



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGIA
CONSERVADORA
ÁREA DE PERIODONCIA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

**“EFECTO DE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR ORAL
GAVAGE EN LA BARRERA INTESTINAL”**

Fernanda Loreto Torres Hein

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Jaime Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Samanta Melgar Rodríguez
Dra. Jamileth More de la Cruz

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2021-2023, RDP-IADR 2023-2025 y DIUDA
Regular 22433
Santiago - Chile
2023



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA
CONSERVADORA
ÁREA DE PERIODONCIA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

**“EFECTO DE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR ORAL
GAVAGE EN LA DISBIOSIS INTESTINAL”**

Fernanda Loreto Torres Hein

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Jaime Díaz Zúñiga

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Samanta Melgar Rodríguez
Dra. Jamieth More de la Cruz

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2021-2023, RDP-IADR 2023-2025 y DIUDA
Regular 22433
Santiago - Chile
2023

DEDICATORIA

A mis padres Catalina y Álvaro, les dedico este logro con profundo agradecimiento por su apoyo y amor incondicional y desmedido. A ustedes, mis guías y fuente de inspiración, les entrego este logro con todo mi amor y reconocimiento. Sin ustedes esto no sería posible.

A mis abuelos Marcela, Loreto y Adrián, quienes desde el primer día creyeron en mí. Su cariño, único y especial como solo abuelos como ustedes saben dar, fue fundamental en este proceso.

A mi querido tata Mito, sé que me observas desde arriba. Siempre te llevo en mi mente, recordándote con profundo cariño. Esta mención honrosa es para ti, por ser mi primer paciente, por estar orgulloso de mi hasta el último día.

A Leonardo, que aunque no tenía la obligación, eligió estar a mi lado brindándome amor, preocupación y paciencia en cada paso del camino.

A mis hermanas Antonia, Magdalena y Josefa, mis pequeñas fuentes de alegría y distracción. En medio de días intensos y desafíos, fueron mis rayitos de sol. Aunque tal vez son muy pequeñas para comprender completamente este logro, quiero que sepan que cada esfuerzo ha sido inspirado por ustedes. Han sido mi recordatorio constante de la verdadera importancia y belleza de la vida.

A Alfredo, por su constante apoyo en este proceso, su amor incondicional y palabras alentadoras que se convirtieron en el impulso necesario para superar mis límites, llevándome más allá de lo que creía posible. Mi compañero de triunfos, desafíos, tristeza y felicidad, gracias por compartir este viaje conmigo.

A mis eternas amigas del colegio, que siempre tuvieron una palabra de ánimo y consuelo. Fueron mi inyección de energía en todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sinceros agradecimientos para el Dr. Jaime Díaz Zúñiga por compartir sus conocimientos, por su constante guía, apoyo, paciencia y disposición para poder llevar a cabo esta tesis. A lo largo del proceso demostró ser un profesional excepcional, repleto de conocimiento y sabiduría. Su compromiso y dedicación fueron fundamentales para mi crecimiento académico y personal, y estoy profundamente agradecida por su influencia positiva en mi desarrollo como estudiante y en el área de la investigación.

Al laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y todos sus integrantes por brindarme el espacio y las herramientas para el desarrollo de esta tesis.

A mis queridos amigos Verónica, Franco, Colomba, Daniel, José Tomás, Camila, Constanza, Antonia y Javiera, quienes me acompañaron a lo largo de mi vida universitaria, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, y en los más felices.

A mi compañero de tesis, Óscar, por nuestro mutuo respaldo en el proceso de nuestras tesis, por hacer de este trabajo una experiencia más llevadera y enriquecedora.

Finalmente, agradecer a mis docentes clínicos que, aparte de ser unos excelentes docentes y entregar sus conocimientos con mucha dedicación, creyeron en mí, haciendo de la clínica un espacio más enriquecedor y feliz. Dr. Walter Díaz, Dra. Isadora Floras, Dr. Guillermo Flores, Dr. Mauricio Baeza, Dra. Silvana Maggiolo y Dra. Verónica Tapia por su valiosa contribución a mi formación académica y profesional.

Índice

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 PERIODONTITIS.....	2
2.2 DISBIOSIS INTESTINAL	2
2.3 PERMEABILIDAD INTESTINAL	4
2.4 INFLAMACIÓN.....	5
2.5 COMUNICACIÓN ORAL-INTESTINAL	6
2.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
3.1 HIPÓTESIS.....	10
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	10
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1 ANIMALES E INDUCCIÓN DE PERIODONTITIS	11
4.2 CULTIVO DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS	11
4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	11
4.4 RESORCIÓN ÓSEA Y CUANTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS.....	12
4.5 ENSAYO DE PERMEABILIDAD IN VIVO DE LA BARRERA INTESTINAL Y BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	13
4.6 ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA	12
4.7 ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1 CUANTIFICACIÓN DE RESORCIÓN ÓSEA	14
5.2 CUANTIFICACIÓN MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS.....	14
5.3 INMUNOFLUORESCENCIA	15
5.4 ENSAYO DE PERMEABILIDAD INTESTINAL IN VIVO.....	17
6. DISCUSIÓN.....	21
7. CONCLUSIONES.	26
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
9. ANEXOS.....	36

1. RESUMEN

Introducción. La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible causada por la disbiosis de la microbiota subgingival. *Porphyromonas gingivalis* es considerada una bacteria clave para el inicio y progresión de la periodontitis, la disbiosis intestinal y la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, existen estudios experimentales de periodontitis inducidos por *oral gavage* de *P. gingivalis* que demuestran la existencia de un eje llamado oral intestino u *oral-gut*. Además, la evidencia sugiere que la microbiota disbiótica oral puede producir disbiosis intestinal, y a la vez, desencadenar neuroinflamación. Sin embargo, no está claro si el *oral gavage* de *P. gingivalis* es capaz de inducir neuroinflamación de una manera independiente de la disbiosis intestinal.

Material y métodos. En 12 ratas Sprague-Dawley de 6 semanas de edad, se inoculó 1×10^9 UFC/mL de la cepa W83 de *P. gingivalis* 3 veces por semana durante 4 semanas. El grupo control estuvo compuesto por 12 ratas a las cuales se les administró PBS. 4 ratas de cada grupo fueron eutanasiadas, se obtuvieron los huesos maxilares para determinar la resorción ósea y muestras de intestino delgado para cuantificar los mediadores proinflamatorios mediante ELISA. Además, en 4 ratas de cada grupo se extrajeron muestras de duodeno, yeyuno e íleon para determinar la cantidad de proteínas de uniones estrechas mediante inmunofluorescencia. Por último, a 4 ratas por grupo se aplicó mediante *oral gavage* una solución con FITC-dextrano de 4 kDa y luego de 4 h se obtuvieron muestras de suero, orina, riñones, intestino y tejidos cerebrales para evaluar la alteración funcional de la barrera intestinal.

Resultados. Las ratas experimentales luego de 30 días presentaron un aumento de mediadores proinflamatorios, disminución en la cantidad de proteínas de uniones estrechas, un aumento en la permeabilidad intestinal y ausencia de aumento de permeabilidad en tejidos cerebrales, en comparación con el grupo control. Todo esto en ausencia de periodontitis.

Conclusión. *Oral gavage* de *P. gingivalis* produce inflamación, disrupción de la barrera intestinal y alteración de la funcionalidad, sin la presencia de periodontitis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Periodontitis*

La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible causada por la disbiosis de la microbiota subgingival, que es capaz de inducir una inflamación crónica de bajo grado (Hajisgengallis, G., 2014; Hajisgengallis, G., 2015; Kantarci, K. y cols., 2020). Se caracteriza por la destrucción de los tejidos de inserción del diente que comprenden el ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular y que, sin tratamiento, lleva a la pérdida de los dientes (Hajisgengallis, G., 2014; Choi, J. y Seymour, G., 2010). Es considerada una de las patologías osteodestructivas más prevalentes a nivel mundial (Gamonal, J. y cols., 2010). Entre las bacterias que provocan la disbiosis de la microbiota se describen los anaerobios Gram-negativo *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Filifactor alocis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* (Hajisgengallis, G., 2012; Hajisgengallis, G., 2014; Hajisgengallis, G., 2015). De ellas, *P. gingivalis* es considerada una bacteria clave en el inicio y progresión tanto de la periodontitis como otras condiciones, tales como aterogénesis, parto prematuro con bajo peso al nacer (Offenbacher, S. y cols., 2001; Meurman, J. y cols., 2004) y, recientemente, con la enfermedad de Alzheimer y la disbiosis intestinal (Díaz-Zúñiga, J. y cols., 2020; Ishida, N. y cols., 2017; Hayashi, K. y cols., 2019). En este contexto, existen diversos estudios en modelos experimentales de periodontitis inducidos por *oral gavage* de *P. gingivalis* que demuestran la presencia de eventos caracterizados por cambios en la composición de la microbiota intestinal, la permeabilidad de la barrera intestinal y la modulación de la respuesta inmune intestinal (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Sato, K. y cols., 2017; Sato, K. y cols., 2018). Esto se debe a la presencia de un eje vinculado de manera bi-direccional, conocido como el eje oral-intestinal u *oral-gut*.

2.2 *Disbiosis intestinal*

La disbiosis de la microbiota intestinal es un fenómeno que se asocia ya sea a un incremento o a una disminución de ciertas especies microbianas residentes o ajenas al intestino que altera una serie de procesos biológicos, tales como, la

producción de ácidos grasos de cadena corta, la obtención de aminoácidos esenciales, entre otros. La colonización del intestino por bacterias anaerobias induce un desequilibrio en la microbiota intestinal (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Sato, K. y cols., 2018; Komazaki, R. y cols., 2017; Jia, X. y cols., 2018; Lourenço, T. y cols., 2018; Ohtsu, A. y cols., 2019; Feng, Y. y cols., 2020; Hamamoto, Y. y cols., 2020; Kobayashi, R. y cols., 2020). Uno de los principales efectos del *oral gavage* de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* es provocar un desequilibrio en la relación de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Sato, K. y cols., 2017; Sato, K. y cols., 2018; Komazaki, R. y cols., 2017; Jia, X. y cols., 2018; Ohtsu, A. y cols., 2019; Hamamoto, Y. y cols., 2020; Kobayashi, R. y cols., 2020; Kato, T. y cols., 2018; Huang, Y. y cols., 2020). Las especies de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los principales componentes de la microbiota intestinal humana, como lo revela la secuenciación de genes de muestras fecales humanas (Mariat, D. y cols., 2009). Los *Firmicutes* son un filo compuesto principalmente por bacterias Gram-negativa en las que *Clostridium* y *Lactobacillus* son las más prevalentes (Cassir, N. y cols., 2015). *Clostridium butyricum* puede mantener el equilibrio de la microbiota intestinal mediante la producción de butirato, que inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* patógena evitando su unión a otras bacterias intestinales (Wang, Y. y cols., 2018; Hagihara, M. y cols., 2020). Además, el nivel de butirato en el intestino es necesario para mantener una respuesta homeostática de linfocitos T reguladores (Treg) (Kurita-Ochiai, T. y cols., 1995; Atarashi, K. y cols., 2013).

Por otro lado, los *Bacteroidetes* son bacterias Gram negativa, de las cuales *Bacteroides* y *Porphyromonas* son las más prevalentes en la microbiota intestinal (Ley, R. y cols., 2005). En conjunto con los *Firmicutes*, representan el 90% de las bacterias que componen la microbiota intestinal (Qin, J. y cols., 2010). Además, los *Bacteroidetes* y *Firmicutes* generan ácidos grasos de cadena corta, en particular acetato y propionato, que son productos de la fermentación anaerobia (van de Wouw, M. y cols., 2017). El acetato, propionato y butirato modulan la acetilación y metilación de las histonas, que regulan la expresión génica en las células intestinales del hospedero (Wang, T. y cols., 2018). Por lo tanto, el aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta como el acetato por parte de las bacterias intestinales podría modificar la expresión génica del hospedero,

provocando un aumento en la expresión génica de moléculas asociadas con una respuesta pro-inflamatoria (Rousseaux, S. y Khochbin, S., 2015). Por el contrario, el aumento de butirato cumple un rol protector en el mantenimiento de la permeabilidad de la barrera intestinal al prevenir la secreción de interleuquina (IL)-17 y desencadenar la diferenciación de los linfocitos Treg (Jia, X. y cols., 2018; Kurita-Ochiai, T. y cols., 1995; Wuang, F. y cols., 2015; Szentirmai, E. y cols., 2019).

En estudios recientes donde se administró *P. gingivalis* mediante *oral gavage* se detectó una disminución de *Clostridium* y *Lactobacillus* cuando *P. gingivalis* colonizó el intestino y un aumento en los niveles de ácido láctico y n-butírico (Nakajima, M. y cols., 2015; Kobayashi, R. y cols., 2020; Alonso, C. y cols., 2008; Rhee, S., 2009). El ácido n-butírico induce la secreción de α -defensina en las células enterocromafin, que desempeñan un rol central en la secreción de péptidos antimicrobianos (Kaelberer, M. y cols., 2018). Así, la presencia de bacterias orales disbióticas en el intestino puede generar un desbalance en la microbiota intestinal y, posiblemente, inducir una respuesta en las células enterocromafin.

2.3 Permeabilidad intestinal

Una consecuencia importante de mencionar de la disbiosis intestinal son los cambios en la permeabilidad intestinal. En la periodontitis experimental inducida por *oral gavage* con *P. gingivalis*, no se detectan incrementos en la concentración de *P. gingivalis* en las heces, lo que puede indicar que esta bacteria persiste en la microbiota intestinal o se disemina al tejido conectivo intestinal (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Hamamoto, Y. y cols., 2020). En efecto, la periodontitis experimental indujo la permeabilización de la barrera intestinal, lo que genera un aumento de endotoxinas a nivel sérico (Nakajima, M. y cols., 2015; Sato, K. y cols., 2018; Xue, L. y cols., 2020). En primera instancia, en el intestino *P. gingivalis* se relaciona con una disminución significativa en la expresión de proteínas de las uniones estrechas: zonula-occludens 1 (zo-1), claudina-1 y ocludina (Nakajima, M. y cols., 2015; Xue, L. y cols., 2020). Estas uniones estrechas también polarizan el enterocito al establecer una zona apical donde se ubica el complejo claudina-occludina-zo-1, diferenciándolo del área basal adherida a la lámina basal (Massey-Harroche, D., 2000). Cuando la zonulina, una molécula reguladora de la permeabilidad intestinal, también llamada pre-haptoglobina 2, es secretada a la luz

intestinal por los enterocitos en respuesta a cambios en la microbiota, desencadena la polimerización de la actina y la disgregación de las uniones estrechas por la acción de la proteína quinasa C (Asmar, R. y cols., 2002; Fasano, A., 2011). Además, el aumento de los niveles séricos de zonulina se acompaña de una barrera intestinal altamente permeable, disbiosis intestinal e inflamación (Tajik, N. y cols., 2020).

Curiosamente, algunas bacterias, como *E. coli* y *Prevotella* spp, una vez reconocidas por los enterocitos inducen la liberación de zonulina (Sturgeon, C. y cols., 2016; Ciccía, F. y cols., 2017). Bajo disbiosis intestinal, los niveles de zonulina aumentan en la luz intestinal, induciendo la modificación y redistribución de uniones estrechas, lo que permite el aumento de la permeabilidad paracelular (Asmar, R. y cols., 2002; Sturgeon, C. y cols., 2016; Gottardi, C. y cols., 1996). Si la disbiosis intestinal es persistente, los mecanismos de patogenicidad o bacterias que invadieron el tejido conectivo desencadenarán la respuesta inmune del hospedero, lo que aumentará la presencia de mediadores pro-inflamatorios, con el consiguiente aumento de la permeabilidad intestinal (Cani, P. y cols., 2007).

2.4 Inflamación

Otro efecto de la disbiosis intestinal es la respuesta inflamatoria intestinal. Cuando la disbiosis intestinal y la alteración de las uniones inter-celulares ocurren debido al aumento de patógenos periodontales, las bacterias o sus mecanismos de patogenicidad difunden mediante la vía paracelular hacia el tejido conectivo subyacente (Asmar, R. y cols., 2002; Sturgeon, C. y cols., 2016; Gottardi, C. y cols., 1996). Allí, son reconocidos rápidamente por neutrófilos o macrófagos mediante varios receptores, tales como CD14, TLR2 y TLR4 (West, A. y cols., 2011; Park, B. y Lee, J., 2013; Fournier, B. y Parkos, C., 2012; Futosi, K. y Mócsai, A., 2013). La activación de estos receptores se asocia intra-celularmente con la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), que desencadena la secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (West, A. y cols., 2011; Zheng, H. y cols., 2010; Müller, P. y cols., 2014; Moreira-Lopes, T. y cols., 2020). Si la bacteria es de alta virulencia, puede inducir la activación de un fenotipo pro-inflamatorio de neutrófilos. Este fenotipo pro-inflamatorio se caracteriza por la secreción de IL-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el aumento de los niveles de

mieloperoxidasa, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), un aumento de la capacidad de fagocitosis y la liberación de la trampa extracelular de neutrófilos (NET) asociada a la muerte celular o NETosis (Moreira-Lopes, T. y cols., 2020; Sperandio, V. y cols., 2003; Jang, H. y cols., 2018; Neufeld, K. y cols., 2019). La NETosis favorecerá la retención de bacterias invasoras, facilitando su fagocitosis por neutrófilos o macrófagos (Hahn, J. y cols., 2016). Las citoquinas secretadas por los neutrófilos y la virulencia individual de cada bacteria pueden inducir la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio o M1 (Mills, C. y cols., 2016). Además, en presencia de disbiosis intestinal, se evidencia un aumento en la infiltración de los linfocitos T colaboradores (Th)-1, Th17 y Th22 (Spiller, R., 2008; Ivanov, I. y cols., 2009; Hill, D. y Artis, D., 2010). El lipopolisacárido (LPS) de *Bacteroides fragilis* y *Clostridium* spp puede estimular la producción de IL-10 y regular la respuesta Treg, favoreciendo la recomposición de la microbiota intestinal por la inmuno-regulación local (Atarashi, K. y cols., 2013; Ramakrishna, C. y cols., 2019). Sin embargo, en modelos experimentales de periodontitis, se observó un aumento de linfocitos infiltrantes Th1 y Th17 y una disminución de Treg (Sato, K. y cols., 2017; Sato, K. y cols., 2018; Atarashi, K. y cols., 2017). Estos cambios en la respuesta inmune pueden deberse tanto al aumento de bacterias patógenas como a una disminución de bacterias comensales (Nakajima, M. y cols., 2015).

En términos generales, cuando las bacterias orales aumentan en enfermedades disbióticas como la periodontitis, su detección en la circulación sanguínea puede deberse a la diseminación directa desde el tejido conectivo periodontal ulcerado o a la permeabilización de la barrera intestinal (Cani, P. y cols., 2007; Poveda-Roda, R. y cols., 2008).

2.5 Comunicación oral-intestinal

Los pacientes afectados por periodontitis pueden tener un área de ulceración de 20 cm² dentro de su periodonto (Hujoel, P. y cols., 2001). Tanto en la salud periodontal como durante la periodontitis se producen bacteremias transitorias sin generar sepsis (Sansores-España, L. y cols., 2021). En efecto, los leucocitos no pueden reconocer, fijar ni fagocitar bacterias en fluidos de alta velocidad como la sangre (Minasyan, H., 2014). Sin embargo, las bacterias pueden ser atraídas por cargas eléctricas a la superficie de los eritrocitos y pueden morir por contacto

mediante la liberación de oxígeno desde la oxihemoglobina (Minasyan, H., 2017). Las bacterias ingresan a los eritrocitos creando poros en la membrana y, una vez dentro de estas células, pueden morir por oxidación o ser resistentes (Minasyan, H., 2014; Minasyan, H., 2016). Si las bacterias sobreviven a este ataque oxidativo, se filtran consecutivamente en el hígado y el bazo. En algunos casos, las bacterias pueden sobreactivar a los macrófagos del hígado o el bazo e inducir hepato o esplenomegalia (Minasyan, H., 2017). Solo las bacterias capaces de resistir este proceso generarían sepsis (Minasyan, H., 2016).

Estudios recientes demuestran que la cantidad de bacterias que una persona deglute al día es de aproximadamente 10^6 UFC/mL, lo que significa que una persona con alguna enfermedad oral puede llegar a deglutir alrededor de 10^{12} - 10^{13} UFC/mL al día (Arimatsu, K. y cols., 2014; von Troil-Lindén, B. y cols., 1995; Boutaga, K. y cols., 2007; Saygun, I. y cols., 2011). En efecto, luego de inocular 10^9 UFC de *P. gingivalis* mediante *oral gavage*, a las 3 horas se detecta esta bacteria en el íleon y a las 16 horas en el colon, induciendo disbiosis intestinal poco después de ser ingerida. Así, la presencia de periodontitis y la consiguiente ingestión de altas cargas de bacterias anaeróbicas podrían generar desequilibrios en la microbiota intestinal (Arimatsu, K. y cols., 2014). En este contexto, un tipo de célula particular en el intestino, las células enterocromafin, detectan permanentemente las bacterias patógenas invasoras (Bellono, N. y cols., 2017). Las bacterias asociadas a la disbiosis pueden ser reconocidas por las células enterocromafin, que liberan citoquinas y neurotransmisores a las fibras aferentes del nervio vago e inducen una respuesta simpática intestinal (Raybould, H. y cols., 2004). Esto, con el objetivo de acelerar la motilidad intestinal y la liberación de mucus para eliminar a las bacterias patógenas (Rhee, S., 2009).

2.6 Planteamiento del problema

Actualmente, no existen estudios que revelen una asociación entre la cavidad oral, el intestino y el cerebro. Las aproximaciones al posible vínculo entre estos puede estar dado por los antecedentes descritos anteriormente, además de existir evidencia que sugiere que la microbiota disbiótica oral puede producir disbiosis intestinal, y a la vez, desencadenar neuroinflamación (Sansores-España, L. y cols., 2021). En cuanto a los estudios de periodontitis experimental inducida por ligadura,

hay diferencias en los días de exposición a esta (5, 10, 28 días), pero la evidencia indica que la ligadura induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios y una resorción ósea medible desde el día diez en adelante, junto con una disbiosis de la microbiota intestinal (Matsuda, Y. y cols., 2015; Palioto, D. y cols., 2019; Garlet, G., 2010).

Al evaluar todos los estudios donde inducen periodontitis mediante *oral gavage* o ligadura oral se observa que todos demuestran alteración de la microbiota intestinal, pérdida de la integridad intestinal o respuesta inmune pro-inflamatoria, siendo de estos sólo seis estudios los que confirman la presencia de periodontitis en tiempos de experimentación diferentes (Arimatsu, K. y cols., 2014; Matsuda, Y. y cols., 2015; Jia, X. y cols., 2018; Sato, K. y cols., 2018; Palioto, D. y cols., 2019; Huang, Y. y cols., 2020). Los dos estudios independientes que instalaron la ligadura durante 28 días evaluaron además una asociación entre la periodontitis experimental con enfermedad de Alzheimer (EA) o patologías similares a Parkinson, induciendo resorción ósea y respuesta inflamatoria suficiente para desencadenar neurodegeneración (Xue, L. y cols., 2020; Kantarci, K. y cols., 2020). En estos experimentos fue posible detectar alteraciones en *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, lo cual es fundamental para determinar inflamación intestinal (Nakajima, M. y cols., 2015; Ley, R. y cols., 2005; Koren, O. y cols., 2011), por lo que la neuroinflamación se podría atribuir a los efectos de la periodontitis y la disbiosis intestinal, pero aún no está claro si es por causa de la disbiosis oral, por la disbiosis intestinal o ambas.

Dado que todos los estudios utilizan diferentes métodos para inocular la bacteria o inducir periodontitis, es difícil la comparación entre estos, por lo que a pesar de que todos demuestran un deterioro cognitivo en mayor o menor medida, es discutible la vía por la que este se genera, por lo tanto, se necesitan más estudios para comprender el eje Oral-Intestinal-Cerebro. La evidencia indica que el eje Oral-Cerebro puede estar dada por la interacción entre bacterias y el nervio trigémino mediante la vía TLR4/CD14-MyD88-NF- κ B (Wadachi, R. y Hargreaves, K., 2005; Diógenes, A. y cols., 2011; Go, M. y cols., 2016). Sin embargo, queda por demostrar si la neuroinflamación se debe efectivamente a la periodontitis experimental o si es causada por la disbiosis intestinal. Es importante mencionar respecto a los dos estudios que indujeron periodontitis, que en uno de ellos se detectó activación microglial en el hipocampo y patología similar a EA, y en el otro se detectó activación

microglial en la sustancia nigra *pars compacta* y patología similar a la enfermedad de Parkinson (Xue, L. y cols., 2020; Kantarci, K. y cols., 2020), lo que nos permite especular una relación entre periodontitis y proteinopatías (Kwon, S. y cols., 2020).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1 Hipótesis

El modelo de periodontitis experimental inducida por *oral gavage* de *P. gingivalis* en ratas es capaz de inducir alteraciones intestinales sin inducir periodontitis.

3.2 Objetivo General

Determinar en el modelo de periodontitis experimental inducida por *oral gavage* de *P. gingivalis* la presencia de alteraciones en la integridad de la barrera intestinal, en la permeabilidad intestinal y la presencia o ausencia de inflamación en el intestino.

3.3 Objetivos Específicos

1. Cuantificar los niveles de secreción de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α en el intestino delgado de ratas afectadas o no de periodontitis experimental.
2. Determinar la integridad estructural y funcional de la barrera intestinal en ratas Sprague-Dawley macho afectadas o no de periodontitis experimental.
3. Correlacionar la presencia o ausencia de periodontitis con la presencia o ausencia de inflamación o alteraciones en la permeabilidad intestinal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales e inducción de periodontitis

Los grupos experimentales y controles fueron compuestos por 24 Ratas Sprague-Dawley de 6 semanas de edad (jóvenes), obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica de Chile, y mantenidas en la Unidad de Mantención Animal del Pabellón G de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas se ubicaron en un ambiente controlado con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 40-70% de humedad relativa, con comida y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron manejados diariamente durante 2 semanas antes del *oral gavage*. Para la inducción de la periodontitis experimental, bajo anestesia general con isoflurano 2%, el día 1 se inoculó 1×10^9 UFC/mL de la cepa W83 de *P. gingivalis* resuspendidas en 100 μL de PBS mediante sonda gástrica. Este procedimiento se realizó 3 veces por semana hasta que se completaron los 30 días. Además, 12 ratas a las cuales se les administró 100 μL de PBS por sonda gástrica se consideraron como grupo control.

4.2 Cultivo de crecimiento de bacterias

La cepa W83 de *P. gingivalis* (serotipo K1) se cultivó de acuerdo a las condiciones especificadas en nuestros estudios previos (Vernal, R. y cols., 2008, Vernal, R. y cols., 2009).

4.3 Obtención de muestras biológicas

El día 30, 4 ratas de cada grupo fueron eutanasiadas por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de intestino delgado. La mucosa palatina fue decolada del hueso maxilar, el cual fue conservado en Etanol 100% hasta su análisis (en detalle más adelante). Las muestras de intestino fueron procesadas para la purificación de las proteínas totales según el protocolo descrito previamente (Díaz-Zúñiga, J. y cols., 2020) y almacenadas a -80°C hasta su análisis. Además, 4 ratas de cada grupo fueron perfundidas transcárdialmente con 300 mL de solución salina y 300 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 0,1 M pH 7,4 para permitir la fijación. A continuación, se extrajo los intestinos, se fijó posteriormente en PFA al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, fueron incubados durante 72

horas a 4°C en una solución que contiene 30% de sacarosa y 0,002% de azida sódica para criopreservación.

4.4 Resorción ósea y cuantificación de moléculas

Cada maxilar fue escaneado mediante micro tomografía computarizada (μ CT) para cuantificar el nivel óseo y determinar la resorción ósea, siguiendo el análisis morfométrico descrito anteriormente (Díaz-Zúñiga, J. y cols., 2020) Además, en el intestino obtenido como se describió en el ítem 4.3, los niveles de los mediadores IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α fueron cuantificados mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria), como se describió anteriormente (Díaz-Zúñiga, J. y cols., 2020).

4.5 Análisis mediante inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia, una vez obtenidas las muestras biológicas de acuerdo al ítem 4.3, fueron cortados los intestinos separados en duodeno, yeyuno e íleon, en el plano coronal con un crióstato a -30°C. Las secciones de 40 μ m de grosor fueron suspendidas en una solución de bloqueo (PBS con Triton X-100 al 0,25% y 3% de suero de burro) durante 2 h a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas con una solución de bloqueo que contiene los anticuerpos primarios monoclonales anti-zo1 (R26.4C, eBioscience™), anti-occludina (OC-3F10, Invitrogen™) y anti-claudina (2H10D10, Invitrogen™) durante toda la noche a 4°C. Las secciones fueron lavadas tres veces durante 5 min con PBS e incubadas durante 2 h con anticuerpos anti-ratón, de cabra o de conejo fluorescentes secundarios (Alexa Fluor® 488, AlexaFluor® 594 o Alexa Fluor® 647, Abcam US). Los núcleos fueron visualizados con Hoechst (1: 10.000, Sigma, St Louis, MI, EE. UU.). Mediante un microscopio confocal (Nikon C2 +, Melville, NY) se obtuvo entre 30-35 imágenes por cada corte. El análisis y reconstrucción de cada corte histológico se realizó mediante el software gratuito ImageJ (National Institutes of Health, MD, EUA; <https://imagej.nih.gov/ij/>).

4.6 Ensayo de permeabilidad in vivo

El día 30 y previo a la eutanasia, en 4 ratas por grupo, se aplicó mediante oral gavage 500 $\mu\text{L}/\text{gr}$ de peso una solución que contiene FITC-dextrano de 4 kDa. Luego de 4 h se recolectó la sangre periférica total mediante punción cardíaca y obtuvo el suero de manera inmediata, además se recolectó la orina de las ratas mediante la punción de la vejiga con una jeringa hipodérmica de 5 mL. Posteriormente, se eliminó por perfusión todo resto de sangre mediante 300 mL de solución salina. Luego, se extrajo el duodeno, yeyuno, íleon, riñón y cerebro, y se fijaron por inmersión en PFA 4% y, mediante microscopía confocal se observó la presencia de FITC-Dextrano. El valor obtenido del suero se ajustó al peso para obtener el índice de permeabilidad.

4.7 Análisis de los datos

Los datos de los mediadores pro-inflamatorios se representarán con los valores promedios \pm la desviación estándar en concentraciones (pg/mL). La pérdida del nivel óseo se representará con los valores promedios \pm la desviación estándar en distancias (nm) o áreas (nm^2). Finalmente, los datos de las inmunofluorescencias se representarán como valores promedios \pm la desviación estándar de la intensidad relativa de cada marcador. Todos los datos se analizarán con la prueba de Kolgomorov-Smirnov y, dependiendo si su distribución es paramétrica o no paramétrica, se analizarán con la prueba de t-test o Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizará con el software SPSS v20.0 y un valor de $p < 0,05$ se considerará como estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de resorción ósea

A partir de los maxilares se realizó la cuantificación del nivel de resorción ósea para determinar si el oral gavage produjo o no periodontitis (Figura N°1). Los resultados muestran que no existe diferencia significativa en la resorción ósea de los maxilares entre el grupo control y el grupo *oral gavage* indicando que con el modelo de *oral gavage* de *P. gingivalis* no se produce periodontitis.

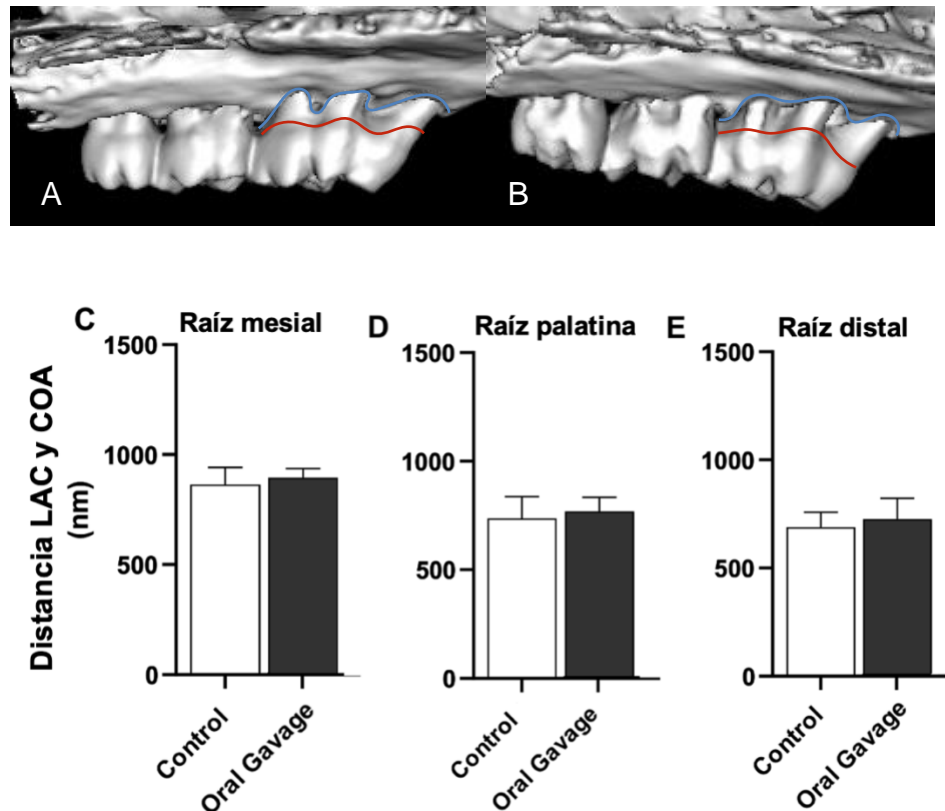


Figura N°1. Resorción ósea. A) Grupo control, B) grupo oral gavage. Las imágenes corresponden a la reconstrucción 3D obtenidas mediante microCT. La línea azul representa la cresta ósea alveolar y la línea roja el límite amelo-cementario. Los gráficos representan la distancia entre LAC y COA de las raíces del primer molar superior derecho de las ratas. C) Raíz mesial, D) raíz palatina, E) raíz distal. Los datos se presentan media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. LAC: límite amelo-cementario, COA: cresta ósea alveolar. nm: nanómetros. *p<0,05.

5.2 Cuantificación mediadores pro-inflamatorios

A partir de muestras de íleon se cuantificaron los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α con el objetivo de determinar si el *oral gavage* es capaz de generar inflamación intestinal (Figura N°2). En las ratas afectadas por

oral gavage se detecta un incremento en los niveles de producción de IL-1 β y TNF- α en comparación con las ratas controles. Además, se observa una disminución significativa en los niveles de IL-10 en las ratas experimentales en comparación a las controles.

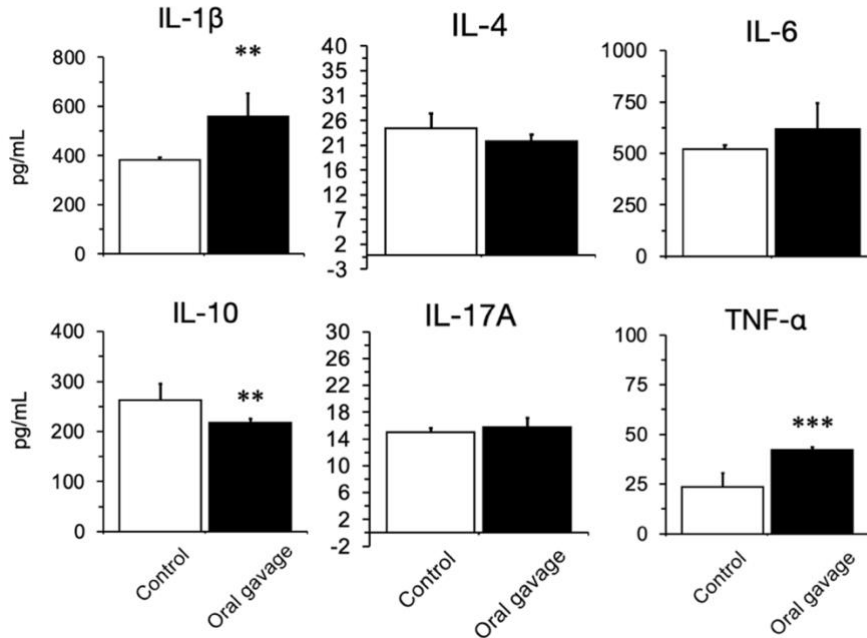


Figura N°2. Cuantificación de los niveles de secreción de mediadores pro-inflamatorios. Niveles de secreción de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α obtenidos en muestra de intestino delgado mediante ELISA, en ratas control y ratas oral gavage de cepa W83 de *P. gingivalis* (n=4). Los datos se presentan como concentración de citoquinas (pg/ml). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.3 Inmunofluorescencia

Luego, para determinar cómo el *oral gavage* de *P. gingivalis* puede afectar la estructura de la barrera intestinal, en las muestras de duodeno, yeyuno e íleon se visualizaron las uniones estrechas mediante inmunofluorescencia (Figura N°3 y N°4). En el duodeno, se observa una disminución significativa en la densidad de claudina y ocludina en el grupo *oral gavage* en comparación con el grupo control. En el yeyuno, se aprecia una disminución significativa en la densidad de ocludina en el grupo *oral gavage*. En lo que respecta al íleon, se evidencia la mayor reducción en la densidad de las proteínas claudina y ocludina en las uniones intercelulares en el grupo *oral gavage* en comparación al grupo control. Estas alteraciones se cuantificaron como unidades arbitrarias de intensidad, donde se pueden detectar

diferencias significativas en cada una de las condiciones mencionadas anteriormente (Figura N°4).

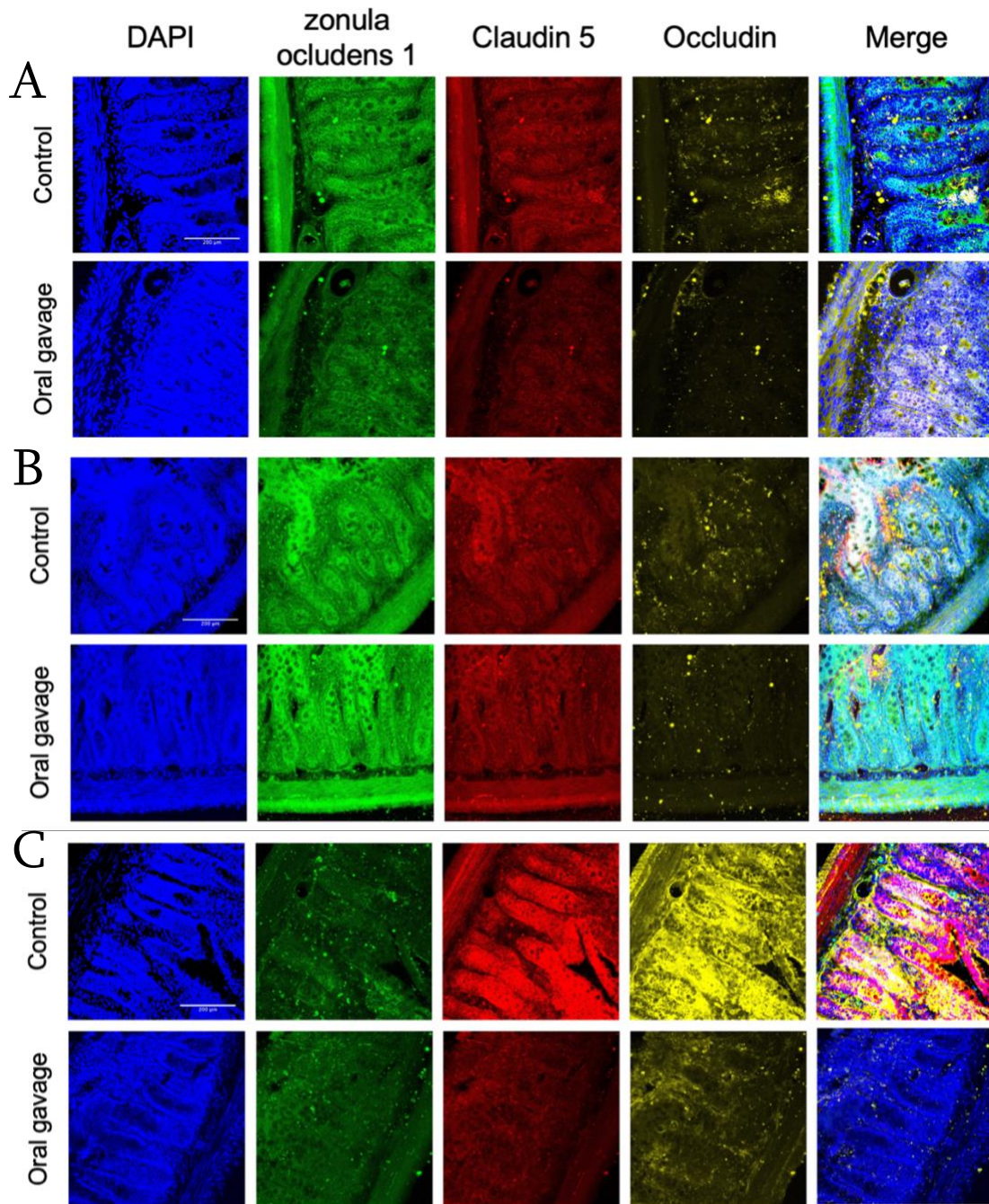


Figura N°3. Inmunofluorescencia de zonula occludens, ocludina, claudina. Se observan imágenes representativas de microscopía confocal de una reconstrucción 3D de entre 30-35 imágenes por cada corte de muestras obtenidas a partir de los intestinos. En azul se puede ver DAPI, correspondiente al núcleo de las células del intestino; en verde zonula occludens, en rojo claudina, en amarillo ocludina, y por último merge, una imagen fusionada con las cuatro tinciones. **A)** duodeno, **B)** yeyuno y **C)** íleon.

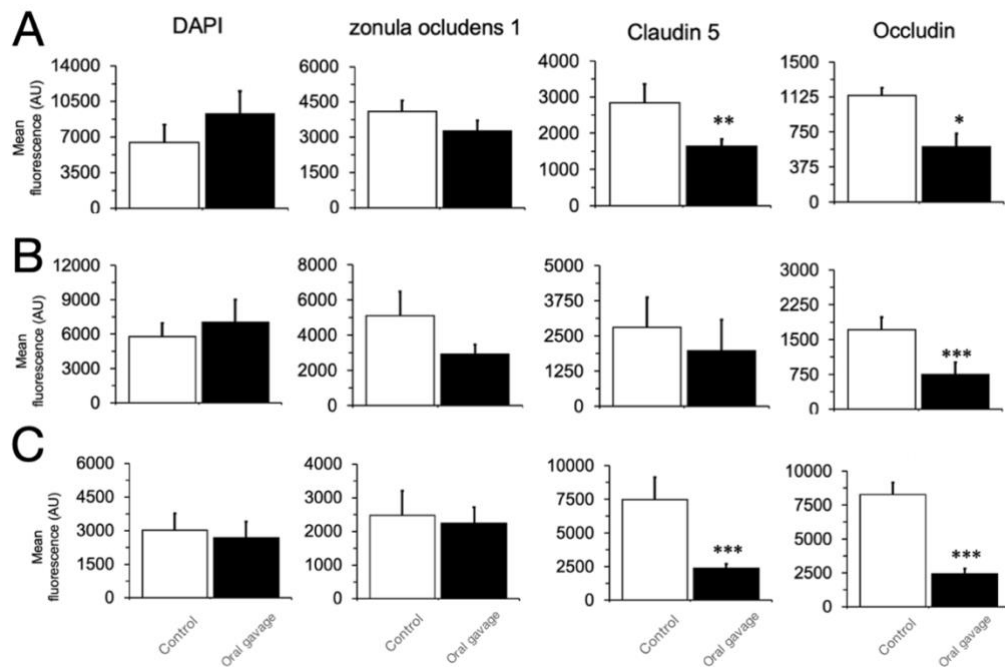


Figura N°4. Cuantificación de unidades arbitrarias de fluorescencia de ZO-1, claudina y occludina. La gráfica representa el valor promedio +/- desviación estándar de unidades arbitrarias de fluorescencia (AU) (n=4). ZO-1: *p<0,05; ***p<0,001. **A)** duodeno, **B)** yeyuno y **C)** íleon.

5.4 Ensayo de permeabilidad intestinal *in vivo*

Para determinar si la inflamación y la alteración de la barrera intestinal se asocia con una alteración funcional del intestino, se realizó el ensayo de permeabilidad *in vivo*. A nivel sérico se detectó un incremento significativo de FITC-dextrano (Figura N°5A). Para determinar si este incremento no se debe a una mayor ingesta de marcador debido a un mayor peso, se evaluaron ambas variables identificando que no existen diferencias entre ambos grupos (Figura N°5B y 5C). Luego, se observa una correlación positiva entre la concentración de FITC-dextrano, el volumen administrado y la condición experimental o control, donde observamos que independiente del volumen administrado el grupo experimental presenta mayores concentraciones de FITC-dextrano en el suero en comparación al grupo control (Figura N°5D). Además, en las figuras N°5E, 5F y 5G se logra visualizar la ubicación del FITC en las imágenes de inmunofluorescencia. En particular, en el íleon del grupo experimental se observa una mayor concentración del marcador en la mucosa intestinal en comparación al control.

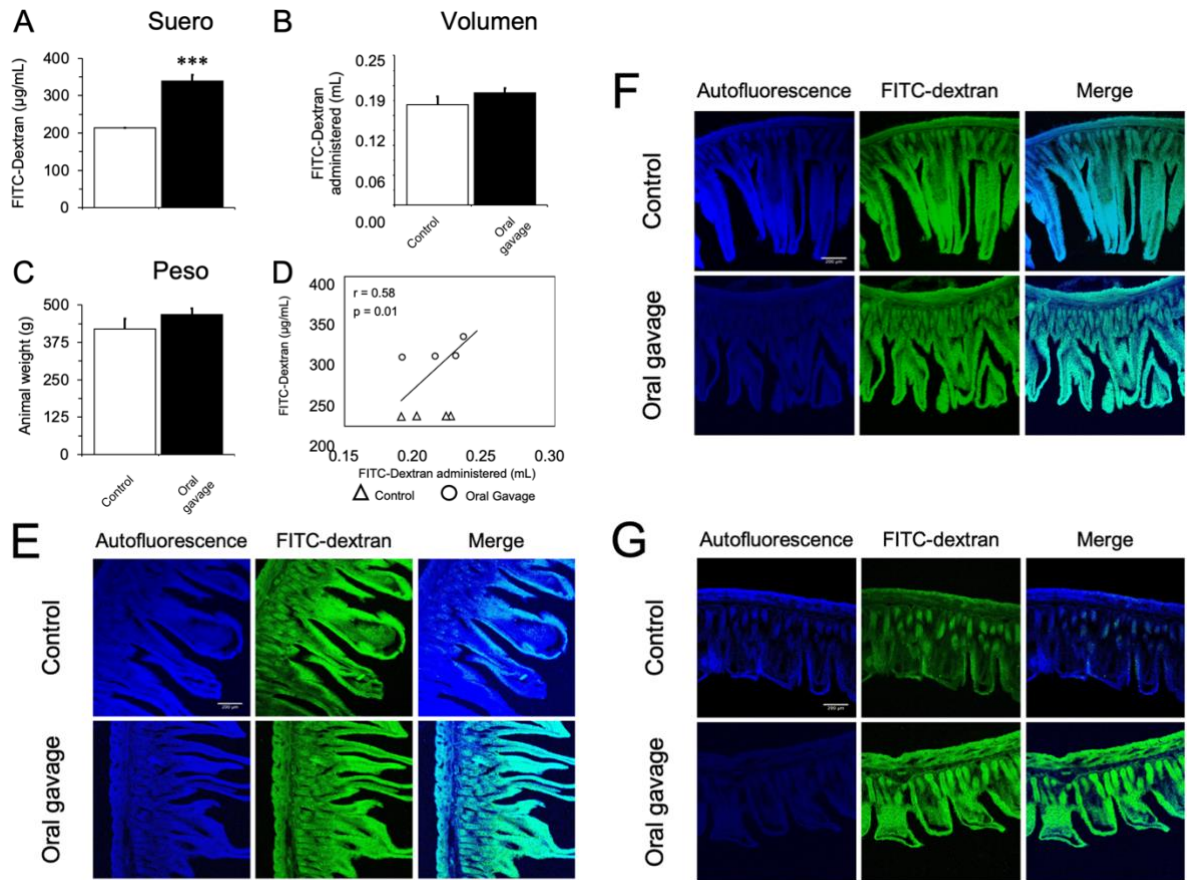


Figura N°5. Cuantificación de niveles de FITC-dextrano en suero de ratas control y ratas oral gavage de *P. gingivalis*. **A)** Los datos se presentan como concentración de moléculas en suero (ng/mL); media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. ng: nanogramos. * $p < 0,05$, *** $p < 0.001$. **B)** Presenta el promedio del volumen (mL) administrado a las ratas de cada grupo; **C)** Promedio del peso (g) de las ratas de cada grupo. **D)** gráfico de correlación entre concentración de moléculas de Dextrano en suero (ng/mL) y volumen de Dextrano administrado (mL) a cada rata experimental; **E)** Inmunofluorescencia duodeno; **F)** Inmunofluorescencia yeyuno; **G)** Inmunofluorescencia íleon.

Luego, y para determinar cuánto FITC-dextrano que ingresa a la circulación periférica se excreta vía renal, cuantificamos la presencia del marcador en homogenizados de riñón y en orina (Figura N°6A y 6B). Particularmente, no se detectaron diferencias en las concentraciones de FITC en el riñón, pero si en la orina, donde hubo menor presencia de FITC en el grupo experimental. Al evaluar el volumen orinado, no se registraron diferencias. Además, no se detectó correlación entre la concentración de FITC en orina, el volumen de orina y la condición

experimental o control, lo que nos indica que las ratas afectadas por *oral gavage* secretan menor concentración de FITC-dextrano que las controles.

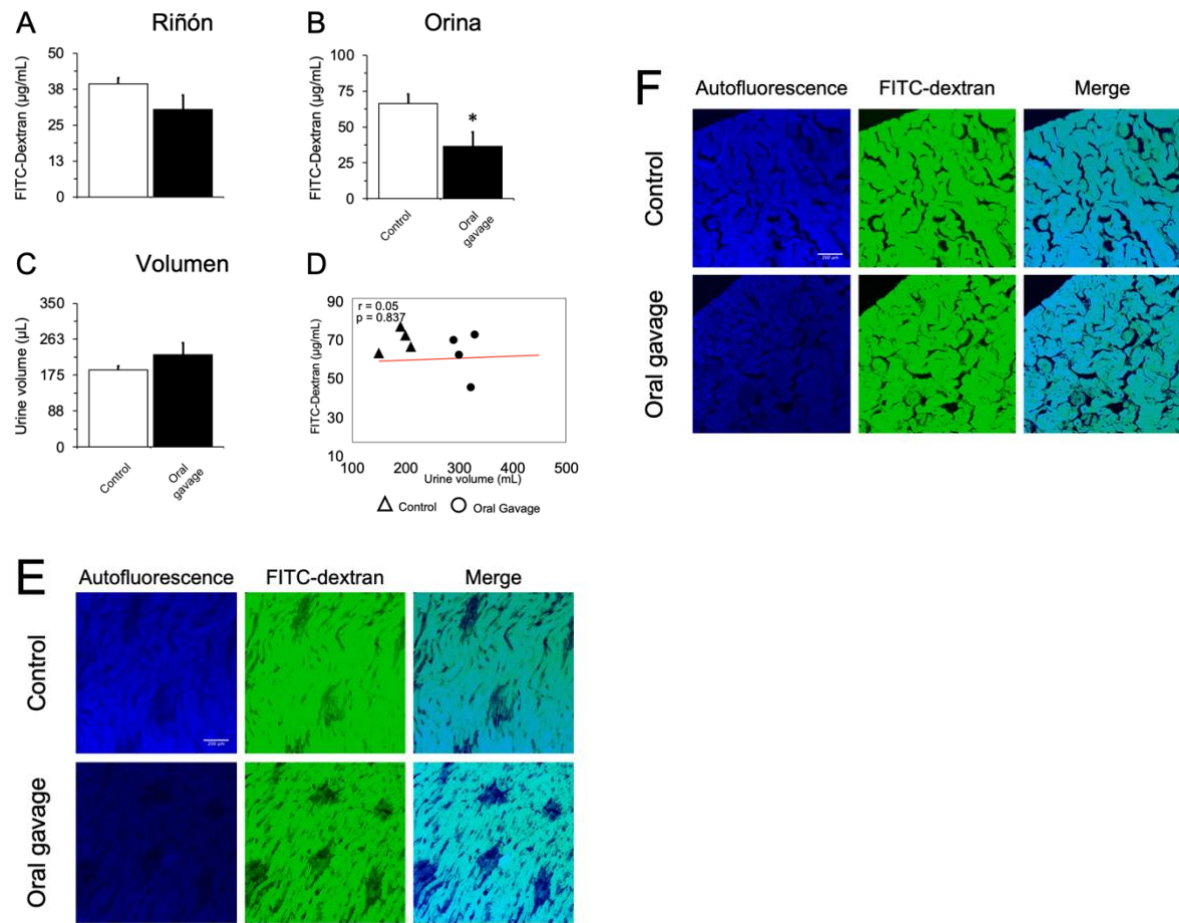


Figura N°6. Cuantificación de niveles de FITC-dextrano en riñón y orina. A) Cuantificación de Dextrano en riñón, **B)** Cuantificación de Dextrano en orina, **C)** Volumen de orina, **D)** Correlación entre la concentración de moléculas de Dextrano y el volumen de orina, **E)** Médula renal **F)** Corteza renal. Cada panel representa 4 experimentos independientes por cada grupo. µg: microgramos. * $p < 0,05$, *** $p < 0.001$.

Finalmente, para evaluar adónde puede estar migrando el FITC-dextrano del suero, se aisló el hipocampo, mesencéfalo, cerebelo y corteza cerebral de los animales, se cuantificó la concentración de FITC-dextrano y se calculó el índice de permeabilidad, el cual se ajusta a la concentración de FITC en suero, al peso del tejido y al volumen administrado (Figura N°7). De esta manera no se observaron aumentos en el índice de permeabilidad en ninguno de los tejidos cerebrales de las

ratas pertenecientes al grupo *oral gavage* en comparación con el grupo de control (Figura N°7A, 7B, 7C Y 7D). Además, no se evidenció un incremento en la acumulación de las moléculas de Dextrano en los cortes del giro dentado del hipocampo (Figura N°7E), el mesencéfalo (Figura N°7F) ni la corteza (Figura N°7G), lo que sugiere que la integridad de la barrera hematoencefálica no parece estar comprometida.

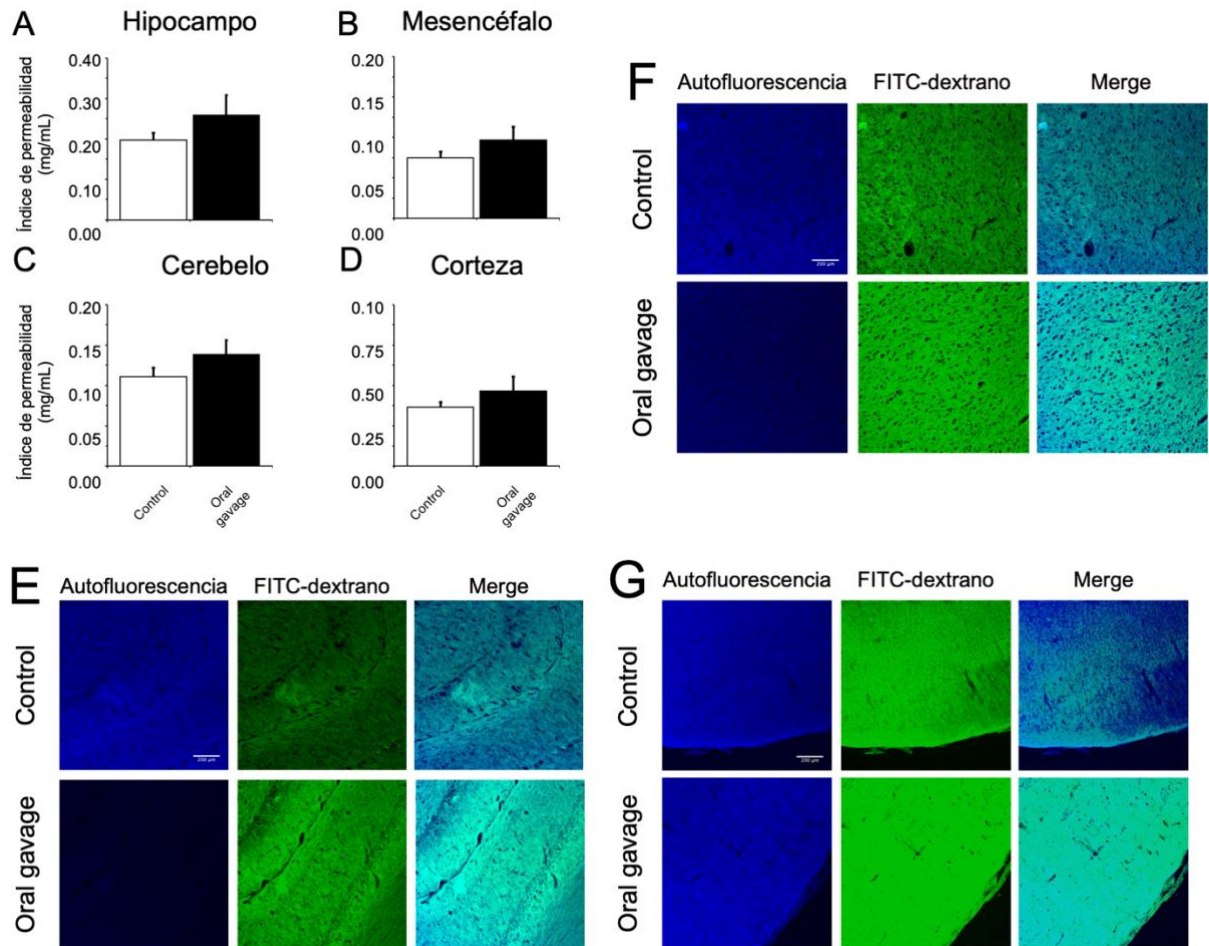


Figura N°7. Cuantificación niveles de FITC-dextrano en hipocampo, cerebelo, mesencéfalo y corteza. **A)** Índice de permeabilidad de hipocampo, **B)** Índice de permeabilidad de mesencéfalo, **C)** Índice de permeabilidad de cerebelo, **D)** Índice de permeabilidad de corteza cerebral, **E)** Inmunofluorescencia de giro dentado del hipocampo, **F)** Inmunofluorescencia de mesencéfalo, **G)** Inmunofluorescencia de corteza. Para las gráficas, los datos se presentan como Índice de permeabilidad (mg/mL) media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. Para las inmunofluorescencias, en azul se observa la autofluorescencia y en verde el FITC. ng: nanogramos. * $p < 0,05$, *** $p < 0.001$.

6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el *oral gavage* de *P. gingivalis* no generó periodontitis en las ratas luego de 30 días. Además, se logra comprobar que a nivel intestinal este modelo es capaz de producir inflamación en el íleon, alteración estructural de la barrera intestinal y un incremento en la permeabilidad, evidenciando alteraciones estructurales y funcionales del intestino. Esto puede deberse a que la presencia de *P. gingivalis* en la microbiota intestinal genera cambios que llevan a estas alteraciones. De manera similar, todos los estudios de periodontitis experimental mediante *oral gavage* o ligadura oral demuestran cambios en la microbiota intestinal, pérdida de integridad intestinal o respuestas pro-inflamatorias (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Sato, K. y cols., 2017; Sato, K. y cols., 2018; Komazaki, R. y cols., 2017; Jia, X. y cols., 2018; Lourenço, T. y cols., 2018; Ohtsu, A. y cols., 2019; Feng, Y. y cols., 2020; Hamamoto, Y. y cols., 2020; Kobayashi, R. y cols., 2020; Mariat, D. y cols., 2009; Xue, L. y cols., 2020; Atarashi, K. y cols., 2017; Matsuda, Y. y cols., 2015; Paliot, D. y cols., 2019). Sin embargo, solo seis pudieron confirmar la presencia de periodontitis, teniendo estos distintos tiempos experimentales (Arimatsu, K. y cols., 2014; Matsuda, Y. y cols., 2015; Jia, X. y cols., 2018; Sato, K. y cols., 2018; Palioto, D. y cols., 2019; Huang, Y. y cols., 2020).

En general, cuando las bacterias orales aumentan en enfermedades disbióticas como la periodontitis, su detección en la circulación sanguínea puede atribuirse tanto a la difusión directa desde el tejido conectivo periodontal ulcerado como a la permeabilización de la barrera intestinal (Cani, P. y cols., 2007; Poveda-Roda, R. y cols., 2008). En la literatura el *oral gavage* se describe como una técnica que es capaz de producir periodontitis quedando en duda la forma en la que se realiza el *oral gavage*. En efecto, una forma de inducir periodontitis y que se confunde con el *oral gavage* es la irrigación oral, donde aplican agua infectada con bacterias orales en la boca del animal y hacen que el animal degluta de manera consciente. Esta técnica, también considerada *oral gavage* no debiera ser considerada como tal, ya que genera contaminación de la cavidad oral y no es comparable con una técnica de *oral gavage* estricta. Así, nuestro modelo de periodontitis debiera cambiar su nombre al de *oral gavage*, pudiendo estandarizar de alguna manera el efecto de la ingesta de *P. gingivalis* en el intestino, y por consiguiente en el resto del organismo,

ya que los efectos detectados son debido a la presencia de *P. gingivalis* y no como consecuencia de la destrucción ósea.

Uno de los principales efectos de *oral gavage* de *P. gingivalis* es causar un desequilibrio en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* en la microbiota intestinal (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Sato, K. y cols., 2017; Sato, K. y cols., 2018; Komazaki, R. y cols., 2017; Jia, X. y cols., 2018; Ohtsu, A. y cols., 2019; Hamamoto, Y. y cols., 2020; Kobayashi, R. y cols., 2020; Kato, T. y cols., 2018; Huang, Y. y cols., 2020). La manifestación de este desequilibrio se evidencia en una reducción de las poblaciones de *Clostridium* y *Lactobacillus* (Nakajima, M. y cols., 2015, Kobayashi, R. y cols., 2020). Este desequilibrio es capaz de aumentar la producción de acetato y propionato, lo que causa un incremento en la expresión génica asociada con una respuesta pro-inflamatoria y disminuye la producción de butirato, siendo esto perjudicial para la homeodinamia intestinal (Rousseaux, S. y Khochbin, S., 2015).

La presencia de *P. gingivalis* en el intestino está asociada con una reducción significativa en la expresión de proteínas de uniones estrechas de los enterocitos, tales como la zo-1, claudina-1 y ocludina (Arimatsu, K. y cols., 2014; Nakajima, M. y cols., 2015; Xue, L. y cols., 2020). La disminución de proteínas de uniones estrechas puede alterar las uniones paracelulares, afectando así la función de la barrera y aumentando la permeabilidad (Turner, J., 2009). Una posible explicación para el efecto de *P. gingivalis* sobre las uniones estrechas podría ser la presencia de gingipainas, uno de los mecanismos de patogenicidad más relevantes de *P. gingivalis* (Potempa, J. y cols., 1995; Li, N. y Collyer, C., 2011), que tienen la capacidad de degradar proteínas que contienen arginina o lisina (Pike, R. y cols., 1994). Se ha observado que ambos aminoácidos están presentes en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de las uniones estrechas (Li, N. y Collyer, C., 2011). Adicionado a lo anterior, bajo la disbiosis intestinal el enterocito reconoce bacterias ajenas y responde produciendo zonulina, aumentando así sus niveles en la luz intestinal e induciendo la modificación y redistribución de las uniones estrechas (Asmar, R. y cols., 2002; Fasano, A., 2011). La asociación del citoesqueleto con la estructura de las uniones estrechas parece ser esencial para la regulación y el mantenimiento de su función (Suzuki, T., 2020), por lo que ambos acontecimientos estarían contribuyendo al aumento de la permeabilidad paracelular (Sansores-

España, L. y cols., 2021). Este estudio nos demuestra que *oral gavage* de *P. gingivalis* luego de 30 días presenta una disminución significativa en la densidad de claudina y ocludina, especialmente en la porción del íleon, demostrando así una barrera intestinal altamente permeable.

Adicionalmente, se evaluó el estado inflamatorio del íleon de las ratas, ya que fue la porción del intestino con mayor alteración estructural. En el intestino delgado se registra una gran cantidad de células inmunitarias, destacándose aún más en el íleon. Esta abundancia se atribuye a la elevada concentración de células de Paneth en esta región, desempeñando estas un rol fundamental en las funciones antimicrobianas. Además, en el íleon se describe una mayor presencia de estructuras organizadas pertenecientes al tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Dentro de estos, las placas de Peyer, caracterizadas por su tamaño significativo, se identifican como centros de estimulación inmunitaria continua. Asimismo, dentro del GALT, se encuentran agregados linfoides más pequeños conocidos como tejido linfoide intestinal solitario (SILTs), los cuales participan en la activación inmunitaria humoral de manera constante (Mowat, A. y Agace, W., 2014). En este contexto, se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α observándose un aumento en los niveles de IL-1 β y TNF- α en comparación con las ratas control. Además, se evidenció una disminución significativa en los niveles de IL-10 en las ratas experimentales en comparación a los controles.

En estudios experimentales de periodontitis, en el suero, tejido adiposo, intestino delgado o largo, y el hígado, se detectan mediadores inflamatorios tales como IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α (Arimatsu, K. y cols., 2014; Komazaki, R. y cols., 2017; Jia, X. y cols., 2018; Hamamoto, Y. y cols., 2020; Matsuda, Y. y cols., 2015; Paliot, D. y cols., 2019). Estos hallazgos sugieren un efecto de la periodontitis en otros tejidos u órganos que podrían estar vinculados con un intestino permeable (Xue, L. y cols., 2020). Dado que el sistema inmunológico es transversal, un aumento en los mediadores inflamatorios a nivel oral o intestinal afectará inmediatamente la homeostasis cerebral y viceversa (Sansores-España, L. y cols., 2021). Estudios previos demuestran que la inflamación sistémica puede impulsar procesos neurodegenerativos mediante una barrera hematoencefálica (BHE) comprometida (Holmes, C. y cols., 2009; Kamer, A. y cols., 2008; Lin, T. y cols., 2018). En este contexto, diferentes estudios en los que la periodontitis experimental

se indujo a través de diferentes métodos, sugieren que la periodontitis produce neuroinflamación y neurodegeneración (Kantarci, K. y cols., 2020; Díaz-Zúñiga, J. y cols., 2020; Ishida, N. y cols., 2017; Poole, S. y cols., 2015). Uno de estos estudios (Díaz-Zúñiga, J. y cols., 2020), que indujo periodontitis experimental mediante inoculación palatina de *P. gingivalis*, evaluó la respuesta inflamatoria en los cerebros de las ratas, observando que las ratas con periodontitis experimental presentaron un incremento en IL-1 β , IL-6, TNF- α , así como una disminución de IL-4 e IL-10 en el hipocampo. Sin embargo, no está claro si la periodontitis induce neuroinflamación debido a la disbiosis oral, disbiosis intestinal o ambas (Sansores-España, L. y cols., 2021). Esto, debido a que tanto los modelos de ligadura como oral *gavage* generan disbiosis de la microbiota intestinal a través del eje *oral-gut* (Arimatsu, K. y cols., 2014; Sato, K. y cols., 2018; Jia, X. y cols., 2018; Huang, Y. y cols., 2020; Matsuda, Y. y cols., 2015; Paliot, D. y cols., 2019).

Existe evidencia que indica que las personas afectadas por enfermedades neurodegenerativas, como la EA, tienen una BHE disfuncional (Pan, W. y Kastin, A., 1999; Kebir, H. y cols., 2007; Song, J. y cols., 2015; Carter, C., 2017). Las células enterocromafin secretan catecolaminas, serotonina, norepinefrina, dinorfina y citoquinas en el lumen intestinal en respuesta a los cambios tanto en la concentración de nutrientes como en el equilibrio de las bacteria en la microbiota intestinal (Rhee, S., 2009). Además, las fibras nerviosas del intestino pueden responder tanto a los mecanismos de patogenicidad bacteriana como a las citoquinas liberadas por las células inmunitarias después del reconocimiento de bacterias patógenas, haciendo del eje intestino-cerebro una comunicación más compleja (Ramírez, V. y cols., 2020). Las fibras aferentes vagales transmiten señales periféricas hacia las áreas anteriores del cerebro que contienen neuronas reguladoras de respuestas inmunitarias e inflamatorias (Sansores-España, L. y cols., 2021), y en respuesta a esto, la permeabilidad de la BHE puede aumentar para favorecer la eliminación de mediadores cerebrales pro-inflamatorios (Song, J. y cols., 2015). Al analizar si las bacterias orales pueden ingresar en el cerebro de las personas afectadas por la EA, los estudios experimentales y algunos estudios descriptivos han demostrado que puede ser posible (Poole, S. y cols., 2015; Sansores-España, L. y cols., 2021). Hasta la fecha, ninguno de ellos ha determinado

la posible vía mediante la cual sucede esta migración bacteriana (Sansores-España, L. y cols., 2021).

En nuestro estudio actual, observamos inflamación y disrupción de la barrera intestinal, lo que nos llevó a realizar un ensayo de permeabilidad para evaluar la posible alteración funcional del intestino. En un intestino con una barrera intestinal saludable, no debieran pasar moléculas de tamaño superior a 300 Da por la vía paracelular (Sun, Z. y cols., 1998). Para este estudio se utilizó FITC-dextrano, donde FITC corresponde a una proteína de color verde fluorescente, y el dextrano es un polisacárido inerte de 4kDa de tamaño (Wang, L. y cols., 2015). Es por esto, que detectamos niveles de FITC-dextrano en distintos tejidos como marcador de permeabilidad. En el grupo experimental, observamos un aumento significativo de FITC-dextrano en el suero, con una concentración mayor del marcador en la mucosa intestinal del íleon, indicando un aumento en la permeabilidad. No se observaron diferencias en las concentraciones de FITC en el riñón, indicando que no hay variaciones en la cantidad excretada vía renal. Sin embargo, encontramos menores niveles en la orina, indicando que las ratas afectadas por *oral gavage* secretan una menor concentración de FITC-dextrano que las controles, lo que sugiere una migración del marcador a otras partes del organismo. Para determinar la posible migración del FITC-dextrano desde el suero, se aisló el hipocampo, mesencéfalo, cerebelo y corteza cerebral de los animales, se cuantificó la concentración de FITC-dextrano y se calculó el índice de permeabilidad. No observamos aumentos en el índice de permeabilidad en ninguno de los tejidos cerebrales de las ratas *oral gavage* en comparación con el grupo de control. Además, no se evidenció un incremento en la acumulación de las moléculas de Dextrano en los cortes, sugiriendo que la integridad de la barrera hematoencefálica no parece estar comprometida.

Nuestro estudio indica que *oral gavage* de *P. gingivalis* luego de 30 días produce inflamación, disrupción de la barrera intestinal y alteración de la funcionalidad. Aunque no se observa una disfunción en la BHE, queda por determinar a qué lugares está difundiendo el dextrano y cómo las alteraciones intestinales afectan al resto del organismo mediante *oral gavage*. Es por esto, que en futuros estudios se puede evaluar a qué lugares del organismo están difundiendo estas partículas de mayor tamaño.

7. CONCLUSIONES.

1. *Oral gavage* de *P. gingivalis* induce alteraciones en la integridad de la barrera intestinal, en la permeabilidad e inflamación intestinal.
2. *Oral gavage* de *P. gingivalis* provoca un aumento en los niveles de secreción de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β y TNF- α en el intestino delgado sin presencia de periodontitis.
3. Existe una alteración de la integridad estructural y funcional de la barrera intestinal, en ratas Sprague-Dawley macho sometidas a *oral gavage* de *P. gingivalis*
4. Las ratas sometidas a *oral gavage* de *P. gingivalis* desarrollan inflamación y alteraciones en la permeabilidad intestinal sin la presencia de periodontitis.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, C., Guilarte, M., Vicario, M., Ramos, L., Ramadan, Z. y cols. (2008). Maladaptive intestinal epithelial responses to life stress may predispose healthy women to gut mucosal inflammation. *Gastroenterology*, *135*, 163–172. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.036.

Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M. y cols. (2014). Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alterations of gut microbiota. *Scientific Reports*, *6*, 4828. doi: 10.1038/srep04828.

Asmar, R., Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T. y cols. (2002). Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, *123*, 1607–1615. doi: 10.1053/gast.2002.36578.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y. y cols. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*, *500*, 232–236. doi: 10.1038/nature12331.

Boutaga, K., Savelkoul, P., Winkel, E. y van Winkelhoff, A. (2007). Comparison of subgingival bacteria sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Periodontology*, *78*, 79–86. doi: 10.1902/jop.2007.060078.

Cani, P., Amar, J., Iglesias, M., Poggi, M., Knauf, C. y cols. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*, 1761–1772. doi: 10.2337/db06-1491.

Carter, C. (2017). Genetic, transcriptome, proteomic, and epidemiological evidence for blood-brain barrier disruption and polymicrobial brain invasion as determinant factors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, *1*, 125–157. doi:10.3233/adr-170017.

Cassir, N., Benamar, S. y La Scola, B. (2015). *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*, 37–45. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.014.

Choi, J. y Seymour, G. (2010). Vaccines against periodontitis: A forward-looking review. *Journal of Periodontal & Implant Science*, *40*, 153–63. doi: 10.5051/jpis.2010.40.4.153.

Ciccia, F., Guggino, G., Rizzo, A., Alessandro, R., Luchetti, M. y cols. (2017). Dysbiosis and zonulin upregulation alter gut epithelial and vascular barriers in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*, 1123–1132. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210000.

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. doi: 10.3389/fimmu.2020.588036.

Diogenes, A., Ferraz, C., Akopian, A., Henry, M. y Hargreaves, K. (2011). LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *Journal of Dental Research*, 90, 759–764. doi: 10.1177/0022034511400225.

Fasano, A. (2011). Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, 91, 151–175. doi: 10.1152/physrev.00003.2008.

Feng, Y., Wu, Q., Peng, Y., Liang, F., You, H. y cols. (2020). Oral *P. gingivalis* impairs gut permeability and mediates immune responses associated with neurodegeneration in LRRK2 R1441G mice. *Journal of Neuroinflammation*, 17, 347. doi: 10.1186/s12974-020-02027-5.

Fournier, B. y Parkos, C. (2012). The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, 5, 354–366. doi: 10.1038/mi.2012.24.

Futosi, K., Fodor, S. y Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*, 17, 638–650. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034.

Garlet, G. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89, 1349–1363. doi: 10.1177/0022034510376402.

Go, M., Kou, J., Lim, J., J. TYang, J. y and K. Fukuchi, K. (2016). Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model: Implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479, 331–337. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.073.

Gottardi, C., Arpin, M., Fanning, A. y and Louvard, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 10779–10784. doi: 10.1073/pnas.93.20.10779.

Hagihara, M., Kuroki, Y., Ariyoshi, T., Higashi, S., Fukuda, K. y cols. (2020). *Clostridium butyricum* modulates the microbiome to protect intestinal barrier function in the mice with antibiotic-induced dysbiosis. *iScience*, 23, 100772. doi: 10.1016/j.isci.2019.100772.

Hahn, J., Knopf, J., Maueröder, C., Kienhöfer, D., Leppkes, M., y cols. (2016). Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34, 6–8.

Hajishengallis, G. (2012). The keystone pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(10), 717–725. doi:10.1038/nrmicro2873.

Hajishengallis, G. (2014). Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends in Immunology*, *35*, 3–11. doi: 10.1016/j.it.2013.09.001.

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *15*, 30–44. doi: 10.1038/nri3785.

Hamamoto, Y., Ouhara, K., Munenaga, S., Shoji, M., Ozawa, T. y cols. (2020). Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model. *Arthritis Research & Therapy*, *22*, 249. doi: 10.1186/s13075-020-02348-z.

Hayashi, K., Hasegawa, Y., Takemoto, Y., Cao, C., Takeya, H. y cols. (2019). Continuous intracerebroventricular injection of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces systemic organ dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, *120*, 1–5. doi: 10.1016/j.exger.2019.02.007.

Hill, A. y Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual Review in Immunology*, *28*, 623–667. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101330.

Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C. y cols. (2009). Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* *73*, 768–774. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95.

Huang, Y., Liao, Y., Luo, B., Li, L., Zhang, Y. y cols. (2020). Non-surgical periodontal treatment restored the gut microbiota and intestinal barrier in apolipoprotein E-/- mice with periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 498. doi: 10.3389/fcimb.2020.00498.

Hujoel, P., White, B., García, R. y Listgarten, M. (2001). The dentogingival epithelial surface area revisited. *Journal of Periodontal Research*, *36*, 48–55. doi: 10.1034/j.1600-0765.2001.00011.x.

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. doi: 10.1038/s41514-017-0015-x.

Ivanov, I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E., Shima, T. y cols. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, *139*, 485–498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.

Jang, H., Lee, H., Jang, S., Han, M. y Kim, D. (2018). Evidence for interplay among antibacterial-induced gut microbiota disturbance, neuro-inflammation, and anxiety in mice. *Mucosal Immunology* 11, 1386–1397. doi: 10.1038/s41385-018-0042-3.

Jia, X., Jia, L., Mo, L., Yuan, S., Zheng, X. y cols. (2018). Berberine ameliorates periodontal bone loss by regulating gut microbiota. *Journal of Dental Research*, 98, 107–116. doi: 10.1177/0022034518797275.

Kaelberer, M., Buchanan, K., Klein, M., Barth, B., Montoya, M. y cols. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, 361, 5236. doi: 10.1126/science.aat5236.

Kamer, A., Craig, R., Dasanayake, A., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L. y cols. (2008). Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's & Dementia Journal*, 4, 242–250. doi: 10.1016/j.jalz.2007.08.004.

Kantarci, K., Tongoni, C., Yaghmoor, W., Marghalani, A., Sptephens, D. y cols. (2020). Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Nature Research*, 10, 18561. doi: 10.1038/s41598-020-75517-4.

Kato, T., Yamazaki, K., Nakajima, M., Date, Y., Kikuchi, J. y cols. (2018). Oral administration of *Porphyromonas gingivalis* alters the gut microbiome and serum metabolome. *American Society for Microbiology*, 3, 460–478. doi: 10.1128/mSphere.00460-18.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R. y cols. (2007). Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, 13, 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651.

Kobayashi, R., Ogawa, Y., Hashizume-Takizawa, T. y Kurita-Ochiai, T. (2020). Oral bacteria affect the gut microbiome and intestinal immunity. *Pathology Disease*, 78, 024. doi: 10.1093/femspd/ftaa024/5854192.

Komazaki, R., Katagiri, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Shiba, T. y cols. (2017). Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Scientific Reports*, 7, 13950. doi: 10.1038/s41598-017-14260-9.

Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fak, F., Stombaugh, J. y cols. (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4592–4598. doi: 10.1073/pnas.1011383107.

Kurita-Ochiai, T., Fukushima, K. y Ochiai, K. (1995). Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *Journal of Dental Research*, 74, 1367–1373. doi: 10.1177/00220345950740070801.

Kwon, S., Iba, M., Kim, C. y Masliah, E. (2020). Immunotherapies for aging-related neurodegenerative diseases—Emerging perspectives and new targets. *Neurotherapeutics*, *17*, 935–954. doi: 10.1007/s13311-020-00853-2.

Ley, R., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C., Knight, R. y cols. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*, 11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102.

Li, N. y Collyer, C. (2011). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - Complex domain structures confer diverse functions. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *1*, 41–58. doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.7.

Lin, T., Liu, G., Perez, E., Rainer, R., Febo, M. y cols. (2018). Systemic inflammation mediates age-related cognitive deficits. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*, 236. doi: 10.3389/fnagi.2018.00236.

Lourenço, T., Spencer, S., Alm, E. y Colombo, A. (2018). Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: An exploratory study. *Journal of Oral Microbiology*, *10*, 1487741. doi: 10.1080/20002297.2018.1487741.

Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H. y cols. (2009). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, *9*, 123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.

Massey-Harroche, D. (2000). Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microscopy Research & Technique*, *49*, 353–362. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(20000515)49:4<353::AID-JEMT4>3.0.CO;2-8.

Matsuda, Y., Kato, T., Takahashi, N., Nakajima, M., Arimatsu, K. y cols. (2015). Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *Journal of Periodontal Research*, *51*, 639–649. doi: 10.1111/jre.12344.

Meurman, J., Sanz, M. y Janket, S. (2004). Oral health atherosclerosis and cardiovascular disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *15*, 403–413. doi: 10.1177/154411130401500606.

Mills, C., Kincaid, K., Alt, J., Heilman, H. y Hill, M. (2000). M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology* *164*, 6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

Moreira-Lopes, T., Mosser, D. y and Gonçalves, R. (2020). Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflammation Research*, *69*, 1163–1172. doi: 10.1007/s00011-020-01398-y.

Mowat, A., y Agace, W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, *14*(10), 667–685. doi: 10.1038/nri3738.

Müller, P., Koscsó, B., Rajani, G., Stevanovic, K., Berres, M. y cols. (2014). Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*, 158,300–313. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.002.

Nakajima, M., Arimatsu, K., Kato, T., Matsuda, Y., Minagawa, T. y cols. (2015). Oral administration of *P. gingivalis* induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. *Plos One*, 10(7), e0134234. doi: 10.1371/journal.pone.0134234.

Neufeld, K., Bienenstock, J., Bharwani, A., Champagne-Jorgensen, K., Mao, Y. y cols. (2019). Oral selective serotonin reuptake inhibitors activate vagus nerve dependent gut-brain signalling. *Scientific Reports*, 9, 14290. doi: 10.1038/s41598-019-50807-8.

Offenbacher, S., Lieff, S., Boggess, K., Murtha, A., Madianos, P. y cols. (2001). Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Annals of Periodontology*, 6, 164–174. doi: 10.1902/annals.2001.6.1.175.

Ohtsu, A., Takeuchi, Y., Katagiri, S., Suda, W., Maekawa, S., y cols. (2019). Influence of *Porphyromonas gingivalis* in gut microbiota of streptozotocin-induced diabetic mice. *Oral Diseases*, 25, 868–880. doi: 10.1111/odi.13044.

Palioto, D., Finoti, L., Kinane, D. y Benakanakere, M. (2019). Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 819–829. doi: 10.1111/jcpe.13151.

Pan, W. y Kastin, A. (1999). Penetration of neurotrophins and cytokines across the blood-brain/blood-spinal cord barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 291–298. doi:10.1016/s0169-409x(98)00086-6.

Park, B. y and J.O. Lee, J. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45, 66. doi: 10.1038/emm.2013.97.

Pike, R., McGraw, J., Potempa, J. y Travis, J. (1994). Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1007–10. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42365-9.

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

Potempa, J., Pike, R. y Travis, J. (1995). The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the

presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infection and Immunity*, 63, 1176–82. doi: 10.1128/IAI.63.4.1176-1182.1995.

Poveda-Roda, R., Jiménez, Y., Carbonell, E., Gavaldá, C., Margaix-Muñoz, M. y cols. (2008). Bacteremia originating in the oral cavity. A review. *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal*, 13, 355–362.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. y cols. (2010). A human gut microbiota gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65. doi: 10.1038/nature08821.

Ramakrishna, C., Kujawski, M., Chu, H., Li, L., Mazmanian, S. y cols. (2019). *Bacteroides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. *Nature Communications*, 10, 2153. doi: 10.1038/s41467-019-09884-6.

Raybould, H., Cooke, H. y Christofi, F. (2004). Sensory mechanisms: Transmitters, modulators and reflexes. *Neurogastroenterology & Motility*, 16, 60–63. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00477.x.

Rhee, S. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews in Gastroenterology and Hepatology*, 6, 306–314. doi: 10.1038/nrgastro.2009.35.

Rousseaux, S., y Khochbin, S. (2015). Histone acylation beyond acetylation: Terra Incognita in chromatin biology. *Cell Journal*, 17, 1–16. doi: 10.22074/cellj.2015.506.

Sansores-España, L., Melgar-Rodríguez, S., Olivares-Sagredo, K., Cafferata, E., Martínez-Aguilar, V. y cols. (2021). Oral-gut-brain axis in experimental models of periodontitis: Associating gut dysbiosis with neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging*, 2. doi: 10.3389/fragi.2021.781582.

Sato, K., Takahashi, N., Kato, T., Matsuda, Y., Yokoji, M. y cols. (2017). Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Scientific Reports*, 7, 6955. doi: 10.1038/s41598-017-07196-7.

Sato, K., Yokoji, M., Yamada, M., Nakajima, T. y Yamazaki, K. (2018). An orally administered oral pathobiont and commensal have comparable and innocuous systemic effects in germ-free mice. *Journal Periodontal Research*, 53, 950–960. doi: 10.1111/jre.12593.

Song, J., Wu, C., Korpos, E., Zhang, X., Agrawal, S. y cols. (2015). Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. *Cell Reports*, 10, 1040–1054. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.037.

Sperandio, V., Torres, A., Jarvis, B., Nataro, J. y Kaper, J. (2003). Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*, 8951–8956. doi: 10.1073/pnas.1537100100.

Sturgeon, C. y Fasano, A. (2016). Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*, *4*, 1251384. doi: 10.1080/21688370.2016.1251384.

Sun, Z., Wang, X., y Andersson, R. (1998). Role of intestinal permeability in monitoring mucosal barrier function. *Digestive Surgery*, *15*(5), 386–397. doi: 10.1159/000018651.

Szentirmai, E., Millican, N., Massie, A. y Kapás, L. (2019). Butyrate, a metabolite of intestinal bacteria, enhances sleep. *Scientific Reports*, *9*, 7035. doi: 10.1038/s41598-019-43502-1.

Tajik, N., Frech, M., Schulz, O., Schälter, F., Lucas, S. y cols. (2020). Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nature Communications*, *11*, 1995. doi: 10.1038/s41467-020-15831-7.

Turner, J. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *9*, 799–809.

Van de Wouw, M., Schellekens, H., Dinan, T. y Cryan, J. (2017). Microbiota-gut-brain axis: Modulator of host metabolism and appetite. *Journal of Nutrition*, *147*, 727–745. doi: 10.3945/jn.116.240481.

Vernal, R., León, R., Herrera, D., Garcia-Sanz, J., Silva, A. y cols (2008). Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research* *43*(6), 689–697. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01073.x.

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

Von Troil-Lindén, B., Torkko, H., Alaluusua, S., Jousimies-Somer, H. y Asikainen, S. (1995). Salivary levels of suspected periodontal pathogens in relation to periodontal status and treatment. *Journal of Dental Research*, *74*, 1789–1795. doi: 10.1177/00220345950740111201.

Wadachi, R. y Hargreaves, K. (2005). Trigeminal Nociceptors express TLR-4 and CD14: A mechanism for pain due to infection. *Journal of Dental Research*, *85*, 49–53. doi: 10.1177/154405910608500108.

Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A., Chen, P., y Schnabl, B. (2015). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver

disease. *Journal of Immunological Methods*, 421, 44–53. doi: 10.1016/j.jim.2014.12.015.

Wang, F., Liu, J., Luo, H., Liu, A. y Jiang, Y. (2015). Potential protective effects of *Clostridium butyricum* on experimental gastric ulcers in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 8340–8351. doi: 10.3748/wjg.v21.i27.8340.

Wang, T., Holt, M. y Young, N. (2018). Early butyrate induced acetylation of histone H4 is proteoform specific and linked to methylation state. *Epigenetics*, 13, 519–535. doi: 10.1080/15592294.2018.1475979.

Wang, Y., Gu, Y., Fang, K., Mao, K., Dou, J. y cols. (2018). *Lactobacillus acidophilus* and *Clostridium butyricum* ameliorate colitis in murine by strengthening the gut barrier function and decreasing inflammatory factors. *Beneficial Microbes*, 9, 775–787. doi: 10.3920/BM2017.0035.

West, A., Brodsky, I., Rahner, C., Woo, D., Erdjument-Bromage, H. y cols. (2011). TLR signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 472, 476–480. doi: 10.1038/nature09973.

Xue, L., Zou, X., Yang, X., Peng, F., Yu, D. y cols. (2020). Periodontitis induces microbiota-gut-brain axis disorders and cognitive impairment in mice. *Experimental Neurology*, 326, 113176. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113176.

Zheng, H., Heiderscheidt, C., Joo, M., Gao, X., Knezevic, N. y cols. (2010). MYD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands. *European Journal of Immunology*, 40, 162–171. doi: 10.1002/eji.200839156.

9. ANEXOS



Santiago, a 16 de noviembre de 2017

Certificado n°: **17085-ODO-UCH**

CERTIFICADO

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

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

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

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

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



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

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl