumatology*, 16(6), 269-275.
- Shamseer, L., Moher, D., Clarke, M., Gherzi, D., Liberati, A. y cols. (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *British Medical Journal*, 350, g7647.
- Siddiqui, H., Eribe, E. R., Singhrao, S. K., y Olsen, I. (2019). High Throughput Sequencing Detect Gingivitis and Periodontal Oral Bacteria in Alzheimer's Disease Autopsy Brains. *Journal of Neuroscience Research*, 1(3).
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J. y cols. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329-355.
- Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Poole, S., Velsko, I., Crean, S. J. y cols. (2017). Chronic Porphyromonas gingivalis infection accelerates the occurrence of age-related granules in ApoE-/-mice brains. *Journal of oral microbiology*, 9(1), 1270602.
- Sell, S. y Salman, J. (1992). Demonstration of Treponema pallidum in axons of cutaneous nerves in experimental chancres of rabbits. *Sexually transmitted diseases*, 19(1), 1-6.
- Sochocka, M., Zwolińska, K. y Leszek, J. (2017). The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Current neuropharmacology*, 15(7), 996-1009.
- Song, J., Wu, C., Korpos, E., Zhang, X., Agrawal, S. M. y cols. (2015). Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. *Cell reports*, 10(7), 1040-1054.
- Sorsa, T., Tjäderhane, L. y Salo, T. (2004). Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral diseases*, 10(6), 311-318.
- Sparks Stein, P., Steffen, M. J., Smith, C., Jicha, G., Ebersole, J. L. y cols. (2012). Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 8(3), 196-203.
- Spitzer, P., Condic, M., Herrmann, M., Oberstein, T. J., Scharin-Mehlmann, M., y cols. (2016). Amyloidogenic amyloid- $\beta$ -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity. *Scientific reports*, 6, 32228.
- Storrer, C. M., Aun, J. C., Pustiglioni, F. E. y Romito, G. A. (2010). Periodontal disease induced by Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum in Wistar rats. *Arquivos em Odontologia*, 46(4).
- Sundar, S., Battistoni, C., McNulty, R. y cols. (2020) An agent-based model to investigate microbial initiation of Alzheimer's via the olfactory system. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 17, 5.
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., y Wilson, D. A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(2), 505-514.
- Takeuchi, O. y Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International immunopharmacology*, 1(4), 625-635.
- Takeuchi, H. (2010). Neurotoxicity by microglia: mechanisms and potential therapeutic strategy. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 1(1), 12-21.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., y Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S149-S161.

- Vargas-Caraveo, A., Sayd, A., Maus, S. R., Caso, J. R., Madrigal, J. y cols. (2017). Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Scientific reports*, 7(1), 13113.
- Vernal, R., León, R., Silva, A., van Winkelhoff A. J. y Garcia-Sanz J.A. (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., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., y Garcia-Sanz, J. A. (2014). Distinct human T-lymphocyte responses triggered by Porphyromonas gingivalis capsular serotypes. *Journal of clinical periodontology*, 41(1), 19-30.
- Vutukuri, R., Brunkhorst, R., Kestner, R. I., Hansen, L., Bouzas, N. F. y cols (2018). Alteration of sphingolipid metabolism as a putative mechanism underlying LPS-induced BBB disruption. *Journal of neurochemistry*, 144(2), 172–185.
- Wagner K, Springer B, Imkamp F, Opota O, Greub G. y cols. (2018). *International journal of medical microbiology: IJMM*, 308(3), 317–323.
- Wells, G., Shea, B., O'Connell, D., Peterson, J., Welch, V. y cols. (2014). Newcastle-Ottawa quality assessment scale cohort studies. 2015-11-19]. [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp).
- Wilhelm, S. M., Brubaker, C. M., Varcak, E. A., y Kale-Pradhan, P. B. (2008). Effectiveness of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *Pharmacotherapy*, 28(4), 496–505.
- Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F. y cols. (2017). Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis in mice. *Brain, behavior, and immunity*, 65, 350-361.
- Zhan, X., Stamova, B., Jin, L. W., DeCarli, C., Phinney, B. y cols. (2016). Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*, 87(22), 2324–2332.
- Zhang, J., Yu, C., Zhang, X., Chen, H., Dong, J. y cols. (2018). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 37.
- Zhou, J. y Windsor, L. J. (2006). Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *Journal of periodontal research*, 41(1), 47–54.