



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA.  
CENTRO DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS AVANZADAS.**

**EFFECTO DE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL EN LA INTEGRIDAD E  
INFLAMACIÓN INTESTINAL Y NEUROINFLAMACIÓN**

**Oscar David Santana Zuleta**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Asociado Dr. Jaime Díaz Zúñiga**

**Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2021-2023, FIOUCh C019-04, RDP-IADR  
2023-2025 y DIUDA Regular 22433**

**Santiago Chile**

**2024**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA.  
CENTRO DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS AVANZADAS.**

**EFFECTO DE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL EN LA INTEGRIDAD E  
INFLAMACIÓN INTESTINAL Y NEUROINFLAMACIÓN**

**Oscar David Santana Zuleta**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Asociado Dr. Jaime Díaz Zúñiga**

**Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2021-2023, FIOUCh C019-04, RDP-IADR  
2023-2025 y DIUDA Regular 22433**

**Santiago Chile**

**2024**

## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que fueron fundamentales y brindaron su apoyo y confianza durante mi formación profesional como odontólogo, convirtiendo este proceso en una experiencia tremendamente valiosa.

A los proyectos RDP-IADR 2021-2023, FIOUCH C019-04, RDP-IADR 2023-2025 y DIUDA Regular 22433 por haberme permitido realizar mi tesis.

A mi tutor, el Dr. Jaime Díaz Zúñiga, por su confianza, paciencia y excelente capacidad docente, ejerciendo nuestra profesión de manera ejemplar.

A mi familia: A mi padre Oscar por su determinación y confianza inquebrantable, por compartir las alegrías y las angustias de esta carrera, por su entrega total a mis necesidades y por dar todo y más a lo largo de nuestras vidas. A mi madre Maritza, por darme siempre el cobijo ante las adversidades, por entregarme su astucia en los desafíos y confiar siempre en el éxito de lo que me proponga. A mi hermana Valeria, por compartir su vida, siempre con alegría, por convivir el proceso universitario entregando consejos y comprensión, también a sus amistades, que se han convertido en las mías. A Coffy, Jazún y Jodi, por siempre entregar la alegría en el hogar acompañando fielmente en todos los momentos.

A mis abuelos: A Eduardo Zuleta, quien fue el primero en confiar de manera excepcional en mis capacidades como profesional, por entregar su cariño y por querer dejar en mis manos su salud oral, agradezco profundamente su gentileza y que pese a su ausencia en estos días, lo que soy y en lo que me convierta profesionalmente es gracias a su confianza. A Oscar por estar presente, dando una ayudita siempre que fuera posible. A mi abuelita Chila, por estar siempre presente y por contribuir en todo lo que pudo, brindando su amor de forma incondicional.

A mi tía Luty, quien estuvo siempre preocupada de mi proceso, ofreciendo su ayuda cada vez que lo necesitaba, por sus consejos, su comprensión y amor. A mis tíos, padrinos y primos, por las risas y alegrías compartidas, por su apoyo y por ver en

mi desde un comienzo a un profesional exitoso, confiando sus dudas e inquietudes en mí. A Amalia, quien en mis primeros años, entrego de manera desinteresada más de lo que debía, por los ricos postres que preparo cuando estaba solo.

A mis amigos: Sebastián, Nicolás D., Daniel, Francisca, Sophya, Mónica, Nicolás F., Joshua y Giovanni. Quienes estuvieron desde el principio y hasta hoy en este camino. Por las risas, las anécdotas compartidas y el apoyo más cercano que tuve en lo que fue la universidad, dando siempre algún consejo. Por las penas y angustias, que muchas veces compartimos juntos y otras donde fueron mi consuelo. Por los logros alcanzados juntos y por su felicidad en los míos. A Fernanda, mi compañera de tesis, por el apoyo en este proceso.

A Rocío, por su entrega de amor y comprensión, por permitirme compartir sus vivencias conmigo, donde me ha apoyado de manera constante en mi formación, entregando su apoyo y confianza, hasta para extraerle muelas del juicio.

A toda la gente que trabaja en la universidad y que significo un espacio de conversación, risas y comprensión. A los docentes que entregaron algo especial, por ejercer sus funciones de manera ejemplar, que es una guía de lo que quiero convertirme algún día, por confiar en mis capacidades, dando espacios para el aprendizaje de manera óptima y entregar tranquilidad y paciencia en este proceso formativo.

Finalmente, agradecer a todos quienes de alguna u otra manera me apoyaron en mi proceso para convertirme en Odontólogo.

*Muchas gracias.*

## INDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>0</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
2.1 Periodontitis.....	1
2.2 Comunicación entre cavidad oral e intestino.....	2
2.3 Planteamiento del problema .....	4
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>6</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>6</b>
4.1 Objetivos específicos.....	6
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
5.1 Animales e inducción de periodontitis .....	7
5.2 Cultivo de crecimiento de bacterias.....	7
5.3 Obtención de muestras biológicas.....	8
5.4 Resorción ósea.....	8
5.5 Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios .....	9
5.6 Ensayo de permeabilización in vivo.....	9
5.7 Análisis mediante inmunofluorescencia .....	10
5.8 Análisis de los datos .....	10
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
6.1 Cuantificación de la resorción ósea .....	11
6.2 Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios .....	12
6.3 Análisis de inmunofluorescencia .....	13
6.4 Evaluación de la permeabilidad intestinal .....	16
6.5 Cuantificación de mediadores en hipocampo.....	20
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>29</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>10. ANEXOS. ....</b>	<b>45</b>
Anexo N°1.....	45
Anexo N°2.....	46

## 1. RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible que causa la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes. Recientemente, se demostró que algunos modelos de periodontitis pueden producir disbiosis o inflamación intestinal. De ellos, la inoculación palatina de *Porphyromonas gingivalis* desencadena neuroinflamación, pero no está claro si se debe a una acción directa de la periodontitis o a la inflamación intestinal. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la periodontitis inducida por la inoculación palatina de *P. gingivalis* en la inflamación intestinal, la barrera intestinal y la permeabilidad, y los posibles efectos en otros tejidos, como el cerebro. **Métodos:** A un total de 12 ratas Sprague-Dawley machos de 6 semanas de edad se inoculó en la mucosa palatina 100 µL de PBS con  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *P. gingivalis*, tres veces a la semana durante 30 días. Las ratas inoculadas con solución salina se consideraron como controles. Después de 30 días, 4 ratas por grupo se eutanasiaron para obtener muestras biológicas y cuantificar los mediadores pro-inflamatorios mediante ELISA en el suero, íleon e hipocampo. Otras 4 ratas por grupo fueron perfundidas transcárdialmente con paraformaldehído al 4% para analizar la presencia y distribución de zonula occludens 1, Claudina y ocludina-5 en el intestino delgado mediante inmunofluorescencia. Finalmente, en 4 ratas por grupo se administró FITC-Dextrano 4kDa por oral *gavage* y, después de 4 horas, se obtuvo suero, orina, riñones e hipocampo para determinar el grado de permeabilidad de la barrera intestinal. **Resultados:** las ratas afectadas por periodontitis presentaron inflamación intestinal caracterizada por un aumento en los mediadores pro-inflamatorios, alteración en la distribución y expresión de proteínas de unión adherente y aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal. También se detectó neuroinflamación y trazadores en el cerebro. **Conclusión:** la periodontitis es capaz de afectar el intestino y, probablemente como consecuencia, estar relacionada con la neuroinflamación.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Periodontitis*

La periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible asociada a biofilms de placa disbiótica subgingival. Se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente: ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular y, sin un oportuno tratamiento, puede llevar a la pérdida de los dientes afectando la calidad de vida de las personas (Hajishengallis, 2014; Morales y cols., 2020; Papapanou y cols., 2018). A nivel global, estados avanzados de esta enfermedad afectan a más de 700 millones de personas, siendo un problema de salud pública mundial (Bernabe y cols., 2020). Chile no es ajeno a esta realidad, según la última encuesta de salud nacional, la prevalencia de destrucción periodontal en Chile es superior al 85% en personas mayores de 35 años (Baeza y cols., 2020).

Los principales factores e indicadores de riesgo de la periodontitis son compartidos con las enfermedades crónicas no transmisibles (Morales y cols., 2016). Asimismo, la existencia de enfermedad periodontal en un individuo con una enfermedad crónica no transmisible puede agravar o propiciar su desarrollo, gracias a diversos procesos patogénicos (Pihlstrom y cols., 2005; Tonetti y Van Dyke, 2013). Además, la periodontitis se caracteriza por la producción local de múltiples moléculas pro-inflamatorias, las que difunden a la circulación periférica e inducen un fenotipo inflamatorio crónico de bajo grado, también conocido como *Chronic Low-Grade Inflammatory Phenotype* (Chen y cols., 2019; Hajishengallis, 2014, 2015).

La periodontitis es un desbalance de las interacciones entre las bacterias que conforman la microbiota con el sistema inmunológico y que puede ser modificada por factores propios de la persona o ajenos, es decir factores locales o ambientales (Chapple y cols., 2018; Fenesy, 1998). Así, mientras los mediadores pro-inflamatorios del hospedero se asocian con la destrucción de tejidos, los mediadores inmuno-moduladores contrarrestan y atenúan la progresión de la enfermedad, donde células inflamatorias tales como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T participan activamente (Garlet, 2010).

Mecánicamente, las bacterias periodontales colonizan la cavidad oral e invaden el tejido conectivo subyacente al epitelio del saco periodontal (Garlet, 2010; Liccardo y cols., 2020). Desde ahí, tanto las bacterias como sus mecanismos de patogenicidad pueden ingresar a la circulación sanguínea o linfática, pudiendo llegar a distintos tejidos u órganos (Garlet, 2010; Liccardo y cols., 2020).

Hay aproximadamente 800 especies de bacterias identificadas en la cavidad oral, (Ashby y cols., 2009) de las cuales, los colonizadores primarios de las superficies orales son predominantemente anaerobios facultativos como los *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp. (Lamont y cols., 2018). En efecto, en el sitio periodontal, la reducción de las tensiones de oxígeno favorece los cambios de población bacteriana con una mayor abundancia de anaerobios estrictos como aquellos pertenecientes a la familia *Bacteroidaceae* spp. y phylum *Spirochaetes* spp. (Lamont y cols., 2018). Así, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Filifactor alocis* se definen como las bacterias más frecuentemente asociadas a la disbiosis de la microbiota subgingival (Hajishengallis, 2014; Lamont y cols., 2018). Ciertos mecanismos de patogenicidad como el lipopolisacárido (LPS), DNA o, incluso, bacterias *ad integrum*, tales como *P. gingivalis* se han identificado en el líquido amniótico, en la capa íntima de la arteria carótida, en placas de ateromas, en la *decidua basalis* de la placenta y, recientemente, en el líquido cerebro espinal y IV ventrículo cerebral (Fischer y cols., 2019; Sansores-España y cols., 2021; Sayuri y cols., 2018; Szulc y cols., 2015; Vanterpool y cols., 2016). En este contexto, ciertas bacterias orales se asocian con un mayor riesgo de parto prematuro y bajo peso al nacer, aterogénesis, resistencia periférica a la insulina, hígado graso y recientemente, con la enfermedad inflamatoria intestinal (Hajishengallis, 2015; Sansores-España y cols., 2021; Szulc y cols., 2015).

## **2.2 Comunicación entre cavidad oral e intestino.**

La evidencia sugiere un posible eje “oral-intestino” en el contexto de la patogénesis de enfermedades gastrointestinales, como la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer colorrectal (Garlet, 2010). Estas observaciones sugieren la posibilidad de que los procesos inflamatorios que ocurren en las mucosas bucal e intestinal estén

conectados de alguna manera (Kitamoto y cols., 2020). En este contexto, las bacterias residentes de la cavidad oral pertenecientes a las familias *Fusobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* y *Veillonellaceae*, están enriquecidas en los tejidos mucosos de los pacientes con inflamación intestinal (Gevers y cols., 2014). Dado que la mucosa oral y la mucosa colónica están conectadas físicamente, las bacterias orales ingeridas probablemente se trasladen a las áreas distales del tracto gastrointestinal (Kitamoto y cols., 2020).

Estudios recientes en humanos han demostrado que la cantidad de bacterias presentes en la saliva es de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL, lo que significa que una persona afectada de periodontitis deglute alrededor de  $10^{12}$ - $10^{13}$  UFC/mL de bacterias anaerobias al día (Arimatsu y cols., 2014; Boutaga y cols., 2007; Saygun y cols., 2011; von Troil-Lindén y cols., 1995). Por otro lado, después de inocular ratones con  $10^9$  UFC/mL de *P. gingivalis* por sonda oral, a las 3 horas, esta bacteria se detectó en el íleon y, a las 16 horas en el colon, induciendo disbiosis intestinal poco después de ser ingerida (Arimatsu y cols., 2014). Así, la presencia de periodontitis y la consiguiente deglución de altas cargas de bacterias anaerobias en ratones genera desequilibrios en la microbiota intestinal (Arimatsu y cols., 2014).

La microbiota intestinal es un ecosistema que incluye todas las especies bacterianas que colonizan transitoria o permanentemente el tracto gastrointestinal. En individuos sanos, el intestino está poblado principalmente por una microbiota compuesta por bacterias anaerobias estrictas dentro de dos filos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Irrazábal y cols., 2014; Winter y cols., 2013). El balance de estos microorganismos puede desequilibrarse por una serie de factores externos e internos que se caracteriza por una marcada disminución en la representación de bacterias anaerobias estrictas y una mayor abundancia relativa de bacterias anaerobias facultativas, que pueden incluir microorganismos potencialmente dañinos que inducen procesos inflamatorios (Senghor y cols., 2018; Winter y cols., 2013). De esta forma, un tipo particular de célula en el intestino, las células enterocromafines, detectan permanentemente las bacterias patógenas invasoras (Bellono y cols., 2017). Las bacterias asociadas con la disbiosis se pueden reconocer por las células enterocromafin que liberan citoquinas y neurotransmisores

a las fibras aferentes del nervio vago e inducen una respuesta neuro-inmuno-inflamatoria intestinal (Raybould y cols., 2004).

La disbiosis intestinal implica perturbación del estado de simbiosis y se reconoce por cambios cualitativos o cuantitativos en la composición y funciones de la microbiota (Álvarez y cols., 2021). También la microbiota intestinal ejerce un rol clave en el proceso digestivo y la regulación metabólica del hospedero, el que estaría afectado en un estado disbiótico (Álvarez y cols., 2021). Por otro lado, la microbiota influye sobre el sistema neuroendocrino, ya que contribuye a funciones tan diversas como la regulación del balance energético, así como otras que dependen del sistema nervioso, incluyendo funciones cognitivas, estado de ánimo y comportamiento (Álvarez y cols., 2021). La microbiota también interviene de forma directa o indirecta en la síntesis de compuestos neuroactivos, incluidos distintos neurotransmisores como la serotonina que es clave en la regulación del estado de ánimo, el apetito y las funciones cognitivas y a nivel intestinal regula la inflamación y la motilidad (Agustí y cols., 2018). La microbiota intestinal puede estar asociada tanto en la reducción como aumento de los niveles de serotonina (Álvarez y cols., 2021). Así, la disbiosis de la microbiota intestinal se asocia a una amplia variedad de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, metabólicas y neoplásicas y con algunos trastornos de la conducta (Álvarez y cols., 2021), entre ellos se encuentra el hígado graso no alcohólico, la enfermedad celíaca, el síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal y obesidad (Agustí y cols., 2018; Icaza-Chávez, 2013; Winter y cols., 2013). Además, se ha estudiado que la microbiota de un hospedero puede aumentar, disminuir o no tener ningún efecto sobre la susceptibilidad al cáncer (Garrett, 2015). En efecto, existe evidencia que demuestra la influencia de algunas bacterias orales como *F. nucleatum* en el proceso de carcinogénesis asociada al adenocarcinoma de colon (Keku y cols., 2013; Rubinstein y cols., 2019).

### **2.3 Planteamiento del problema**

En los últimos años, la evidencia ha demostrado que las enfermedades crónicas no transmisibles de la cavidad oral están asociadas con la disbiosis de la microbiota intestinal (Liccardo y cols., 2020). Sin embargo, no se esclarece aún hasta qué

punto la inflamación periodontal influye en las enfermedades gastrointestinales (Kitamoto y cols., 2020). Esto ha permitido el diseño de estudios experimentales para evaluar la posible asociación entre la disbiosis oral y otras enfermedades (Liccardo y cols., 2020). En este contexto, estudios transversales y longitudinales demuestran que la periodontitis está estrechamente asociada con el deterioro cognitivo (Díaz-Zúñiga y cols., 2020; Dominy y cols., 2019; Feng y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Ilievski y cols., 2018; Kantarci y cols., 2020; Poole y cols., 2014; Singhrao y cols., 2017). Por otro lado, la microbiota intestinal es un factor determinante en la formación y modulación de la respuesta del sistema inmune (Schirmer y cols., 2016). Las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal causadas por cambios en la dieta, exposición a antibióticos e infecciones conducen a disbiosis que pueden promover aún más el desarrollo de otras enfermedades, tales como cáncer colorrectal, obesidad, diabetes, insuficiencia cardíaca y enfermedades neurodegenerativas (Narengaowa y cols., 2021).

Estudios en ratones demuestran que la periodontitis experimental inducida por ligadura en ratones, agrava la inflamación intestinal, donde *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp., propias de la mucosa oral, pueden trasladarse al intestino y colonizarlo transitoriamente (Gevers y cols., 2014; Kitamoto y cols., 2020). Además, la periodontitis es capaz de inducir la alteración de la microbiota intestinal, la pérdida de integridad intestinal o la respuesta inmune pro-inflamatoria y desencadenar la disbiosis de la microbiota intestinal por cambios cuantitativos en *Clostridium* spp., *Firmicutes* spp, *Bacteroidetes* spp. o *Lactobacillus* spp. (Arimatsu y cols., 2014; Hamamoto y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Jia y cols., 2019; Kobayashi y cols., 2020; Nakajima y cols., 2015; Ohtsu y cols., 2019; Sato y cols., 2018). Además, en los linfonodos mesentéricos o cervicales y en la mucosa del intestino se vió un incremento en la razón de linfocitos Th17/Treg o macrófagos M1/M2 infiltrantes, lo que se tradujo en una respuesta inflamatoria (Kobayashi y cols., 2020; Sato y cols., 2018). Cuando las bacterias orales están en el intestino, las células presentadoras de antígeno reconocen los mecanismos de patogenicidad, los procesan y presentan a los linfocitos T, los que se diferencian a los fenotipos Th1 y Th17, contribuyendo a la inflamación intestinal (Kitamoto y cols., 2020).

Otros estudios han demostrado que la periodontitis inducida por el oral *gavage* y la ligadura inducen enfermedad de Alzheimer y disbiosis intestinal (Arimatsu y cols., 2014; Huang y cols., 2020; Jia y cols., 2019; Matsuda y cols., 2016; Palioto y cols., 2019; Sato y cols., 2018). Debido a que la microbiota oral e intestinal son diferentes, las bacterias orales que ingresan al tracto gastrointestinal pueden cambiar la conformación de la comunidad microbiana intestinal, dando lugar a disbiosis intestinal que producirá la inflamación de los tejidos intestinales (Narengaowa y cols., 2021). Así, resulta interesante investigar si la periodontitis inducida por inoculación palatina produce eventos neuroinflamatorios de manera independiente a la disbiosis de la microbiota intestinal o por eventos producidos por la propia bacteria.

### **3. HIPÓTESIS**

La periodontitis experimental inducida por inoculación palatina en ratas Sprague-Dawley wild-type es capaz de generar neuroinflamación en animales jóvenes. Este efecto de la inoculación de las bacterias en el paladar sobre el cerebro no afectaría al intestino al ser una inoculación local sin posibilidad de deglución, lo que produciría neuroinflamación sin afectar la integridad de la barrera intestinal. De esta manera existiría una posible comunicación oral-cerebral.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la periodontitis inducida por inoculación palatina de *P. gingivalis* sobre la inflamación intestinal, la barrera intestinal, la permeabilidad, y neuroinflamación en el hipocampo.

#### ***4.1 Objetivos específicos***

1. Determinar la integridad estructural y función de la barrera intestinal en ratas Sprague-Dawley macho afectadas o no de periodontitis experimental.
2. Cuantificar la presencia de mediadores pro-inflamatorios IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el intestino delgado e hipocampo de ratas Sprague-Dawley afectadas o no de periodontitis experimental.

3. Correlacionar la presencia de periodontitis con la presencia o ausencia de inflamación en el hipocampo e intestino y alteraciones en la permeabilidad intestinal.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Animales e inducción de periodontitis

Los grupos experimentales y controles estuvieron compuestos por ratas Sprague-Dawley de 6 semanas de edad (jóvenes) obtenidas con autorización del CICUA (Anexo N°1) del Laboratorio de Aprendizaje, Memoria y Neuromodulación del Depto de Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas fueron alojadas en ambiente controlado con luz de 12 h ciclo de oscuridad, a  $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 40-70% de humedad relativa, con comida y agua ad libitum, excepto cuando se indique lo contrario en el bioterio de la Facultad de Ciencias de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Todos los animales se manipularon diariamente durante 2 semanas antes de la inoculación bacteriana. Todas las ratas se anestesiaron con isoflurano al 3% v/v en un flujo de 1 L de oxígeno para poder realizar los procedimientos. Los grupos estuvieron compuestos de la siguiente manera: Grupo 1 de periodontitis inducida por inoculación palatina conformado por 12 ratas a las que se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de  $1\times 10^{10}$  UFC/mL de la cepa W83 (serotipo K1) de *P. gingivalis* en mucosa palatina, frente al primer molar superior derecho. La inoculación se realizó 3 veces por semana por 30 días, desde el día 1 hasta el día 30. Grupo 2 de control sin bacterias conformada por 12 ratas a las que se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de PBS sin bacterias, 3 veces por 30 días, constituyendo el control sham.

### 5.2 Cultivo de crecimiento de bacterias

La cepa W83 de *P. gingivalis* (serotipo K1) se cultivó de acuerdo con las condiciones especificadas en nuestros estudios previos (Díaz-Zúñiga et al, 2020). Brevemente, la cepa de *P. gingivalis* W83 (K1) se cultivó en medio agar infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) a  $37^{\circ}\text{C}$  en condiciones de capnofilia (8%  $\text{O}_2$  y 12%  $\text{CO}_2$ ), usando el generador CampyGen™ (Oxoid Ltd). La cepa bacteriana se cultivó en 10 mL de caldo de cultivo BHI suplementado con hemina y menadiona hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en

espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm (Halo RB-10 UV-VIS Spectrophotometer, Dynamica, Germany). Lecturas de espectrofotómetro adicionales se midieron en distintos tiempos hasta que el microorganismo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO se tomó una muestra de 100  $\mu\text{L}$ , la que se diluyó de forma seriada ( $\log_{10}$ ) en tampón fosfato salino (PBS) y 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución se sembró en agar sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona. Luego de 5-7 días, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y contrastó con las densidades ópticas correspondientes. Las curvas DO *versus* tiempo y DO *versus* UFC se graficaron para obtener un número conocido de bacterias en fase de crecimiento exponencial para realizar la inoculación con una concentración conocida de bacterias. Mediante esta curva se logró determinar que a una DO de 1,6 a 1,7 nm, equivalen a  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL.

### **5.3 Obtención de muestras biológicas**

4 ratas de cada grupo se eutanasiaron por dislocación cervical y se obtuvieron inmediatamente las muestras de intestino delgado e hipocampo. La mucosa palatina se decoló del hueso maxilar, el cual se conservó en Etanol 70%, etanol 90% y etanol 100% hasta su análisis (en detalle más adelante). Las muestras de intestino e hipocampo se procesaron para la purificación de las proteínas totales según el protocolo descrito previamente (Díaz-Zúñiga y cols., 2020) y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Además, 4 ratas de cada grupo se perfundieron transcardíacamente 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 de los tejidos. A continuación, se extrajeron los intestinos y se post-fijaron en PFA al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente e incubaron durante 72 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  en una solución que contiene 30% de sacarosa y 0,002% de azida sódica para criopreservación.

### **5.4 Resorción ósea**

Cada maxilar se escaneo mediante microtomografía computarizada ( $\mu\text{CT}$ ) con la plataforma Bio-CT para cuantificar el nivel óseo y determinar la presencia de

resorción ósea, siguiendo el análisis morfométrico previamente descrito (Díaz-Zúñiga y cols., 2020).

### **5.5 Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios**

A partir de las muestras de mucosa palatina, íleon e hipocampo obtenidas previamente en 4 ratas por grupo (item 5.3) se purificaron las proteínas totales. Brevemente, mucosa palatina, íleon e hipocampo se lavaron con 1 mL de NaCl al 0,9% 3 veces y luego con 10  $\mu$ L de tampón que contiene Tris-HCl 0,5 M, NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 250 mM, Tx100 al 25% e inhibidor de proteasa, por cada mg de peso de muestra. Cada muestra se homogeneizó mecánicamente con un homogeneizador eléctrico y se centrifugó a 10.000  $xg$  durante 5 min a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se recuperó en agua milliQ, midió la concentración en un espectrofotómetro (Synergy™ HT, VT, USA) y almacenó en alícuotas de 200  $\mu$ L a -80°C. Luego, a partir de 100  $\mu$ L de cada homogenizado, las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  se cuantificaron mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (RyD, Minneapolis, EE. UU., o Milliplex, Merck Millipore, MA, EE. UU.) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm con un espectrofotómetro de placas.

### **5.6 Ensayo de permeabilización in vivo**

El día 30, y previo a la eutanasia, en otras 4 ratas por grupo, se aplicó mediante oral *gavage* 500  $\mu$ L/gr de peso una solución que contiene FITC-dextrano de 4 kDa (Cat. 53471, Merck, Sigma-Aldrich). Luego de 4 h se recolectó la sangre periférica total mediante punción cardíaca y se obtuvo el suero de manera inmediata. Posteriormente, se eliminó por perfusión todo resto de sangre mediante 300 mL de solución salina. Luego, se recolectó orina mediante la punción de la vejiga con una jeringa hipodérmica de 5 mL y se extrajeron cerebelo, corteza cerebral, mesencéfalo, hipocampo, riñón, duodeno, yeyuno e íleon y se fijaron por inmersión en PFA 4% y, mediante microscopía confocal se observó la presencia de FITC-Dextrano. Para obtener un índice de permeabilidad se ajustó la concentración de FITC-dextrano del suero, con el volumen administrado, con el FITC-dextrano en el tejido y el peso del tejido.

### **5.7 Análisis mediante inmunofluorescencia**

Para el análisis de inmunofluorescencia, una vez obtenidas las muestras biológicas, se cortaron los intestinos en el plano coronal con un crióstato a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Las secciones de  $40\ \mu\text{m}$  de grosor se suspendieron en una solución de bloqueo (PBS con Tritón X-100 al 0,25% y 3% de suero de burro) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con una solución de bloqueo que contiene los anticuerpos primarios monoclonales anti-zo1 (1:200, R26.4C, eBioscience™), anti-occludina (OC-3F10, Invitrogen™) y anti-claudina (2H10D10, Invitrogen™) durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las secciones se lavaron tres veces durante 5 min con PBS e incubaron durante 2h con anticuerpos secundarios anti-ratón, de cabra o de conejo conjugados con sondas fluorescentes (1:500, Alexa Fluor® 488, AlexaFluor® 594 o Alexa Fluor® 647, Abcam US). Los núcleos se visualizaron con Hoechst (1: 10.000, Sigma, St Louis, MI, EE. UU.). Mediante un microscopio confocal (Nikon C2 +, Melville, NY) se obtuvieron 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/>) (en detalle mas adelante).

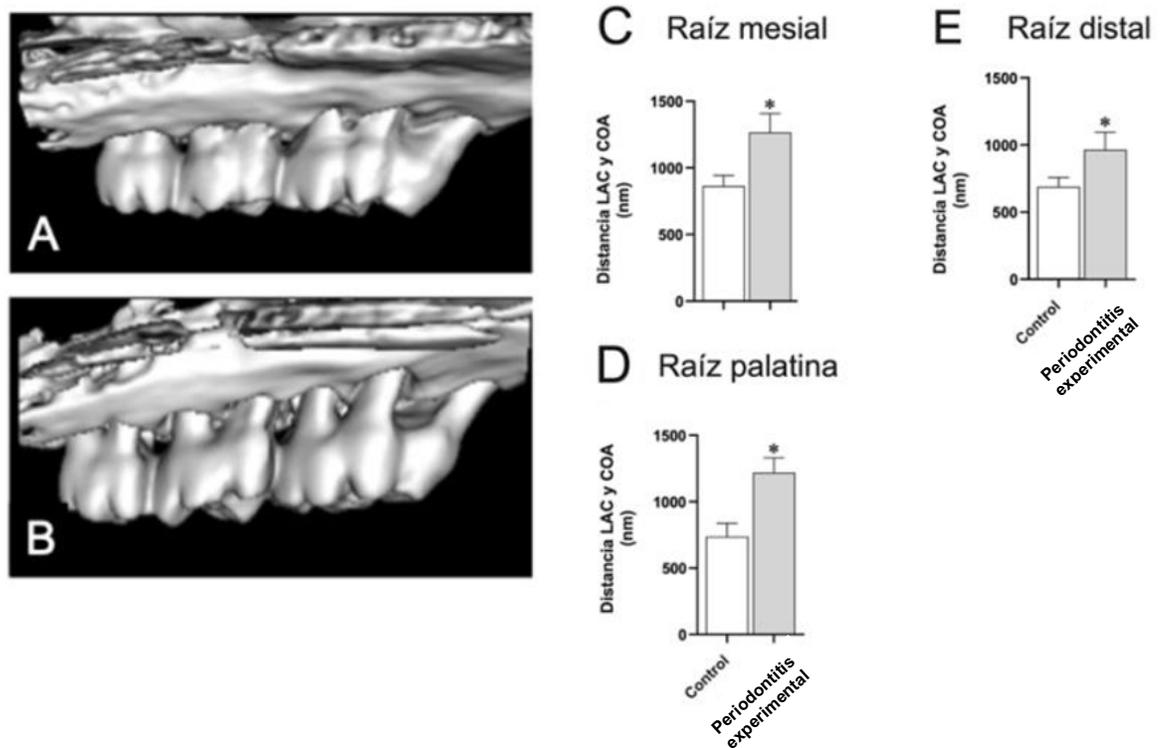
### **5.8 Análisis de los datos**

Los datos de los mediadores pro-inflamatorios se representan con los valores promedios  $\pm$  la desviación estándar en concentraciones (pg/mL). La pérdida del nivel óseo se representa con los valores promedios  $\pm$  la desviación estándar en distancias (nm) o áreas (nm<sup>2</sup>). Los datos del índice de permeabilidad se representan como los valores promedios  $\pm$  la desviación estándar. Finalmente, los datos de las inmunofluorescencias se representan como valores promedios de UAI  $\pm$  la desviación estándar de la intensidad relativa de cada marcador. Todos los datos se analizaron con la prueba de Kolgomorov-Smirnov para determinar su distribución normal y, dependiendo de ello se realizó la prueba de ANOVA-Tukey (distribución paramétrica) o Kruskal-Wallis-Dunn (distribución no paramétrica). El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v20.0 y un valor de  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Cuantificación de la resorción ósea.

Luego de 30 días, en las ratas afectadas de periodontitis experimental inducida por inoculación palatina de la cepa W83 de *P. gingivalis* se observó mayor resorción ósea marginal en los molares maxilares en comparación con las ratas control (Figura N°1). Este dato evidencia la presencia de resorción ósea marginal y, por tanto, confirma la presencia de periodontitis experimental.

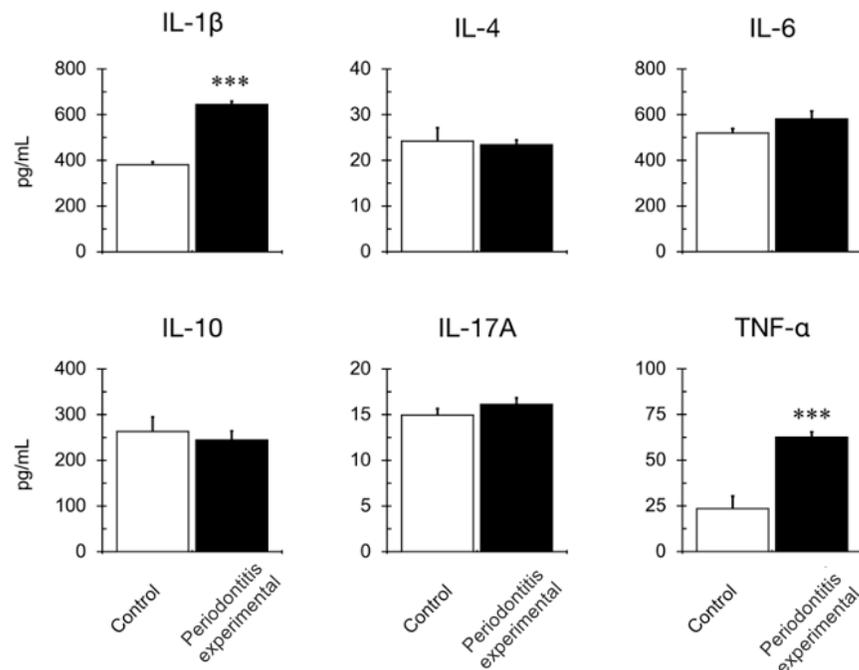


**Figura N°1. Resorción ósea.** A partir de la obtención de muestras de cada maxilar se realizó una reconstrucción 3D mediante microCT para cuantificar la resorción ósea que produjo la periodontitis inducida por inoculación palatina con el serotipo K1 de *P. gingivalis*. A) Rata control, B) rata inoculada con *P. gingivalis*. C) Distancia desde límite amelo-cementario con cresta ósea alveolar de la raíz mesial del primer molar maxilar. D) Distancia desde límite amelo-cementario con cresta ósea alveolar de la raíz distal del primer molar maxilar. E) Distancia desde límite amelo-cementario con cresta ósea alveolar de la raíz palatina del primer molar maxilar. Los datos se presentan media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. LAC: límite amelo-cementario, COA: cresta ósea alveolar.  $\mu\text{g}$ : micrometros. \* $p < 0,05$ .

## 6.2 Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios

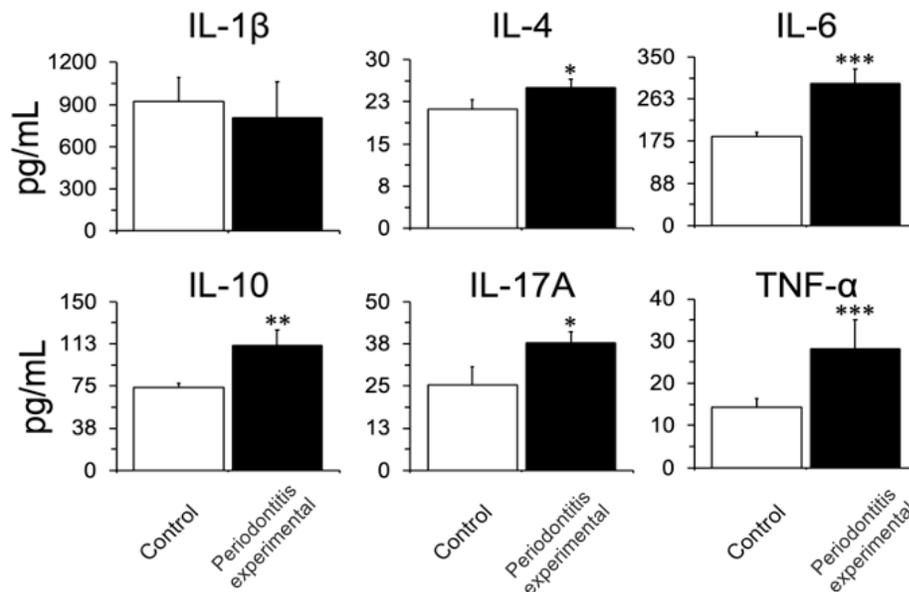
A partir de las muestras de íleon y de mucosa palatina de ratas afectadas de periodontitis experimental inducida por mono-infección se cuantificaron los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- $\alpha$  mediante ELISA.

Los mediadores pro-inflamatorios se determinaron en la mucosa palatina para evaluar el efecto inflamatorio de la inoculación palatina de *P. gingivalis*. Al evaluar los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se observa un incremento en los niveles secretados de las ratas afectadas por periodontitis en comparación al grupo control (Figura N°2).



**Figura N°2. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas en mucosa palatina.** A partir de homogenizados de mucosa palatina se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- $\alpha$  en ratas controles y experimentales. Los datos se presentan como concentración de moléculas (pg/mL); media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, pg: picogramos, mL: mililitros. \*\*\* $p < 0.001$ .

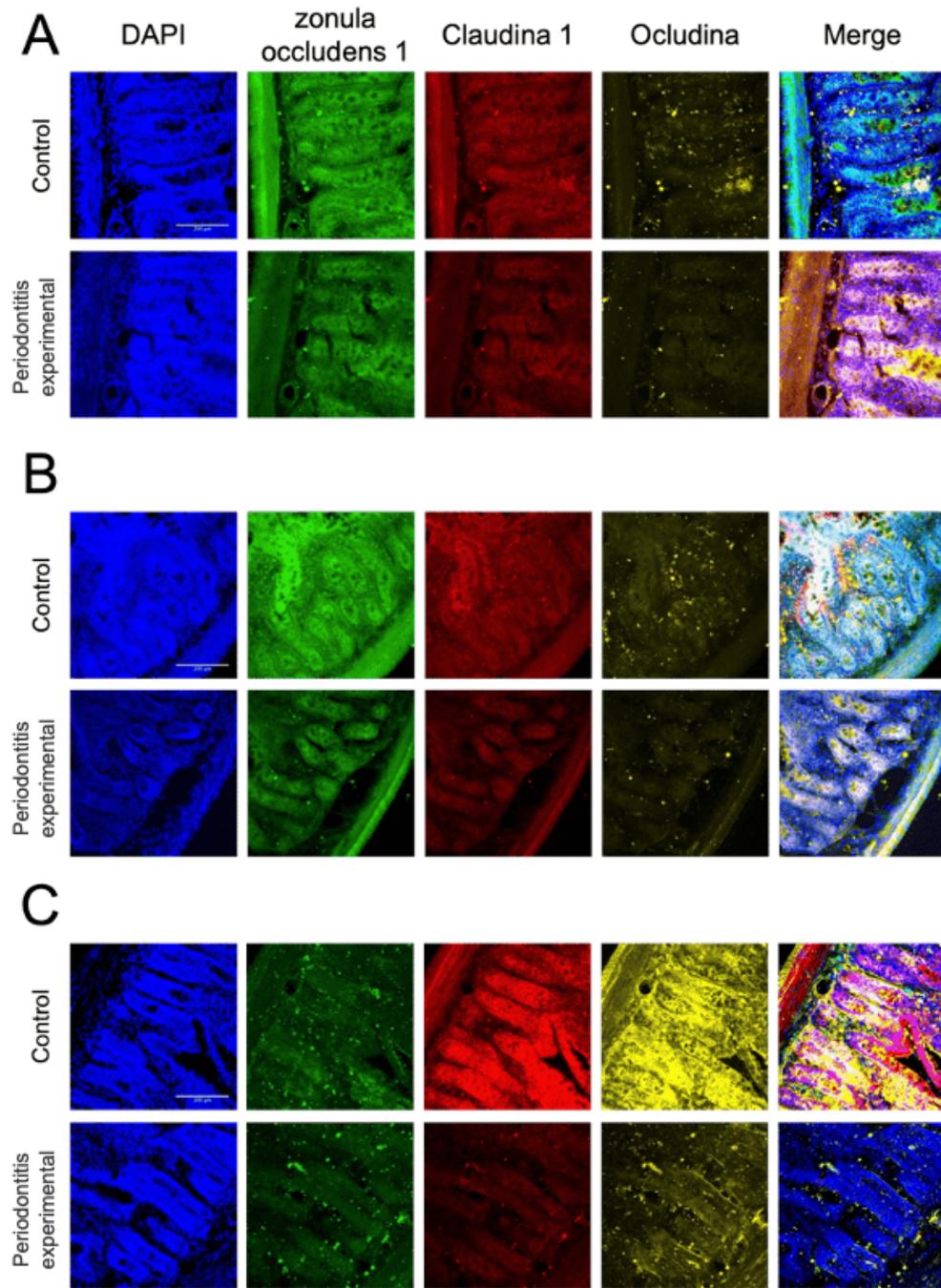
Luego, para determinar el efecto de la periodontitis en la mucosa intestinal, evaluamos los niveles de los mismos mediadores en el íleon (Figura N°3). Al evaluar los niveles de IL-6, IL-17A y TNF- $\alpha$  se observa un incremento en los niveles secretados en el íleon de las ratas afectadas por periodontitis en comparación al grupo control (Figura N°3). Además, se detectó un incremento en los niveles de IL-4 e IL-10 en los íleon de las ratas afectadas por periodontitis experimental en comparación a las ratas control.



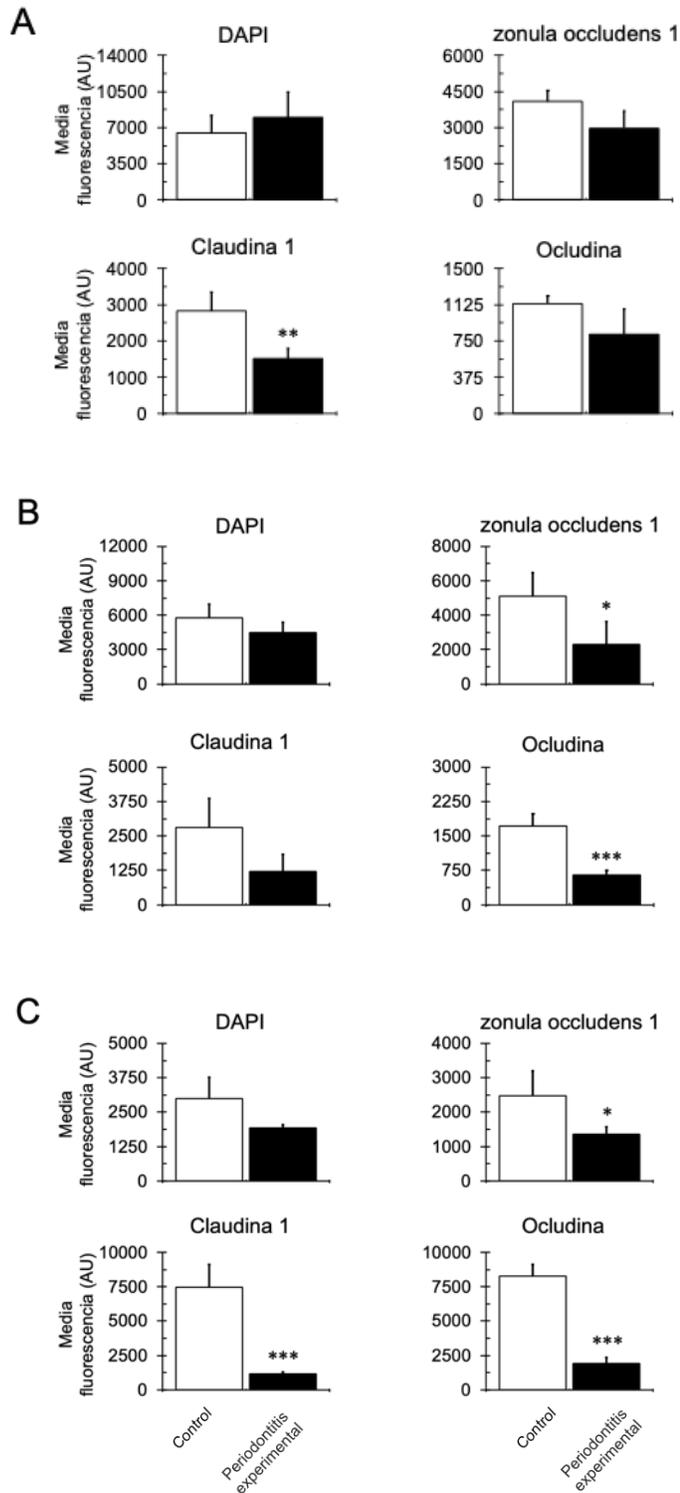
**Figura N°3. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas en íleon.** A partir de homogenizados de íleon se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- $\alpha$  en ratas controles y experimentales. Los datos se presentan como concentración de moléculas (pg/mL); media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, pg: picogramos, mL: mililitros. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 6.3 Análisis de inmunofluorescencia

Posteriormente, para determinar si la periodontitis afecta la estructura de la barrera intestinal, evaluamos las uniones estrechas mediante la detección de las proteínas zonula *occludens*, ocludina y claudina por inmunofluorescencia (Figura N°4). Además, en las ratas afectadas por periodontitis se observó una disminución en la inmunodetección de zonula *occludens*, ocludina y claudina que corresponde a una alteración en la distribución de las uniones intercelulares (Figura N°5).



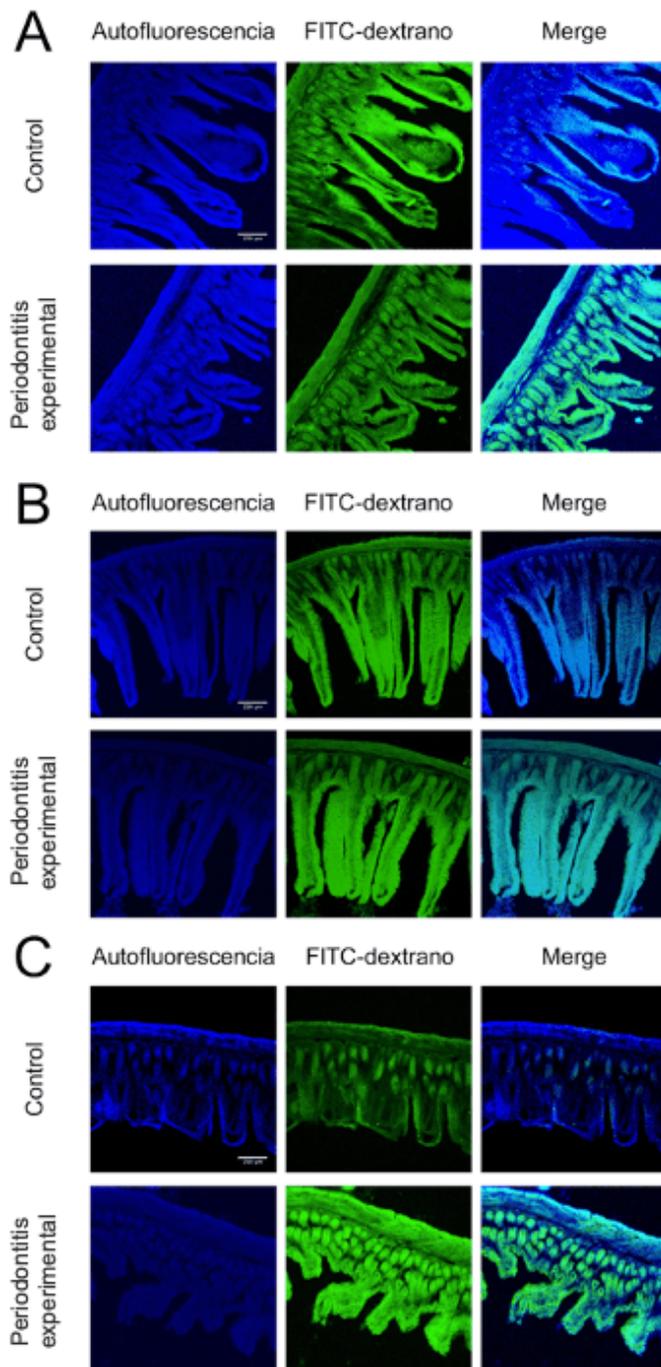
**Figura N°4. Inmunofluorescencia de Zonula occludens, ocludina, claudina en duodeno, yeyuno e íleon en ratas con periodontitis inoculadas con *P. gingivalis*.** Cada imagen representa la proyección 3D de 35 imágenes 2D. A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon. En azul se visualiza el núcleo, en verde la zonula occludens 1, en rojo la Claudina y en amarillo la ocludina. El merge corresponde a la proyección de todos los canales en simultáneo.



**Figura N°5. Cuantificación de unidades arbitrarias de fluorescencia de ZO-1, claudina 1 y ocludina en ratas con periodontitis inoculadas con *P. gingivalis* serotipo K1 y ratas control.** A) Cuantificación de las proteínas en duodeno, B) Cuantificación de proteínas en yeyuno y C) Cuantificación de proteínas en íleon. A partir de cada imagen de inmunofluorescencia se cuantificaron las unidades arbitrarias de fluorescencia en ratas control y experimentales para ZO-1 (zonula occludens), claudina y ocludina. Los datos se presentan como concentración de unidades arbitrarias de fluorescencia (AU); media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

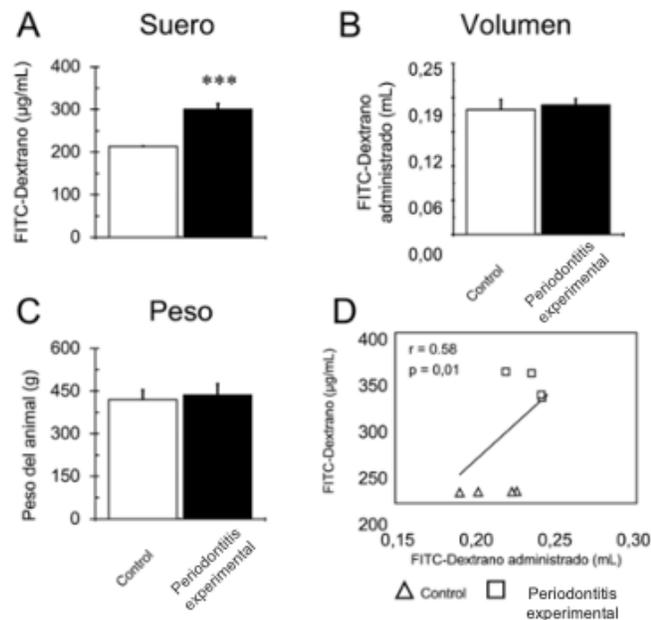
#### 6.4 Evaluación de la permeabilidad intestinal

En 4 ratas de cada grupo se aplicó mediante oral *gavage* una solución que contiene FITC-dextrano de 4kDa para evaluar la permeabilidad de la barrera intestinal. A través de microscopía confocal se observó la presencia del FITC-Dextrano en la mucosa de duodeno, yeyuno e íleon, donde se observa la presencia del marcador en la mucosa intestinal subyacente al epitelio (Figura N°6).



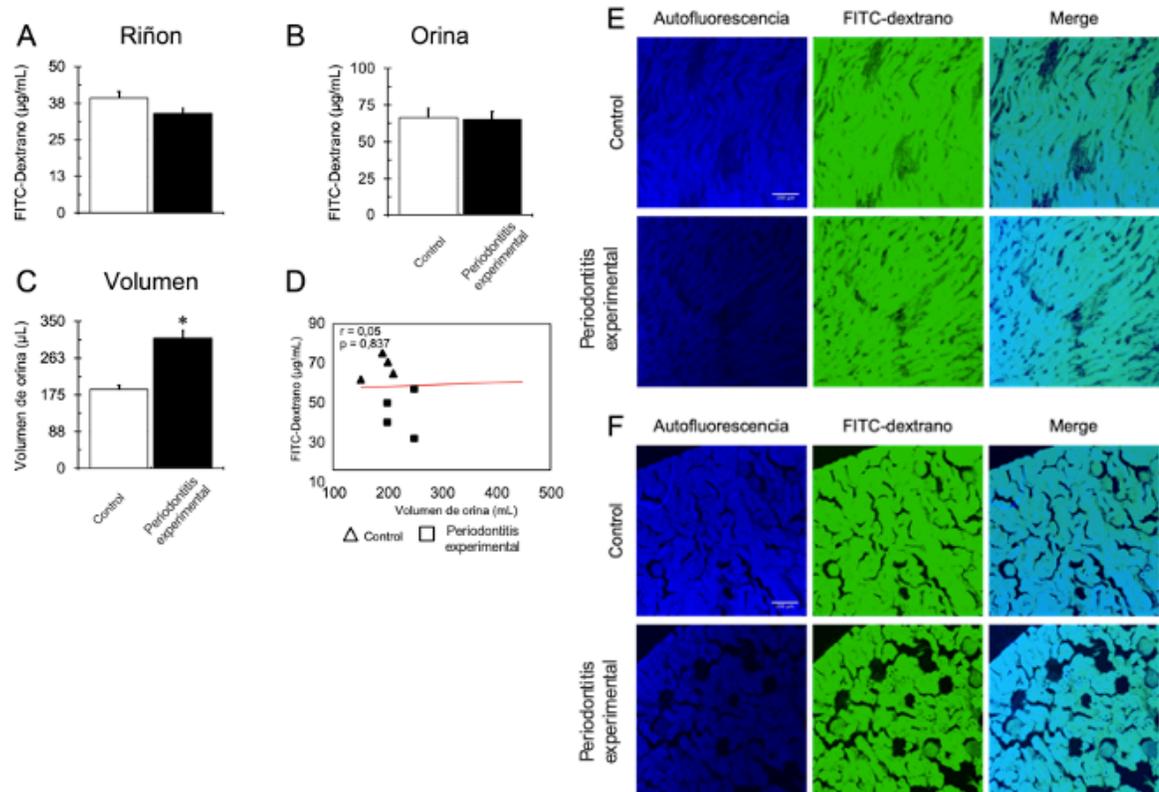
**Figura N°6. Inmunofluorescencia de niveles de FITC-dextrano en intestino**  
 A) duodeno, B) yeyuno, C) íleon. En azul se detecta la autofluorescencia de los tejidos que permite visualizar sus límites y en verde la marca de FITC que difundió desde el lumen intestinal hacia la mucosa intestinal.

Luego, se cuantificaron los niveles de FITC-Dextrano en el suero, riñón y orina, para determinar cuánto FITC-dextrano difundió desde el intestino al suero, cuánto se acumuló en el riñón y cuánto se excretó. A nivel sérico encontramos un incremento significativo del marcador, lo que demuestra una mayor permeabilidad del intestino (Figura N°7A). Para determinar que este aumento no se deba a una mayor ingesta por mayor peso de cada animal, se estandarizó según el volumen y peso administrado (Figuras N°7B y 7C). En efecto, no se detectaron diferencias entre el volumen administrado o el peso del animal, lo que demuestra que el aumento en la concentración sérica se debe a un incremento en la permeabilidad intestinal. De hecho, la Figura N°7D demuestra la correlación positiva entre el FITC detectado en suero con el volumen administrado, donde las ratas que más presentan FITC en suero son las afectadas por periodontitis en comparación con las control.



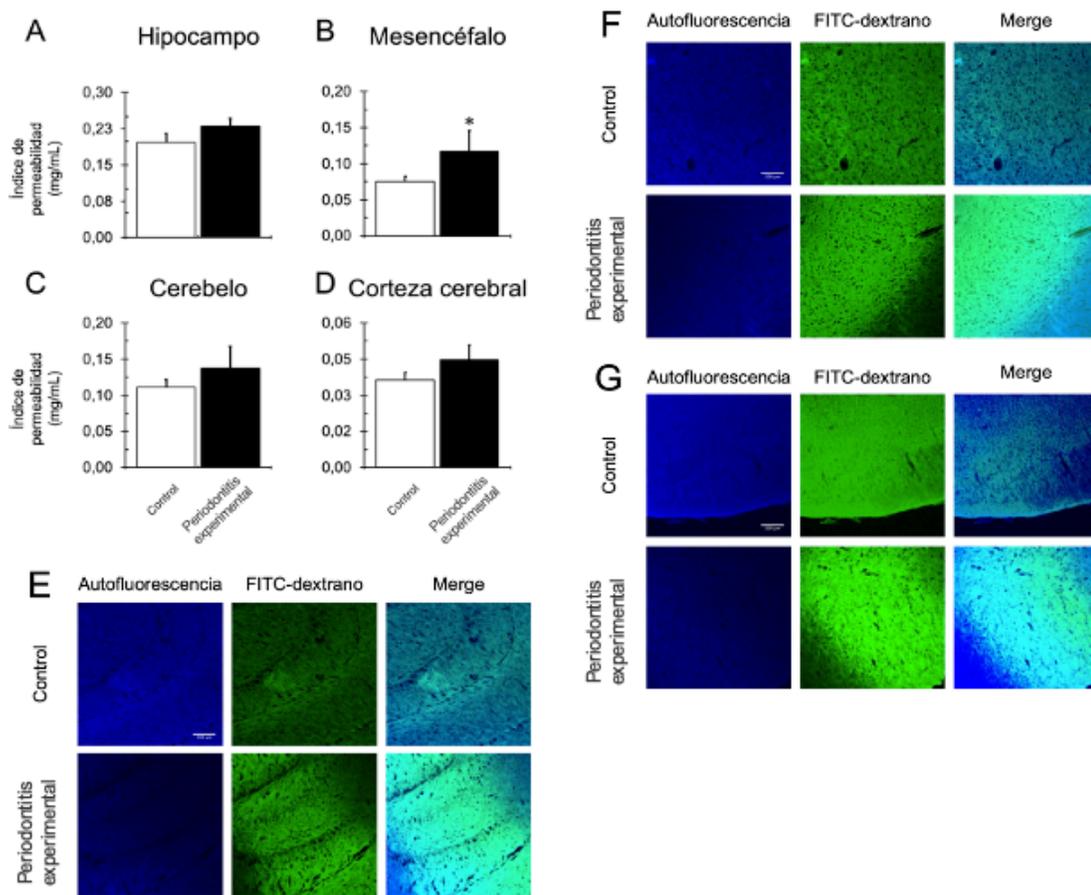
**Figura N°7. Cuantificación de niveles de FITC-dextrano en suero en ratas con periodontitis experimental.** A partir del suero obtenido de ratas controles y experimentales se cuantificaron los niveles de FITC-dextrano A). Volumen de FITC-Dextrano en suero, B). Volumen de FITC-dextrano administrado a cada animal, C) Peso de cada animal, D) Correlación entre el volumen de FITC-Dextrano administrado y la concentración encontrada en suero. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en valores concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), volumen administrado de FITC-Dextrano (mL), peso de las ratas (g). Cada gráfica representa los datos de 4 experimentos independientes por cada grupo.  $\mu\text{g}$ : microgramos, mL: mililitros, g: gramo. \*\*\* $p < 0.001$ .

A nivel renal no se encontraron diferencias entre las ratas con periodontitis de las controles en la concentración de FITC-dextrano detectado en homogenizados de riñón ni en la orina (Figura N°8). Sin embargo, sí se detectó diferencia en el volumen total de orina, donde las ratas afectadas de periodontitis tenían más orina. No obstante lo anterior, no se detectó una correlación entre el volumen de orina y la concentración de FITC dextrano en la orina.



**Figura N°8. Cuantificación de niveles de FITC-dextrano en riñón y orina e inmunofluorescencia de riñón en ratas con periodontitis experimental.** A partir de orina y riñón obtenido de ratas controles y experimentales se cuantificaron los niveles de FITC-dextrano y de los riñones preservados en PFA 4% se evaluó la distribución del FITC-dextrano mediante inmunofluorescencia. A) Cuantificación de FITC-dextrano en riñón homogenizado, B) Cuantificación de FITC-dextrano en orina, C) Volumen total de orina, D) Correlación entre el FITC-dextrano cuantificado en orina y el volumen total de orina, E) Proyección 3D de 30 imágenes 2D de la médula renal y F) Proyección 3D de 32 imágenes 2D de la corteza renal. Los datos se presentan como concentración de moléculas (µg/mL), volumen de orina (µL); media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. µg: microgramos, mL: mililitro. \* $p < 0,05$ .

Luego se evaluó la acumulación de FITC-Dextrano en hipocampo, cerebelo, mesencéfalo y encéfalo (Figura N°9). Para ello se determinó el índice de permeabilidad, donde la concentración del FITC-dextrano detectado en cada tejido se normaliza a la concentración sérica, volumen de suero y peso de cada tejido u órgano. En las ratas con periodontitis inducida por inoculación palatina se observó un incremento del índice de permeabilidad de FITC-Dextrano en el mesencéfalo en comparación con las ratas control (Figura N°9).

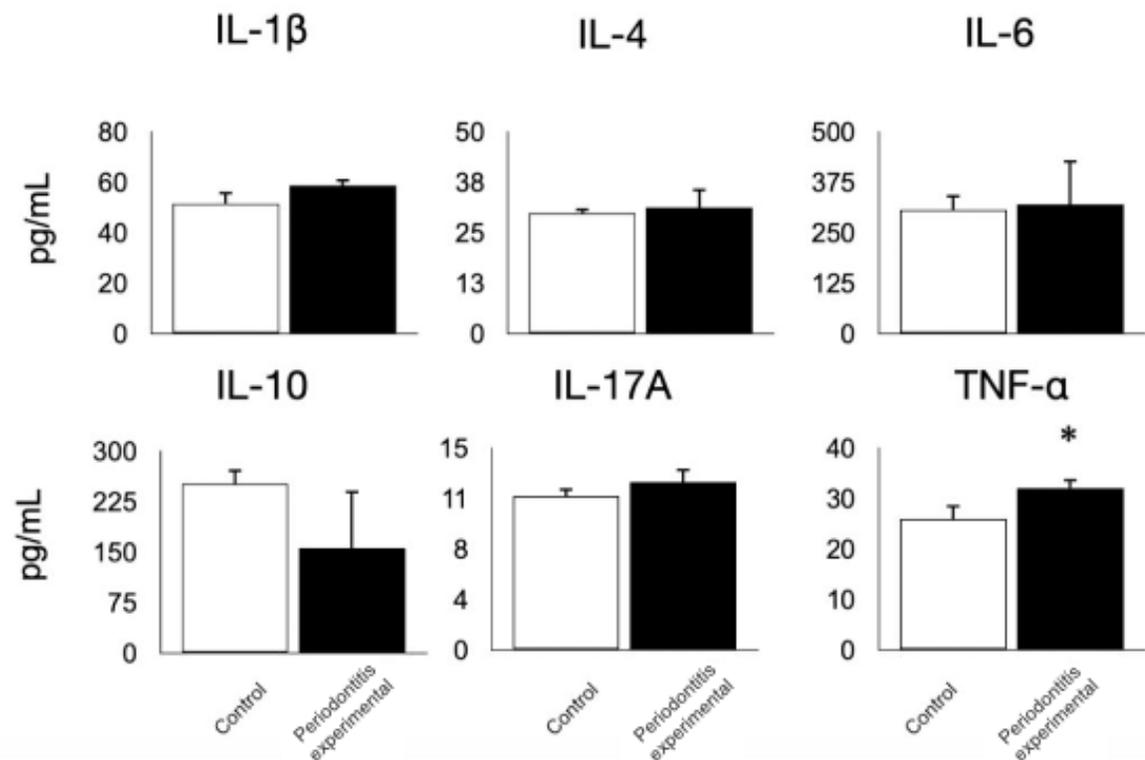


**Figura N°9. Cuantificación de niveles de FITC-dextrano e inmunofluorescencia de tejidos cerebrales en ratas con periodontitis experimental.** Cuantificación del índice de permeabilidad para A) Hipocampo, B) Mesencéfalo, C) Cerebelo, D) Corteza cerebral, E) proyección 3D de 30 imágenes 2D de giro dentado, F) proyección 3D de 30 imágenes 2D de mesencéfalo y G) proyección 3D de 30 imágenes 2D de corteza cerebral. En las figuras E, F y G, en azul es la autofluorescencia y en verde la señal de FITC. Los datos de las figuras A, B, C y D se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar del índice de permeabilidad de 4 experimentos independientes por cada grupo. mg: miligramos, mL: mililitros.. \* $p < 0,05$ .

### 6.5 Cuantificación de mediadores en hipocampo

Finalmente, para determinar si la periodontitis genera neuroinflamación, cuantificamos los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- $\alpha$  mediante ELISA (Figura N°10).

En el hipocampo de las ratas afectadas por periodontitis se detectó un aumento significativo en la producción de TNF- $\alpha$ , sin detectar diferencias para los demás mediadores.



**Figura N°10. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas en hipocampo.** A partir de homogenizados de hipocampo se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- $\alpha$  en ratas controles y experimentales. Los datos se presentan como concentración de moléculas (pg/mL); media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, pg: picogramos, mL: mililitros. \*p<0,05.

## 7. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación evaluó la estructura e inflamación intestinal y la permeabilidad de la barrera intestinal y hemato-encefálica en ratas Sprague-Dawley afectadas por periodontitis experimental inducidas por inoculación palatina de la cepa W83 de *P. gingivalis*. La inducción de periodontitis experimental se confirmó mediante la presencia de resorción ósea marginal e inflamación en la mucosa palatina caracterizada por la presencia de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Luego, mediante un análisis de inmunofluorescencia, las ratas afectadas por periodontitis presentaron una disminución significativa en la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares, zonula *occludens*, ocludina y claudina 1, asociado a una mayor permeabilidad intestinal. Además, en el íleon e hipocampo se detectaron mayores niveles de los mediadores pro-inflamatorios IL-6, IL-17A y TNF- $\alpha$ , y un aumento en los niveles de IL-4 e IL-10. También, se evaluó la función del intestino determinando el grado de permeabilidad de la barrera intestinal mediante la distribución de FITC-dextrano, donde se observó un aumento de este marcador en el suero y una acumulación en la mucosa intestinal de las ratas con periodontitis indicando que la barrera intestinal se encuentra permeable. Finalmente, en las ratas afectadas por periodontitis se observó un aumento en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica con presencia de neuroinflamación. Estos resultados nos demuestran que la periodontitis inducida por inoculación palatina es capaz de inducir resorción ósea, provocar inflamación intestinal, inducir cambios estructurales en la barrera intestinal y alterar la permeabilidad intestinal. Esto demuestra que la periodontitis es capaz de afectar la estabilidad intestinal y, por tanto, los efectos en otros tejidos u órganos podrían asociarse tanto a la periodontitis como a la inflamación intestinal, siendo muy difícil separar ambas variables. De esta manera, la cavidad oral y el intestino debieran considerarse como una sola unidad funcional.

En la literatura existen diversas metodologías para inducir periodontitis experimental, tales como: Ligadura, irrigación oral, enjuague oral, irrigación subgingival, oral gavage, inoculación palatina e inyección de LPS (Díaz-Zúñiga y cols., 2020; Dominy y cols., 2019; Ilievski y cols., 2018; Kantarci y cols., 2020; Liu y

cols., 2017; Poole y cols., 2014; Rokad y cols., 2017; Singhrao y cols., 2017; Wu y cols., 2017; Zhang y cols., 2018). Distintos estudios en modelos experimentales demuestran que la presencia de periodontitis se asocia con la enfermedad de Alzheimer (Díaz-Zúñiga y cols., 2020; Feng y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Ilievski y cols., 2018; Kantarci y cols., 2020; Poole y cols., 2014; Riviere y cols., 2002; Singhrao y cols., 2017). En efecto, en una reciente revisión sistemática se observó que los artículos que demuestran esta asociación no se encuentran estandarizados en términos de la temporalidad y el método utilizado para inducir la periodontitis, lo que hace difícil llegar a conclusiones claras (Parra-Torres y cols., 2023). Por ello, algunos estudios describen como discutible si los efectos a nivel cerebral son consecuencia de la periodontitis, las bacterias, las citoquinas proinflamatorias, la inflamación intestinal, o la alteración de la barrera intestinal (Arimatsu y cols., 2014; Nakajima y cols., 2015; Sato y cols., 2018).

Las uniones estrechas cumplen un rol importante en la función de la barrera intestinal (Suzuki, 2020; Xue y cols., 2020). Estas uniones están compuestas por diferentes moléculas de unión, como la claudina y la ocludina, que interactúan con proteínas de anclaje intracelular, como las proteínas zonula *occludens*, que a su vez están conectadas al citoesqueleto de actina (L. Wang y cols., 2015). Una de las funciones más importantes de las uniones estrechas es proporcionar una barrera física a las moléculas lumenales de mayor peso molecular (Otani y Furuse, 2020; Suzuki, 2020). En efecto, cuando la permeabilidad paracelular incrementa, ingresan a la mucosa intestinal moléculas de mayor peso molecular, bacterias intestinales o mecanismos de patogenicidad, capaces de inducir una respuesta inflamatoria intestinal (Arimatsu y cols., 2014; Nakajima y cols., 2015; Otani y Furuse, 2020; Sato y cols., 2017, 2018; Suzuki, 2020). En efecto, en modelos de periodontitis inducida por oral *gavage* de *P. gingivalis* se observa que la presencia de *P. gingivalis* en el intestino se asocia con una disminución en la expresión de zonula *occludens*, claudina-1 y ocludina, alterando la estructura de las uniones estrechas, la polarización del enterocito, la permeabilización de la barrera intestinal, y los niveles de las endotoxinas séricas (Massey-Harroche, 2000; Nakajima y cols., 2015; Sato y cols., 2018; Xue y cols., 2020). Finalmente, los estudios donde inoculan *P. gingivalis* mediante oral *gavage* sugieren que estos cambios estructurales podrían deberse a

una potencial alteración de la composición de la microbiota intestinal (Arimatsu y cols., 2014; Nakajima y cols., 2015; Sato y cols., 2017, 2018). La disbiosis intestinal inducida por la colonización patológica de bacterias ajenas al intestino genera un desequilibrio en la microbiota intestinal. Este desequilibrio es evidente cuando se administra oralmente *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* mediante oral *gavage*, lo que afecta la proporción de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal (Arimatsu y cols., 2014; Feng y cols., 2020; Hamamoto y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Jia y cols., 2019; Kato y cols., 2018; Kobayashi y cols., 2020; Komazaki y cols., 2017; Lourenço y cols., 2018; Nakajima y cols., 2015; Ohtsu y cols., 2019; Sato y cols., 2017, 2018). Las especies de *Firmicutes*, como *Clostridium* y *Lactobacillus*, y las de *Bacteroidetes*, como *Bacteroides* y *Porphyromonas*, son componentes clave de la microbiota intestinal (Cassir y cols., 2016; Ley y cols., 2005; Mariat y cols., 2009). Estos filos producen, a partir de la fermentación de carbohidratos insolubles, ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato, que son productos de fermentación anaeróbica, y que a su vez desempeñan un rol protector en la barrera intestinal y modulan la expresión génica del hospedero asociada a respuestas pro-inflamatorias (Rousseaux y Khochbin, 2015; van de Wouw y cols., 2017; T. Wang y cols., 2018). La presencia de *P. gingivalis* en el intestino produce la disminución de *Clostridium* y *Lactobacillus*, lo que afecta la producción de ácidos grasos de cadena corta (Kobayashi y cols., 2020; Nakajima y cols., 2015). Además, en el intestino la presencia de *P. gingivalis* aumenta la concentración de los ácidos láctico y n-butírico, favoreciendo la secreción de  $\alpha$ -defensina y desencadenando la producción de péptidos antimicrobianos (Alonso y cols., 2008; Kaelberer y cols., 2018; Kobayashi y cols., 2020; Nakajima y cols., 2015; Rhee y cols., 2009).

Con el objetivo de evaluar cómo la periodontitis afecta al intestino, evaluamos los niveles de secreción de mediadores pro-inflamatorios en el íleon, la zona del intestino que más se vió afectada en este trabajo cuando existen alteraciones en la microbiota (Arimatsu y cols., 2014). En efecto, en el íleon es donde ocurre la absorción de vitamina B12 y aproximadamente el 95% de la reabsorción de los ácidos biliares que son fundamentales en la digestión (Thomson y cols., 2003; Yuan, 2015). Además, en el íleon es donde se completa la absorción de nutrientes e iones

como aminoácidos, sodio, cloro y zinc (Cudeiro, 2005). El intestino representa el órgano que posee la mayor presencia de células inmune del organismo y, específicamente, en el íleon se organizan como tejido linfoide asociado al intestino (del inglés *Gut Lymphoid Associated Tissues*, GALT) (Mowat y Agace, 2014; Ramiro-Puig y cols., 2008). El GALT comprende principalmente las placas de Peyer, las que son de gran tamaño y densidad desde el yeyuno hasta el íleon, siendo más concentradas en este último (Mowat y Agace, 2014). Las placas de Peyer consisten en folículos linfoides con células B rodeados por áreas más pequeñas de células T. Además, las placas de Peyer parecen ser la principal fuente de células plasmáticas productoras de IgA que migran al intestino delgado (Mowat y Agace, 2014). En las criptas del íleon existe una abundancia de células de Paneth secretoras de péptidos antimicrobianos y un número relativamente alto de células caliciformes secretoras de moco que crean una capa irregular de espesor variable (Mowat y Agace, 2014; Szentkuti y Lorenz, 1995). La abundante producción de péptidos antimicrobianos como catelicidinas, lectinas tipo C y defensinas por parte de las células de Paneth crea una barrera defensiva entre las células epiteliales y la microbiota (Mowat y Agace, 2014).

Luego, para comprobar si la funcionalidad del intestino estaba alterada realizamos un ensayo de permeabilidad *in vivo* utilizando FITC-dextrano compuesto por FITC que es una proteína fluorescente verde y dextrano, un oligosacárido inerte de 4000 Da (4KDa) de tamaño (Wang y cols., 2015). En un intestino sano normalmente difunden mediante la vía paracelular estructuras menores a 300 Da (Sun y cols., 1998). El dextrano posee un tamaño de 4000 Da (4KDa), por lo que en ratas sanas no debería difundir por la barrera intestinal (Sun y cols., 1998). En nuestros resultados observamos una acumulación del FITC-dextrano en las criptas intestinales de las ratas con periodontitis, lo que puede indicar una alteración funcional en el intestino. Esto supone que en ratas con periodontitis podrían difundir por la vía paracelular estructuras de menor, igual o mayor tamaño al que presenta FITC-dextrano (4KDa), tales como LPS bacteriano, gingipainas u otro mecanismo de patogenicidad. Además, nuestros resultados demuestran una correlación entre la periodontitis y la concentración de FITC-dextrano en suero, probablemente, por una alteración estructural y funcional de la barrera intestinal.

Originalmente, nuestra hipótesis establecía que la periodontitis experimental inducida por la inoculación de una bacteria *keystone* directamente en la mucosa palatina no debiera generar alteraciones estructurales ni funcionales del intestino. Sin embargo, nuestros resultados demostraron lo contrario, lo que podría deberse a la migración de *P. gingivalis*, a la deglución de bajas cargas de esta bacteria posterior a la inoculación palatina o a la deglución de bajas cargas de esta bacteria durante su propia proliferación en la mucosa palatina. Esta comunicación entre la boca y el intestino podría estar produciendo una alteración en la composición de la microbiota (Arimatsu y cols., 2014). En este sentido, la consiguiente deglución de bacterias anaerobias genera desequilibrios en la microbiota intestinal que serán censados por un tipo de célula intestinal llamada células enterocromafines (Arimatsu y cols., 2014). Las células enterocromafines —las más comunes en el sistema gastrointestinal— sintetizan, reservan y liberan serotonina y otros neurotransmisores en respuesta a factores bacterianos, desempeñan un rol central en la regulación de la secreción y motilidad intestinal, y actúan como quimiosensores para modular las vías neurales (Bellono y cols., 2017; Gunawardene y cols., 2011). Estas células detectan permanentemente las bacterias patógenas invasoras mediante los receptores tipo *Toll*, que reconocen mecanismos de patogenicidad específicos (Bogunovic y cols., 2007; Hansen y Witte, 2008; Wheatcroft y cols., 2005). Cuando son estimuladas, las células enterocromafines liberan serotonina que estimula a los nervios aferentes y al nervio vago, aumentando la motilidad intestinal, la permeabilidad, la producción de mucus y desencadenando inflamación intestinal (Raybould y cols., 2004; Rhee y cols., 2009). En resumen, estas células son esenciales para la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema gastrointestinal en respuesta a cambios en la microbiota intestinal. Así, la respuesta simpática intestinal facilita la migración de macrófagos y mastocitos debido al aumento en la permeabilidad intestinal y en la invasión bacteriana (Rhee y cols., 2009). Una vez establecidos los cambios en la microbiota intestinal y detectados por las células enterocromafines se reduce la expresión de proteínas que conforman las uniones adherentes de los enterocitos. La segunda forma en que los cambios de la microbiota intestinal pueden alterar la fisiología del intestino es mediante la producción de zonulina, una proteína producida por los enterocitos ante

cambios en la microbiota intestinal (Asmar y cols., 2002; Fasano, 2011). La zonulina es secretada al lumen intestinal y tiene un efecto paracrina: actúa sobre las uniones estrechas de los enterocitos induciendo el reordenamiento e incrementando el tránsito paracelular (Asmar y cols., 2002; Gottardi y cols., 1996; Sturgeon y Fasano, 2016). Así, la zonulina es capaz de desencadenar la polimerización de la actina y el desanclaje de las uniones estrechas por la acción de la proteína quinasa C (Asmar y cols., 2002; Fasano, 2011).

La colonización de bacterias patógenas en el cuerpo induce una respuesta inmunológica que involucra la diferenciación e infiltración de linfocitos Th17 al sitio afectado. Estas células producen IL-17, que desempeña un rol en la protección contra infecciones por patógenos entéricos (Ivanov y cols., 2009). Las bacterias comensales también desencadenan respuestas inmunológicas beneficiosas, induciendo tanto la producción de IL-22 e IgA, como la diferenciación de linfocitos Th17 (Hill y Artis, 2010; Ramirez y cols., 2020). Además, los metabolitos producidos por las bacterias intestinales desempeñan un rol fundamental en la protección intestinal y en la interacción entre la microbiota, el sistema inmunológico y el sistema nervioso. Los ácidos grasos de cadena corta tienen un impacto significativo en la modulación de la inflamación y en la mantención de la homeodinamia intestinal (Dass y cols., 2007; Smith y cols., 2013). Algunas bacterias intestinales tienen la capacidad de producir neurotransmisores y neuropéptidos como serotonina, dopamina, GABA y factor neurotrófico derivado del cerebro. Estas moléculas pueden estimular las células epiteliales para liberar señales que regulan la función del sistema nervioso entérico, lo que establece una comunicación entre la microbiota intestinal y el cerebro (Dass y cols., 2007; Smith y cols., 2013). Por otra parte, las bacterias intestinales pueden comunicarse con el cerebro mediante las fibras nerviosas que conforman el nervio mesentérico y el nervio vago como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que regulan los niveles de serotonina en el cerebro y restauran la homeodinamia intestinal mediante la estimulación del sistema parasimpático (Leonard, 2006; Otani y Furuse, 2020; Rhee y cols., 2009; Turnbaugh y cols., 2007). En efecto, nuestro estudio demuestra que las ratas afectadas por periodontitis presentan tanto un intestino como un cerebro permeable. Este hallazgo es importante, por cuanto diversos estudios identifican la presencia de bacterias

orales en el cerebro sin tener una explicación posible a su migración (Díaz-Zúñiga y cols., 2020; Dominy y cols., 2019; Poole y cols., 2014; Riviere y cols., 2002). En este trabajo, al determinar la presencia de un marcador como el FITC-dextrano en el cerebro nos permite demostrar que esta molécula es capaz de difundir desde el intestino permeable hacia hipocampo, mesencéfalo o corteza. Así, la presencia de *P. gingivalis* en el hipocampo podría deberse a este fenómeno u otro, lo que requiere evidentemente de nuevas investigaciones.

El presente estudio demostró que la periodontitis experimental en ratas inducida por inoculación palatina produce un estado inflamatorio en el íleon e hipocampo. Esto ayudaría a comprender mejor cómo se relaciona la periodontitis con la disbiosis intestinal y la neuroinflamación. Esta posible vinculación entre estos tres sistemas sería factible mediante la comunicación oral-cerebro-intestino. La evidencia plantea que ni en pacientes afectados con periodontitis ni en modelos experimentales de periodontitis existe de una barrera hematoencefálica disfuncional. Por lo tanto, no hay evidencia que muestre si la ruptura de la barrera hemato-encefálica sucede y, de suceder, si es antes o después de la periodontitis (Sansores-España y cols., 2021). La evidencia indica que el eje oral-cerebro puede deberse a la interacción del nervio trigémino con bacterias orales mediante la vía TLR4/CD14-MyD88-NF- $\kappa$ B, que permitiría la internalización de las bacterias a la neurona y así podrían migrar de forma retrógrada por los axones hasta el soma neuronal ubicado en el ganglio trigeminal (Diogenes y cols., 2011; Go y cols., 2016; Wadachi y Hargreaves, 2006). De esta manera, aislar el eje oral-cerebro resultaría interesante para observar cómo la inoculación palatina podría tener efectos en el cerebro, presumiblemente por la comunicación mediante el nervio trigémino y sin afectar la fisiología intestinal. Sin embargo, en un modelo *in vivo* esto no es factible de realizar, por tanto se requieren otras estrategias metodológicas para poder evaluar la vía oral-intestinal y oral-cerebral de manera independiente. De esta manera, no podemos comprender la presencia de periodontitis sin un efecto directo a nivel intestinal, dado que tanto los modelos de ligadura como los de oral *gavage* producen disbiosis de la microbiota intestinal a través del eje oral-intestinal (Arimatsu y cols., 2014; Huang y cols., 2020; Jia y cols., 2019; Matsuda y cols., 2016; Palioto y cols., 2019; Sato y cols., 2018). Así, resulta importante que la profesión odontológica

tenga presente los efectos intestinales que las bacterias orales producen, dado que aún desconocemos qué fenómenos ocurren en el intestino de una persona afectada por alguna enfermedad oral, tal como lesiones de caries, periodontitis, candidiasis oral, úlceras recurrentes orales, o simplemente, portadores de prótesis removibles o aparatología de ortodoncia. Todas las condiciones mencionadas anteriormente involucran cambios en la microbiota oral. Sin embargo, no existe evidencia de cómo estas condiciones tan comunes podrían eventualmente generar inflamación intestinal, permeabilizar el intestino y alterar la composición microbiana intestinal y, así, contribuir a generar alteraciones en otros tejidos u órganos con consecuencias que desconocemos.

## 8. CONCLUSIONES

El modelo experimental de periodontitis inducida por inoculación palatina de *P. gingivalis* produce neuroinflamación en el hipocampo, inflamación intestinal principalmente en el íleon, altera estructuralmente la barrera intestinal y aumenta la permeabilidad intestinal.

## 9. REFERENCIAS

- Agustí, A., García-Pardo, M. P., López-Almela, I., Campillo, I., Maes, M y cols. (2018). Interplay Between the Gut-Brain Axis, Obesity and Cognitive Function. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00155>
- 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(1), 163-172.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.036>
- Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., y cols. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44(7), 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>
- Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M. y cols. (2014). Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep04828>
- Ashby, M. T., Kreth, J., Soundarajan, M., y Sivuilu, L. S. (2009). Influence of a model human defensive peroxidase system on oral streptococcal antagonism. *Microbiology*, 155(11), 3691–3700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031310-0>
- Asmar, R. El, Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T., Coppa, G. V. y cols. (2002). Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, 123(5), 1607–1615. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36578>
- Baeza, M., Morales, A., Cisterna, C., Cavalla, F., Jara, G. y cols. (2020). Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science*, 28. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0248>

Bellono, N. W., Bayrer, J. R., Leitch, D. B., Castro, J., Zhang, C., y cols. (2017). Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell*, 170(1), 185-198.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.034>

Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C. R., Bailey, J., Abreu, L. G. y cols. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of Dental Research*, 99(4), 362–373. <https://doi.org/10.1177/0022034520908533>

Bogunovic, M., Davé, S. H., Tilstra, J. S., Chang, D. T. W., Harpaz, N., y cols. (2007). Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(6), G1770–G1783. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00249.2006>

Boutaga, K., Savelkoul, P. H. M., Winkel, E. G., y van Winkelhoff, A. J. (2007). Comparison of Subgingival Bacterial Sampling With Oral Lavage for Detection and Quantification of Periodontal Pathogens by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Periodontology*, 78(1), 79–86. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060078>

Cassir, N., Benamar, S., y La Scola, B. (2016). Clostridium butyricum: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.014>

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., y cols. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(S1), S74–S84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>

Chen, Y., Liu, S., y Leng, S. X. (2019). Chronic Low-grade Inflammatory Phenotype (CLIP) and Senescent Immune Dysregulation. En *Clinical*

*Therapeutics* (Vol. 41, Número 3, pp. 400–409). Excerpta Medica Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.02.001>

Cudeiro, J. (2005). *Fisiología de la absorción intestinal*.

Dass, N. B., John, A. K., Bassil, A. K., Crumbley, C. W., Shehee, W. R. y cols. (2007). The relationship between the effects of short-chain fatty acids on intestinal motility in vitro and GPR43 receptor activation. *Neurogastroenterology and Motility*, 19(1), 66–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2006.00853.x>

Díaz-Zúñiga, J., More, J., Melgar-Rodríguez, S., Jiménez-Unión, M., Villalobos-Orchard, F. y cols. (2020). Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588036>

Diogenes, A., Ferraz, C. C. R., Akopian, A. N., Henry, M. A., y Hargreaves, K. M. (2011). LPS Sensitizes TRPV1 via Activation of TLR4 in Trigeminal Sensory Neurons. *Journal of Dental Research*, 90(6), 759–764. <https://doi.org/10.1177/0022034511400225>

Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A. y cols. (2019). *HEALTH AND MEDICINE Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors*. <http://advances.sciencemag.org/>

Fasano, A. (2011). Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiological Reviews*, 91(1), 151–175. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2008>

Fenesy, K. E. (1998). Periodontal disease: an overview for physicians. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 65(5–6), 362–369.

Feng, Y. K., Wu, Q. L., Peng, Y. W., Liang, F. Y., You, H. J. y cols. (2020). Oral *P. gingivalis* impairs gut permeability and mediates immune responses associated with neurodegeneration in LRRK2 R1441G mice. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02027-5>

Fischer, L. A., Demerath, E., Bittner-Eddy, P., y Costalonga, M. (2019). Placental colonization with periodontal pathogens: the potential missing link. En *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 221, Número 5, pp. 383-392.e3). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.04.029>

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. <https://doi.org/10.1177/0022034510376402>

Garrett, W. S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230), 80–86. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W. y cols (2014). The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease. *Cell Host y Microbe*, 15(3), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>

Go, M., Kou, J., Lim, J.-E., Yang, J., y 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(2), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.073>

Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., y 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(20), 10779–10784. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10779>

Gunawardene, A. R., Corfe, B. M., y Staton, C. A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology*, 92(4), 219–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x>

- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. En *Trends in Immunology* (Vol. 35, Número 1, pp. 3–11). <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Número 1, pp. 30–44). Nature Publishing Group. <https://doi.org/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 and Therapy*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02348-z>
- Hansen, M. B., y Witte, A. -B. (2008). The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiologica*, 193(4), 311–323. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01870.x>
- Hill, D. A., y Artis, D. (2010). Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual review of immunology*, 28, 623. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-030409-101330>
- 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<sup>-/-</sup> Mice With Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00498>
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
- Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E. y cols. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>

- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S. E., Martin, A., y Philpott, D. J. (2014). The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Molecular Cell*, 54(2), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.039>
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T. y cols. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, 139(3), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Jia, X., Jia, L., Mo, L., Yuan, S., Zheng, X. y cols. (2019). Berberine Ameliorates Periodontal Bone Loss by Regulating Gut Microbiota. *Journal of Dental Research*, 98(1), 107–116. <https://doi.org/10.1177/0022034518797275>
- Kaelberer, M. M., Buchanan, K. L., Klein, M. E., Barth, B. B., Montoya, M. M. y cols. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, 361(6408). <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>
- Kantarci, A., Tognoni, C. M., Yaghmoor, W., Marghalani, A., Stephens, D. y cols. (2020). Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/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. *mSphere*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/msphere.00460-18>
- Keku, T. O., McCoy, A. N., y Azcarate-Peril, A. M. (2013). Fusobacterium spp. and colorectal cancer: cause or consequence? *Trends in Microbiology*, 21(10), 506–508. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.08.004>
- Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Jiao, Y., Gilliland, M. G., Hayashi, A. y cols. (2020). The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell*, 182(2), 447-462.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.048>

Kobayashi, R., Ogawa, Y., Hashizume-Takizawa, T., & Kurita-Ochiai, T. (2020). Oral bacteria affect the gut microbiome and intestinal immunity. *Pathogens and Disease*, 78(3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa024>

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(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14260-9>

Lamont, R. J., Koo, H., y Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>

Leonard, B. E. (2006). HPA and Immune Axes in Stress: Involvement of the Serotonergic System. *Neuroimmunomodulation*, 13(5–6), 268–276. <https://doi.org/10.1159/000104854>

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D y cols. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>

Liccardo, D., Marzano, F., Carraturo, F., Guida, M., Femminella, G. D y cols. (2020). Potential Bidirectional Relationship Between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00683>

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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12173-1>

Lourenço, T. G. B., Spencer, S. J., Alm, E. J., y Colombo, A. P. V. (2018). Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: an

exploratory study. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1), 1487741. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1487741>

Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H. y cols. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>

Massey-Harroche, D. (2000). Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microscopy Research and Technique*, 49(4), 353–362. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000515\)49:4<353::AID-JEMT4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/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. (2016). 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(5), 639–646. <https://doi.org/10.1111/jre.12344>

Morales, A., Bravo, J., Baeza, M., Werlinger, F., & Gamonal, J. (2016). Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9(2), 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.004>

Morales, A., Jara, G., Werlinger, F., Cabello, R., Espinoza, I. y cols. (2020). Sinopsis de la Situación de Salud Oral en Chile - Parte II: Diagnósticos Poblacionales de Salud Oral. *International journal of interdisciplinary dentistry*, 13, 88–94. <https://doi.org/10.4067/S2452-55882020000200088>

Mowat, A. M., y Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Número 10, pp. 667–685). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3738>

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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134234>

Narengaowa, Kong, W., Lan, F., Awan, U. F. y cols. (2021). The Oral-Gut-Brain AXIS: The Influence of Microbes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.633735>

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(3), 868–880. <https://doi.org/10.1111/odi.13044>

Otani, T., y Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. En *Trends in Cell Biology* (Vol. 30, Número 10, pp. 805–817). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>

Palioto, D. B., Finoti, L. S., Kinane, D. F., y Benakanakere, M. (2019). Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(8), 819–829. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13151>

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M. y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(S20).

Parra-Torres, V., Melgar-Rodríguez, S., Muñoz-Manríquez, C., Sanhueza, B., Cafferata, E. A. y cols. (2023). Periodontal bacteria in the brain—Implication for Alzheimer's disease: A systematic review. *Oral Diseases*, 29(1), 21–28. <https://doi.org/10.1111/odi.14054>

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *The Lancet*, 366(9499), 1809–1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)

Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I. y cols. (2014). Active invasion of Porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in ApoE<sup>-/-</sup> mice brains. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43(1), 67–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-140315>

Ramirez, V., Swain, S., Murray, K., y Reardon, C. (2020). Neural Immune Communication in the Control of Host-Bacterial Pathogen Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Infection and immunity*, 88(9). <https://doi.org/10.1128/IAI.00928-19>

Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., y Castell, M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1). <https://doi.org/10.4321/S1130-01082008000100006>

Raybould, H. E., Cooke, H. J., y Christofi, F. L. (2004). Sensory mechanisms: transmitters, modulators and reflexes. *Neurogastroenterology y Motility*, 16(s1), 60–63. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00477.x>

Rhee, S. H., Pothoulakis, C., y Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nature reviews. Gastroenterology y hepatology*, 6(5), 306–314. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2009.35>

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. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2001.00100.x>

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. <https://doi.org/10.3233/JAD-170304>

Rousseaux, S., y Khochbin, S. (2015). Histone Acylation beyond Acetylation: Terra Incognita in Chromatin Biology. En *CELL JOURNAL(Yakhteh)* (Vol. 17, Número 1).

Rubinstein, M. R., Baik, J. E., Lagana, S. M., Han, R. P., Raab, W. J. y cols. (2019). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing

Wnt/ $\beta$ -catenin modulator Annexin A1. *EMBO reports*, 20(4).  
<https://doi.org/10.15252/embr.201847638>

Sansores-España, L. D., Melgar-Rodríguez, S., Olivares-Sagredo, K., Cafferata, E. A., Martínez-Aguilar. y cols. (2021). Oral-Gut-Brain Axis in Experimental Models of Periodontitis: Associating Gut Dysbiosis With Neurodegenerative Diseases. En *Frontiers in Aging* (Vol. 2). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/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(1). <https://doi.org/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 of Periodontal Research*, 53(6), 950–960. <https://doi.org/10.1111/jre.12593>

Saygun, I., Nizam, N., Keskiner, I., Bal, V., Kubar, A. y cols. (2011). Salivary infectious agents and periodontal disease status. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), 235–239. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01335.x>

Udagawa, S., Katagiri, S., Maekawa, S., Takeuchi, Y., Komazaki, R. y cols. (2018). Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(6), 433-441. <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1426876>

Schirmer, M., Smeekens, S. P., Vlamakis, H., Jaeger, M., Oosting, M. y cols. (2016). Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell*, 167(4), 1125-1136.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.020>

Senghor, B., Sokhna, C., Ruimy, R., y Lagier, J.-C. (2018). Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance. *Human Microbiome Journal*, 7–8, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.01.001>

Singh Rao, 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<sup>-/-</sup> mice brains. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1270602>

Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A. y cols. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>

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(4), e1251384. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1159/000018651>

Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13357>

Szentkuti, L., y Lorenz, K. (1995). The thickness of the mucus layer in different segments of the rat intestine. *The Histochemical Journal*, 27(6), 466–472. <https://doi.org/10.1007/BF00173712>

Szulc, M., Kustrzycki, W., Janczak, D., Michalowska, D., Baczynska, D. y cols. (2015). Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous Plaques from Coronary and Carotid Arteries. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/825397>

Thomson, A. B. R., Drozdowski, L., Lordache, C., Thomson, B. K. A., Vermeire, S. y cols. (2003). Small Bowel Review Normal Physiology, Part 1. En *Digestive Diseases and Sciences* (Vol. 48, Número 8).

Tonetti, M. S., y Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAPWorkshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology*, 84(4S). <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340019>

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R. y cols. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>

van de Wouw, M., Schellekens, H., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2017). Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. *The Journal of Nutrition*, 147(5), 727–745. <https://doi.org/10.3945/jn.116.240481>

Vanterpool, S. F., Been, J. V., Houben, M. L., Groenendaal, F., De Krijger, R. R. y cols. (2016). Porphyromonas gingivalis within placental villous mesenchyme and umbilical cord stroma is associated with adverse pregnancy outcome. PLOS ONE, 11(1), e0146157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146157>

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

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

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(11), 1789–1795. <https://doi.org/10.1177/00220345950740111201>

- Wadachi, R., y Hargreaves, K. M. (2006). Trigeminal Nociceptors Express TLR-4 and CD14: a Mechanism for Pain due to Infection. *Journal of Dental Research*, 85(1), 49–53. <https://doi.org/10.1177/154405910608500108>
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A.-M., Chen, P. y cols. (2015). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *Journal of Immunological Methods*, 421, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015>
- Wang, T., Holt, M. V., y Young, N. L. (2018). Early butyrate induced acetylation of histone H4 is proteoform specific and linked to methylation state. *Epigenetics*, 13(5), 519–535. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1475979>
- Wheatcroft, J., Wakelin, D., Smith, A., Mahoney, C. R., Mawe, G. y cols. (2005). Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. *Neurogastroenterology y Motility*, 17(6), 863–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00719.x>
- Winter, S. E., Lopez, C. A., y Bäumlér, A. J. (2013). The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO reports*, 14(4), 319–327. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.27>
- Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F. y cols. (2017). Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer’s disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.002>
- Xue, L., Zou, X., Yang, X. Q., Peng, F., Yu, D. K. y cols. (2020). Chronic periodontitis induces microbiota-gut-brain axis disorders and cognitive impairment in mice. *Experimental Neurology*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113176>
- Yuan, L. (2015). Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 7(28), 2811. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i28.2811>

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). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1052-x>

## 10. ANEXOS.

### Anexo N°1



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

## Anexo N°2



UNIVERSIDAD DE CHILE  
 FACULTAD DE MEDICINA  
 COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

**CONSTANCIA**

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que ha recibido para su estudio el Protocolo correspondiente al proyecto titulado “Evaluación del eje oral-intestino-cerebro: efecto de las enfermedades orales en la estabilidad de las barreras intestinales y hemato-encefálica”. (enero de 2023 a marzo de 2025), los Investigadores Responsables son la Dra(c). Samanta Melgar Rodríguez y el Dr(c). Luis Sansores España, Tesistas del Programa de Doctorado en Ciencias Odontológicas de la Universidad de Chile. El Patrocinador es el Dr. José Luis Valdés, Prof. Asociado, Laboratorio de Aprendizaje, Memoria y Neuromodulación, Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. El proyecto indicado será financiado por la **Regional Development Program IADR, 01 de abril de 2020 al 31 de mayo de 2023. Proyecto Fondo de Investigación Universidad de Atacama, 02 de marzo de 2023 al 01 de marzo 2025.**

El presente documento sólo confirma la recepción de los antecedentes y posterior a su análisis, el Comité dará a conocer el resultado de este estudio otorgando el veredicto correspondiente (certificación).

  
**Dra. Zully Pedrozo**  
 Presidenta



Comité de Bioética sobre Investigación en Animales

Santiago, 23 de octubre, 2023.

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales  
 Facultad de Medicina – Universidad de Chile  
 Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile  
 Fono: 2 978 6923, Email: cba@med.uchile.cl