



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE PERIODONCIA**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL Y LA
PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA”**

Milenko Miroslav Mitrovic Urrutia

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociado Dr. Jaime Diaz Zúñiga

ASESOR EXTERNO

Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2023-2025

**Santiago Chile
2024**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PERIODONCIA**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL Y LA
PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA”**

Milenko Miroslav Mitrovic Urrutia

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociado Dr. Jaime Diaz Zúñiga

ASESOR EXTERNO

Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar

Adscrito a Proyecto RDP-IADR 2023-2025

Santiago Chile

2024

Dedico este trabajo a personas importantes

Que me acompañaron en este proceso y que ya no están

Abuelo y D.P.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su esfuerzo, dedicación, entendimiento y el apoyo incondicional que me brindan día a día. A mi hermana por sacarme siempre una risa, por su compañía y la conexión tan genuina que tenemos. Son un pilar fundamental en mi vida, los amo.

A los excelentes doctores que tuve la suerte de conocer en este proceso de formación tanto en los ramos de ciencias, preclínicos y clínicas que en su gran mayoría tuvieron vocación para enseñar con respeto y amabilidad entendiendo que uno está en un proceso de aprendizaje.

A mi tutor Prof. Dr. Jaime Diaz Zúñiga por su compromiso, su confianza al permitirme ser parte de este proyecto y amabilidad durante este proceso final.

A mis amigos más cercanos que conocí en el transcurso de la carrera que hicieron mis días más alegres y por el gran soporte para superar las distintas adversidades, a mis amigos de bachillerato que han estado presentes desde antes de entrar a la facultad estando en las buenas y en las malas y también a los amigos “de la unión” que siempre estaban ahí para compartir un café y distraerse.

Por último, agradecer a los funcionarios de la facultad y a todos aquellos que no fueron mencionados, pero que fueron parte de esta larga travesía en la facultad de odontología. Eternamente agradecido.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	6
2.	MARCO TEÓRICO	7
	2.1 La barrera hematoencefálica.....	8
	2.2 Eje oral-intestinal.....	10
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
	4.1 Modelo de periodontitis experimental.....	12
	4.2 Obtención de muestras y cuantificación de la destrucción ósea	12
	4.3 Ensayo de permeabilización <i>in vivo</i>	13
	4.4 Análisis mediante inmunofluorescencia	14
	4.5 Análisis de los datos.....	14
5.	RESULTADOS	15
	5.1 La periodontitis induce alteración de la permeabilidad intestinal.....	16
	5.2 La periodontitis induce en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	19
6.	DISCUSIÓN.....	22
7.	CONCLUSIONES	26
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
9.	ANEXO	38

1. RESUMEN

Introducción: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible asociada a una microbiota oral disbiótica y a la susceptibilidad del hospedero que se caracteriza por una destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente. La periodontitis experimental inducida por ligadura tiene como ventaja la rápida inducción de la enfermedad. El estado de inflamación que genera la periodontitis podría generar cambios inflamatorios a nivel sistémico que afecten a la mucosa intestinal y la barrera hematoencefálica la cual dentro de sus funciones es proteger al SNC. En esta investigación se analizará la relación que existe entre la periodontitis y la disrupción de la barrera intestinal y hematoencefálica.

Metodología: Se realizó la inducción de periodontitis a 8 ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad mediante la instalación de una sutura de seda alrededor del segundo molar maxilar derecho durante 30 días consecutivos. Para la evaluación de la integridad de la barrera intestinal y hematoencefálica a cada animal se le administró el día 30, 300 μ L de FITC-dextrano 4 kDa por oral gavaje y luego se eutanasiaron para la obtención de las distintas muestras biológicas de suero, hipocampo, cerebelo, corteza, mesencéfalo, intestino delgado y riñones que fueron analizadas mediante inmunofluorescencia. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Kolgomorov-Smirnof y se analizaron utilizando las pruebas t-test o Mann-Whitney y ANOVA-Tukey o Kruskal Wallis-Dunn.

Resultados: Luego de 30 días se evidencia la presencia de resorción ósea marginal y confirma la presencia de periodontitis experimental. Un aumento en la concentración del marcador FITC-dextrano 4 kDa se detectó en el suero y en la mucosa intestinal demostrando un aumento en la permeabilidad. En el hipocampo y mesencéfalo se observa un mayor índice de permeabilidad en las ratas afectadas de periodontitis en comparación a las ratas control.

Conclusiones: La periodontitis experimental induce un aumento en la permeabilidad de las barrera intestinal y hematoencefálica.

2. MARCO TEÓRICO

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible cuya causa principal es una microbiota subgingival disbiótica y que se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente que puede provocar su pérdida (Fischer et al. 2020). Esta destrucción del tejido de soporte periodontal es causada principalmente por la respuesta inflamatoria e inmune del hospedero (Kwon, Lamster , and Levin 2021) inducida ante ciertas bacterias causantes de la disbiosis, como son *Porphyromonas gingivalis* (Marcano et al. 2021), *Tannerella forsythia* (Ramos-Perfecto 2020) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Díaz Zúñiga et al. 2012), que poseen diversos factores de virulencia asociados a inicio, progresión y severidad de la periodontitis (Jiao, Hasegawa, and Inohara 2014), sumado a los factores de riesgo como la diabetes (Preshaw and Bissett 2019), tabaquismo y factores ambientales (Darby 2022).

Existen diversos modelos y metodologías para poder estudiar la periodontitis. Los modelos experimentales de periodontitis son adecuados tanto para investigar la interacción entre los micro-organismos orales y las respuestas del hospedero durante su desarrollo, como para evaluar nuevas terapias (Marchesan et al. 2018; Li et al. 2023).

Dentro de los métodos para inducir periodontitis está la ligadura, que consiste en colocar una sutura de seda alrededor del primer o segundo molar maxilar de roedores (De Molon et al. 2018) con el objetivo de crear una disbiosis que induzca una respuesta pro-inflamatoria y osteo-resortiva (Marchesan, et al. 2018). Este método de periodontitis experimental tiene como ventaja una rápida inducción de la enfermedad, en un momento conocido, mostrando una pérdida de hueso alveolar e inflamación de tejidos blandos en un periodo de siete días (Lin et al. 2021). Además, la respuesta inmunológica detectada en los tejidos periodontales es similar a la observada en los tejidos periodontales humanos cuando están afectados por periodontitis (Graves et al. 2008; Abe and Hajishengallis 2013). De esta manera, el modelo de periodontitis permite un análisis exhaustivo del genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma de los roedores (Hiyari et al. 2018).

El estado de inflamación crónica y disbiosis de la microbiota oral producida por la periodontitis podría generar cambios inflamatorios en la mucosa intestinal, generar una microbiota disfuncional que debilite las uniones estrechas entre los enterocitos y, en consecuencia, incrementar la permeabilidad intestinal (Albuquerque-Souza and Sahingur 2022; Lam et al. 2023). Esto, debido a que tanto la cavidad oral como el intestino presentan similitudes, como una gran variabilidad de especies microbiológicas que colonizan las cavidades o que ambos son susceptibles a la inflamación crónica mediada por disbiosis (Palioto et al. 2019). Recientemente, en ratones se evaluó el efecto de la periodontitis experimental en la estabilidad de la microbiota intestinal y el estado cognitivo (Palioto, et al. 2019; Xue et al. 2020). Por una parte, se demostró que la periodontitis inducida por ligadura genera inflamación intestinal y, por otra parte, la periodontitis induce deterioro cognitivo. Una posible explicación a estos fenómenos podría deberse al incremento de la permeabilidad de los tejidos periodontales que se encuentran inflamados, lo que permitiría la difusión de bacterias, endotoxinas y/o citoquinas pro-inflamatorias hacia otros tejidos del cuerpo (Palioto, et al. 2019). Además, la periodontitis podría inducir el deterioro de la barrera hematoencefálica en el cerebro de ratones y de esa manera inducir inflamación (Xue, et al. 2020).

2.1 La barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales vasculares que recubren los capilares cerebrales que ingresan al cerebro y médula espinal en la mayoría de los mamíferos y otros organismos con un SNC bien desarrollado (Kadry, Noorani, and Cucullo 2020). Estos vasos sanguíneos contienen una serie de propiedades que permiten regular de manera estricta el transporte de moléculas, iones y células desde la circulación sanguínea periférica hacia el SNC (Daneman and Prat 2015), evitando que las células sanguíneas, componentes plasmáticos o patógenos ingresen al cerebro. Así, la barrera hematoencefálica mantiene el entorno cerebral estable y protegido de sustancias que podrían dañarlo (Alahmari 2021).

Las células endoteliales vasculares del cerebro presentan características

morfológicas, estructurales y funcionales que las diferencian de otras células endoteliales, como la expresión de uniones estrechas que sellan las uniones paracelulares entre células endoteliales adyacentes evitando el paso no regulado de moléculas polares entre sangre y cerebro, ausencia de fenestraciones, falta de actividad pinocítica y la expresión de mecanismos activos de regulación para el paso de moléculas esenciales y bloqueo de sustancias neurotóxicas (Kadry, Noorani, and Cucullo 2020). Los diferentes tipos de células que constituyen la unidad neurovascular son células vasculares (endotelios, pericitos y astrocitos), microglías y neuronas que contribuyen a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Sweeney et al. 2019). De este modo, los cambios en la estructura de la barrera hematoencefálica pueden llegar a comprometer su integridad en varios niveles, como alteración en las células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos, provocando una infiltración de estos al parénquima cerebral, disminuyendo la expresión de proteínas de las uniones estrechas o incrementando la permeabilidad de la barrera (Knox et al. 2022).

La inflamación es un factor común que contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y accidente cerebrovascular (Huang, Hussain, and Chang 2021). Por otro lado, diversos estudios señalan que en personas afectadas por periodontitis existe un alto riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (Ide et al. 2016; Alvarenga et al. 2021; Borsa et al. 2021; Kose et al. 2021; Sansores-España et al. 2021a; Bian, Chen, and Lei 2022). Además, la neuroinflamación inducida por el estrés o inflamación tiene un rol relevante en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Furutama et al. 2020). La activación de las microglías, astrocitos y células endoteliales aumentan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL-1 β , que pueden alterar la barrera hematoencefálica (Huang, Hussain, and Chang 2021). La función de la barrera hematoencefálica es proteger al sistema nervioso central, la cual en condiciones fisiológicas está libre de patógenos y toxinas. La evidencia plantea que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratones se ve afectada por la disbiosis intestinal causando alteraciones a nivel cerebral produciendo un estado de

neuroinflamación y neurodegeneración (Li et al. 2022).

Cada día existe más evidencia científica que indica que la microbiota oral está involucrada en diferentes enfermedades crónicas no transmisibles como diabetes (Pihlstrom, Michalowicz, and Johnson 2005; Baeza et al. 2020; Wu et al. 2020), cardiovasculares (Sanz et al. 2020), renal crónica (Hickey et al. 2020; Baciú, Mesaroş, and Kacso 2023), dislipidemia (Gomes-Filho et al. 2022; Bitencourt et al. 2023), hipertensión (Czesnikiewicz-Guzik et al. 2019; Del Pinto et al. 2020), entre otras. Además, los estudios demuestran que, en ratones, *P. gingivalis* induce la disbiosis de la microbiota intestinal afectando la función de la barrera intestinal (Kobayashi et al. 2020).

2.2 Eje oral-intestinal

La relación que existe entre la cavidad oral y el intestino es muy estrecha, por lo que durante una disbiosis oral existe un aumento de bacterias anaerobias asociadas a una periodontitis, produciendo un aumento en la carga de bacterias deglutidas a diario y que se encuentran presentes en la saliva (Kitamoto et al. 2020; Lu et al. 2022). En consecuencia, esta disbiosis oral podría inducir la disbiosis intestinal, caracterizada por la alteración en la composición y comportamiento de ciertas bacterias de la microbiota, la alteración en la permeabilización de la barrera e inflamación intestinal (Sansores-España et al. 2021b). En este mismo estudio (Sansores-España, et al. 2021b) se menciona la bidireccionalidad entre los ejes cerebro-intestino, a partir del nervio vago, y cerebro-oral, mediante el nervio trigémino. De esta manera, el eje oral-intestino-cerebro podría estar asociado al origen de una respuesta inflamatoria sistémica y neuroinflamación. Es por esta evidencia que se plantea la necesidad de investigar las causas y direccionalidad que existe entre la periodontitis, la disrupción de la barrera intestinal y la disrupción de la barrera hematoencefálica.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La periodontitis experimental inducida mediante ligadura en ratas Sprague-Dawley jóvenes genera alteraciones en la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica, en comparación a animales sin periodontitis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar cómo la periodontitis altera la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica en ratas Sprague-Dawley jóvenes afectadas por periodontitis experimental inducida por ligadura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el estado periodontal de ratas Sprague-Dawley macho afectadas por periodontitis experimental inducida por ligadura.
2. Analizar la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica de ratas Sprague-Dawley macho afectadas por periodontitis experimental inducida por ligadura.
3. Comparar la presencia o ausencia de periodontitis con el estado de la barrera hematoencefálica de ratas Sprague-Dawley macho.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelo de periodontitis experimental

Para la inducción de periodontitis se utilizaron 8 ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad, obtenidas del Bioterio del Centro de Investigación Regional “Hideyo Noguchi” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Yucatán, México, lugar donde las ratas se mantuvieron durante todo el período de experimentación. Las ratas se alojaron en jaulas separadas, con filtros de aire y en condiciones estándar bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad, a $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 40-70% de humedad relativa, con agua y alimentación *ad libitum*, excepto cuando se indican otras condiciones. Todos los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Ciencias Odontológicas, de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, México.

Todos los animales fueron sometidos a anestesia general con Isoflurano al 3% v/v en oxígeno a un flujo de 1 L/min. Luego, a los animales experimentales se les instaló una sutura de seda 5-0 alrededor del segundo molar maxilar derecho. De manera diaria y por 30 días consecutivos, a todos los animales se les controló la presencia de la ligadura. En caso de que un animal perdiera la ligadura, todos los animales fueron ligados nuevamente. Este es un procedimiento inocuo, que no genera daño en los tejidos blandos y, eventualmente, puede causar molestias leves al presionar el espacio interdentario. Debido a ello, no se consideró analgesia, excepto cuando la escala de Grimace indicara lo contrario. Finalmente, para la ejecución del presente trabajo de investigación, las muestras de maxilares y los tejidos obtenidos se enviaron posterior a su obtención y preservación al Laboratorio de Biología Periodontal, de la Facultad de Odontología, de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos se realizaron con previa aprobación ética del comité institucional de la Universidad Autónoma de Yucatán (Anexo N°1).

4.2 Obtención de muestras y cuantificación de la destrucción ósea

Luego de 30 días, todos los animales se eutanasiaron según la muestra biológica a obtener. De todas las ratas, el hemimaxilar se separó del resto del cráneo para aislar el hueso maxilar. Brevemente, con un bisturí N°15 se realizó una incisión

inmediatamente anterior a la primera rugosidad palatina, se decoló toda la mucosa palatina y luego, a cada hemimaxilar se eliminó todo el tejido blando e incubó secuencialmente durante 2 horas en etanol 70%, seguido de etanol 90% y etanol 100%. Cada maxilar se almacenó en etanol 100% a temperatura ambiente hasta realizar el análisis. Los maxilares deshidratados se trasladaron al Laboratorio de Biología Periodontal, lugar donde se procedió con el análisis.

Para evaluar la posible pérdida de hueso, cada maxilar se escaneó con un equipo Bruker microCT (SkyScan 1278; Bruker, Kontich, Belgium) utilizando los siguientes parámetros: 59 kV, 588 μ A, 0, 5° de rotación y 360° de rango angular. Posteriormente se obtuvieron imágenes en 3D y la cuantificación de la resorción ósea se realizó utilizando el software Nrecon (Bruker, Kontich, Belgium) según las mediciones descritas previamente (Park, Abramson y cols., 2007). Brevemente, se realizaron mediciones lineales desde el límite amelocementario a la cresta ósea alveolar de todas las raíces de los molares superiores del lado derecho e izquierdo.

4.3 Ensayo de permeabilización *in vivo*

Para la evaluación de la integridad de la barrera intestinal y hematoencefálica, a cada animal se le administró el día 30, 300 μ L de FITC-dextrano 4 kDa por vía oral gavage. Luego de 4 horas, los animales bajo anestesia general con isoflurano 3% v/v en flujo de O₂ 1 L se perfundieron con solución salina de NaCl 0,9% para eliminar la sangre del animal. La sangre total se recibió en un tubo Falcon de 50 mL para aislar el suero y, seguidamente, se extrajo el cerebro *ad integrum*. El cerebro se dividió en 2 hemisferios, donde el hemisferio derecho se separó en corteza, mesencéfalo, hipocampo y cerebelo y se mantuvieron en solución tamponadora para su homogeneización mecánica. Brevemente, las muestras se lavaron con 1 mL de NaCl al 0,9% 3 veces y luego con 10 μ L de tampón que contiene Tris-HCl 0,5 M, NaCl 2 M, CaCl₂ 250 mM, Tx100 al 25% e inhibidor de proteasa, por cada mg de peso de muestra. Cada muestra se homogeneizó mecánicamente y centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se reservó para el análisis. Así, a partir de 100 μ L de las muestras de suero, hipocampo, cerebelo, corteza y mesencéfalo se realizó la lectura de fluorescencia en un lector de placas con excitación 485/emisión 528. Finalmente, a partir del valor de fluorescencia se

calculó la concentración basándose en la curva estándar, ajustando la dilución y el peso de cada animal. Además, como complemento se realizaron los mismos procedimientos en el intestino delgado y riñones, con el objetivo de determinar cuánto del marcador administrado ingresa a la circulación sanguínea, cuánto se concentra en el intestino y cuánto se filtra por los riñones. De esa manera, determinamos de mejor manera si lo detectado en los cerebros es por un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

4.4 Análisis mediante inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia, en los mismos animales anteriormente indicados, el hemiserebro y el riñón izquierdo se aislaron y sumergieron inmediatamente en paraformaldehído 4%. Posteriormente se fijaron en parafina y se enviaron hasta el Laboratorio de Biología Periodontal, donde se procedió con su procesamiento y posterior análisis.

Una vez desparafinadas, el duodeno, yeyuno, íleon, y los hemiserebros se cortaron en el plano coronal con un criostato a -30°C . Las secciones de $30\ \mu\text{m}$ de grosor se colocaron sobre un portaobjeto con polilisina y las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio confocal (Nikon C2 +, Melville, NY). Un total de 30-35 imágenes por cada corte se obtuvieron y mediante el software gratuito ImageJ (National Institutes of Health, MD, EUA; <https://imagej.nih.gov/ij/>) se realizó el análisis y reconstrucción de cada corte histológico.

4.5 Análisis de los datos

La cuantificación de la destrucción ósea se representa en el valor promedio de la distancia en $\mu\text{m} \pm$ desviación estándar. La inmunofluorescencia se representa en gráficas del valor promedio de las unidades de intensidad \pm desviación estándar. El índice de permeabilidad se gráfica en promedio de números absolutos \pm desviación estándar. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se analizaron utilizando las pruebas t-test o Mann-Whitney y ANOVA-Tukey o Kruskal Wallis-Dunn, dependiendo de la distribución paramétrica o no-paramétrica de los datos. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p\text{-value} < 0,05$.

5. RESULTADOS

Luego de 30 días, en las ratas afectadas de periodontitis experimental inducida por ligadura se observó mayor resorción ósea marginal en los molares maxilares en comparación con las ratas control (Fig. N°1). Este dato evidencia la presencia de resorción ósea marginal y, por tanto, confirma la presencia de periodontitis experimental.

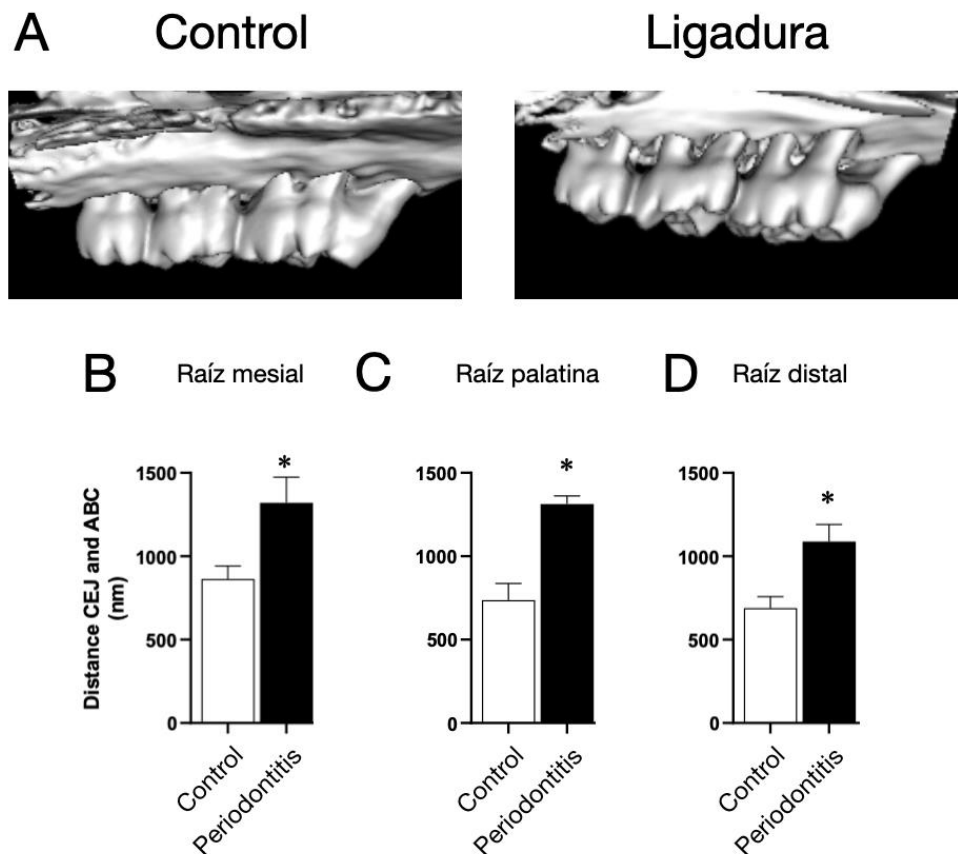


Figura N°1. Resorción ósea. A partir de la obtención de muestras de cada maxilar se realizó una reconstrucción 3D mediante microCT para cuantificar la resorción ósea que produjo la periodontitis inducida por ligadura. A) Ratas control y con ligadura, B) Distancia desde unión amelo-cementaria a la cresta ósea alveolar de la raíz mesial del primer molar maxilar, C) Distancia desde unión amelo-cementaria a la cresta ósea alveolar de la raíz distal del primer molar maxilar, D) Distancia desde unión amelo-cementaria a la cresta ósea alveolar de la raíz palatina del primer molar maxilar. Los datos presentan media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. CEJ: cementum-enamel junction, ABC: alveolar bone crest. nm: nanómetros. * $p < 0,05$.

5.1 La periodontitis induce alteración de la permeabilidad intestinal

Luego de determinar que la ligadura es capaz de inducir periodontitis, evaluamos la estabilidad de la barrera intestinal mediante un ensayo de permeabilidad *in vivo*. Para ello, luego de 30 días se administró FITC-dextrano 4 kDa mediante oral gavage y evaluó la difusión del marcador hacia el suero, la orina, los riñones, el duodeno, yeyuno e íleon (Fig. N°2 y 3). A nivel sérico encontramos un incremento significativo del marcador, lo que demuestra una mayor permeabilidad del intestino. 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 (Fig. N°2B y 2C). 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°2D 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.

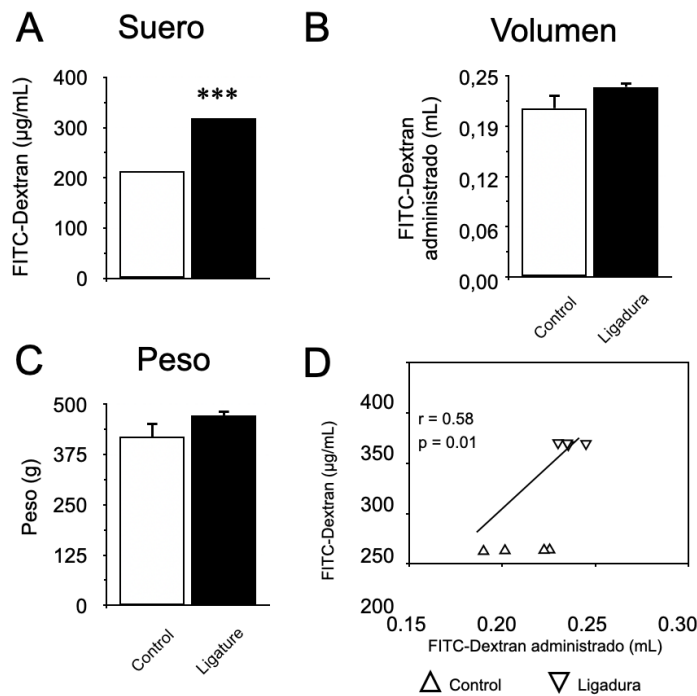
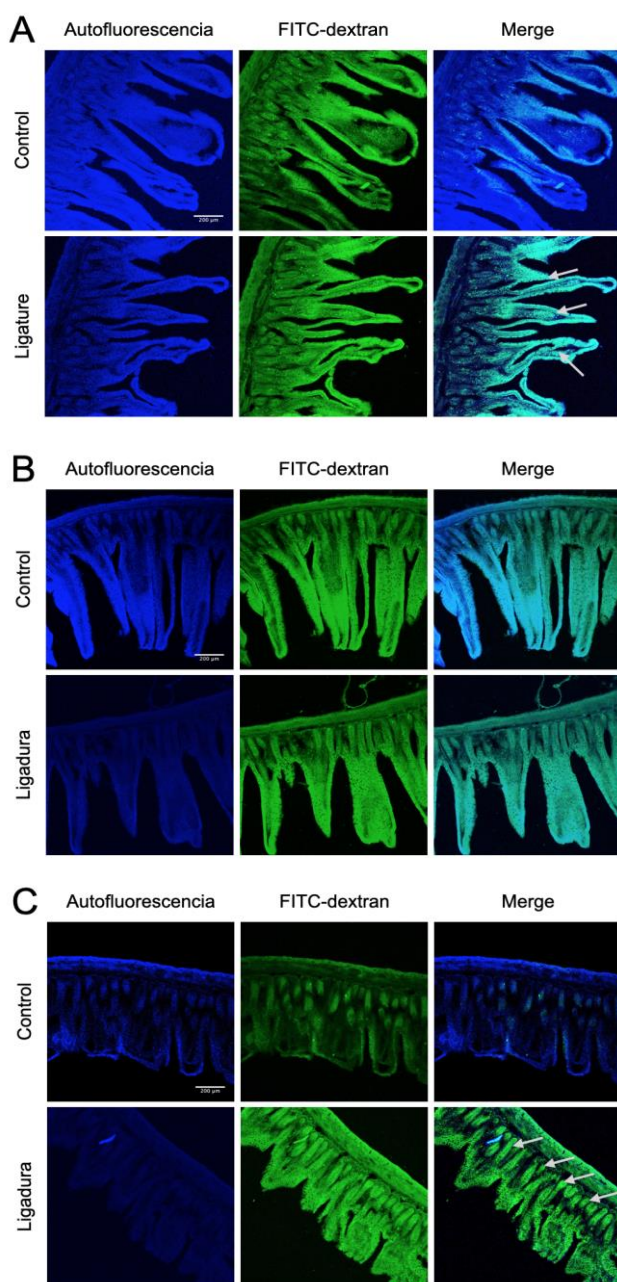


Figura N°2. Cuantificación de niveles de FITC-dextrano en suero en ratas con periodontitis experimental. A partir del suero obtenido de ratas controles y experimentales se cuantificaron los niveles de FITC-dextrano A). Volumen de FITC-Dextrano en suero, B). Volumen de FITC-dextrano administrado a cada 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

(µg/ml), volumen administrado de FITC-Dextrano (mL), peso de las ratas (g). Cada gráfica representa

los datos de 4 experimentos independientes por cada grupo. μg : microgramos, mL : mililitros, g : gramo. ANOVA-Tukey, $***p < 0.001$.



Luego, a través de microscopía confocal se observó la presencia del FITC-Dextrano en el duodeno, yeyuno e íleon, donde se observa la presencia del marcador (Fig. N°3).

Figura N°3. 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 (flechas grises) la marca de FITC que difundió desde el lumen intestinal hacia la mucosa intestinal.

Posteriormente, evaluamos cuánto del FITC-dextrano administrado se estaba excretando por la orina o estaba siendo filtrado en los riñones. A nivel renal no se encontraron diferencias entre las ratas con periodontitis de las controles en la concentración de FITC-dextrano detectado en homogeneizados de riñón ni en la orina (Fig. N°4). 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.

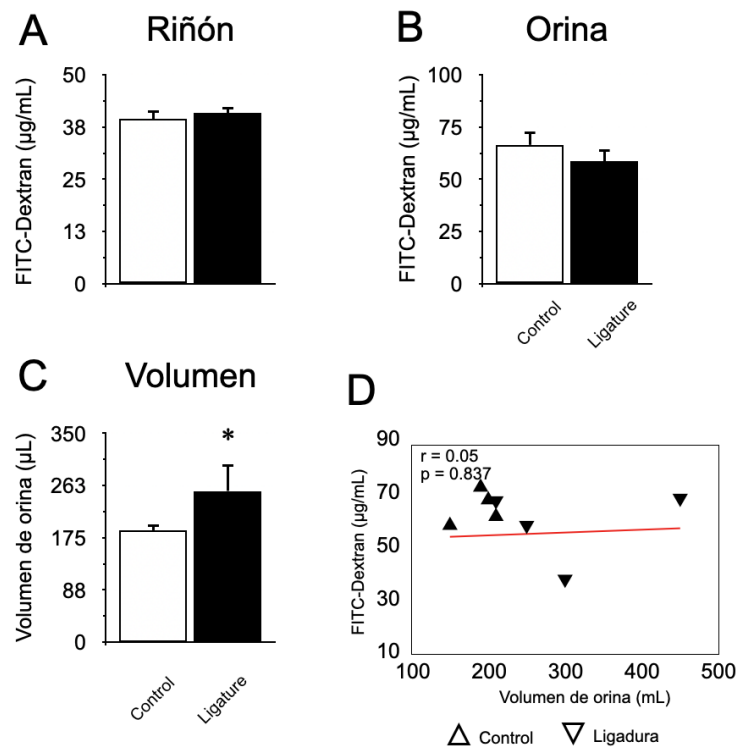


Figura N°4.

Cuantificación de niveles de FITC-dextrano en riñón y orina. A partir de orina y riñón obtenido de ratas controles y experimentales se cuantificaron los niveles de FITC-dextrano. A) Cuantificación de FITC-dextrano en riñón homogeneizado, B) Cuantificación de FITC-dextrano en orina, C) Volumen total de orina, D) Correlación entre el FICT-dextrano cuantificado en orina y el volumen total de orina. Los datos se presentan como concentración de moléculas (µg/ml), volumen de orina (µL); media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes por cada grupo. µg: microgramos, mL: mililitro. ANOVA-Tukey, * $p < 0,05$.

Al evaluar cuánto marcador se acumuló en la médula o corteza renal, se

observa que en los grupos experimentales y control no hubo diferencias, lo que demuestra que la mayor concentración de FITC-dextrano en la orina no depende de una mayor concentración o filtración renal (Fig. N°5).

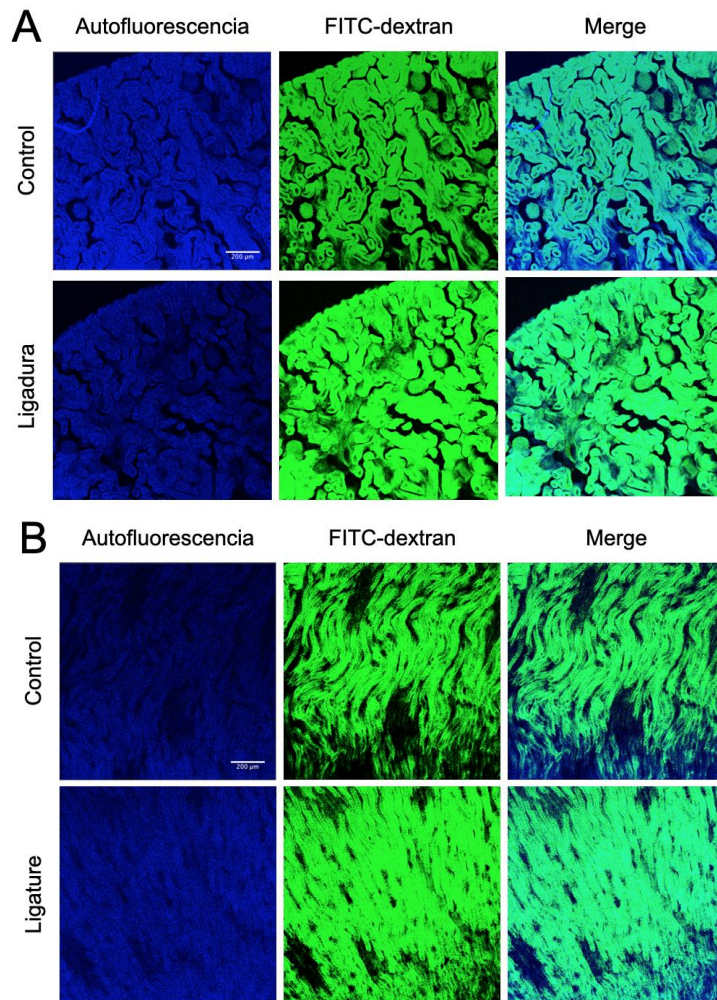


Figura N°5. Inmunofluorescencia de riñón en ratas con periodontitis experimental. A partir de los riñones preservados en PFA 4% se evaluó la distribución del FITC-dextrano mediante inmunofluorescencia. A) Proyección 3D de 30 imágenes 2D de la corteza renal, B) Proyección 3D de 32 imágenes 2D de la médula renal.

5.2 La periodontitis induce en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Finalmente se evaluó la acumulación de FITC-Dextrano en hipocampo, cerebelo, mesencéfalo y encéfalo (Fig. N°6). Para ello se determinó el índice de permeabilidad, el cual es una razón entre la concentración de FITC-dextrano detectado en suero y ajustado al peso de cada animal y la concentración de FITC-dextrano detectado en el tejido ajustado al peso del tejido. En las ratas con periodontitis inducida por ligadura se observó un incremento del índice de

permeabilidad de FITC-Dextrano en el hipocampo y mesencéfalo en comparación con las ratas control (Fig. N°6A y 6B).

Finalmente, en las imágenes se logra observar una mayor intensidad de FITC-dextrano en el hipocampo, mesencéfalo y corteza cerebral de las ratas afectadas por periodontitis experimental en comparación con las ratas control (Fig. N°7).

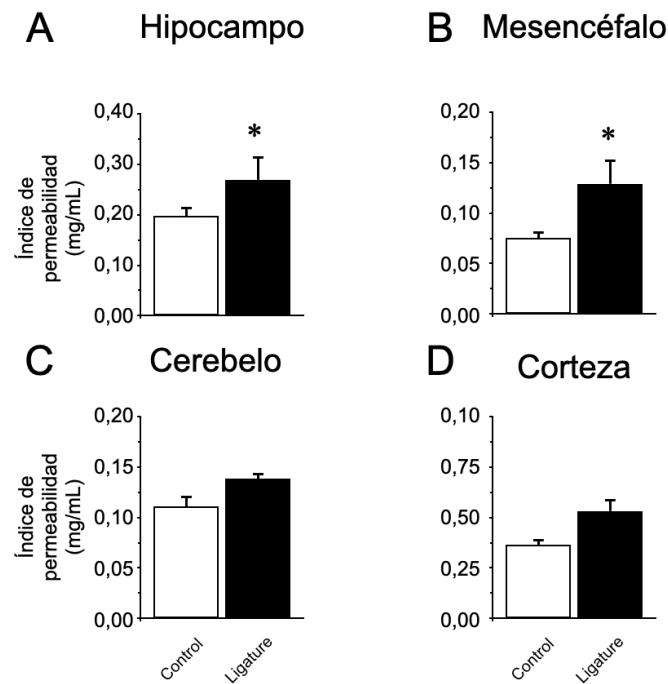


Figura N°6. Índice de permeabilidad en tejidos cerebrales Cuantificación del índice de permeabilidad para A) Hipocampo, B) Mesencéfalo, C) Cerebelo, y D) Corteza cerebral. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del índice de permeabilidad de 4 experimentos independientes por cada grupo. mg: miligramos, mL: mililitros. ANOVA-Tukey, * $p < 0,05$.

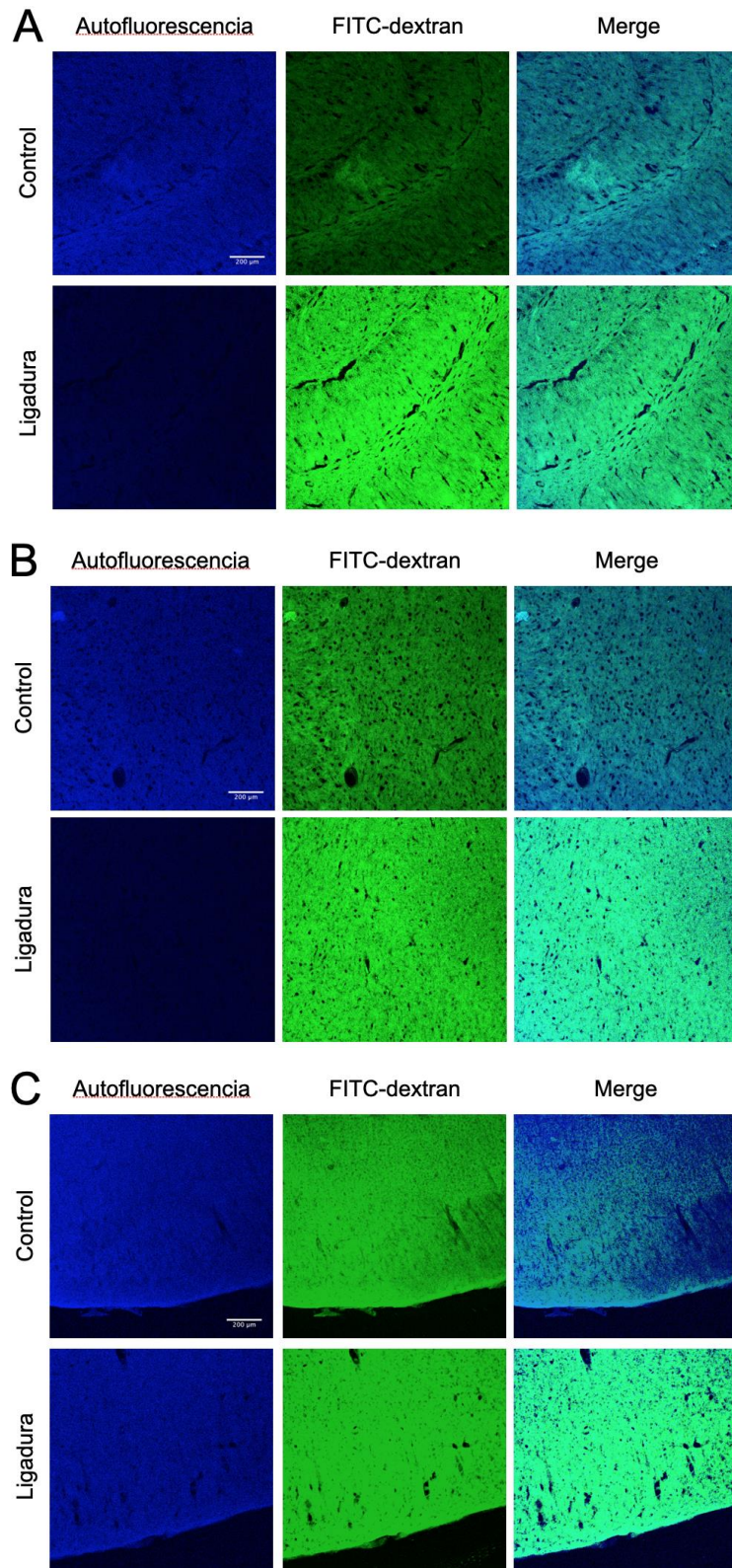


Figura N°7. Inmunofluorescencia de tejidos cerebrales en ratas con periodontitis experimental. A partir de los hemisferios preservados en PFA 4% se evaluó la distribución del FITC-dextrano mediante inmunofluorescencia. A) Proyección 3D de 30 imágenes 2D del hipocampo, B) Proyección 3D de 32 imágenes 2D de mesencéfalo. C) Proyección 3D de 32 imágenes 2D de corteza cerebral.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, a partir de ratas Sprague-Dawley macho a las cuales se les indujo periodontitis mediante ligadura pudimos observar luego de 30 días existe un aumento en la permeabilidad intestinal en comparación con el grupo control. Además, la presencia del marcador se observó en la mucosa del duodeno, yeyuno e íleon, lo que sugiere que la periodontitis podría estar asociada a una disfunción de la barrera intestinal, permitiendo una mayor absorción de sustancias de alto peso molecular como es el caso del marcador. Este efecto podría tener implicancia en la respuesta inflamatoria y en el estado de salud en general.

La eficacia del método de ligadura para inducir periodontitis en el modelo experimental utilizado en la investigación actual confirma que es ideal para poder estudiar esta enfermedad, ya que se produce una resorción ósea marginal significativa en comparación al grupo control. La presencia de periodontitis no solo afecta localmente a las estructuras periodontales, sino que también, puede tener efectos en otros órganos o tejidos, tal y como se investigó en relación con la inducción de alteración de la permeabilidad intestinal y de la barrera hematoencefálica.

El marcador FITC-dextrano 4 kDa es un polisacárido no digerible conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Camilleri et al. 2012) y se utiliza para analizar la permeabilidad total, que incluye la permeabilidad paracelular y endotelial (Galipeau et al. 2016). Dado su tamaño molecular, el Dextrano no traspasa la barrera epitelial en un individuo sano, sin embargo, cuando existe una barrera alterada estructuralmente este marcador puede ingresar a la mucosa, demostrando de esta manera una alteración en la permeabilidad de la barrera epitelial (Joly Condette et al. 2014; Wang et al. 2015). En efecto, para evaluar la estabilidad de la barrera intestinal con algún marcador, como Dextrano, se debe considerar el tiempo que tarda el quimo en migrar desde el cardias hacia la válvula íleo-cecal. Así, el Dextrano se evalúa a las 4 horas post administración debido a que es el tiempo necesario para que desde la ingestión del marcador logre llegar a la válvula íleo-cecal (Woting and Blaut 2018). Así, se pueden evaluar las 3 secciones del intestino permitiendo centrar el análisis más exhaustivo en el íleon.

En el estudio de Lu (Lu, et al. 2022) se utilizó un modelo experimental con ratones en el cual a un grupo se le indujo periodontitis mediante la administración por sonda de la microbiota salival de pacientes con periodontitis. En efecto, los animales afectados por periodontitis evidenciaron un aumento en las citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-1 β en la corteza cerebral y la alteración de la barrera intestinal. En el estudio de Kobayashi (Kobayashi, et al. 2020) a ratones de 8 semanas de edad se indujo periodontitis mediante la inoculación por sonda oral de una solución con *Streptococcus mitis*, *S. salivarius*, *P. gingivalis* o *P. nigrescens*. En estos animales se observaron alteraciones en el equilibrio de la microbiota intestinal, disminución de la función de la barrera intestinal y un aumento de toxinas de las bacterias en la sangre. Ambos estudios evaluaron la relación que existe entre la periodontitis y la mucosa intestinal, llegando a resultados similares y que complementan a los conseguidos en el presente trabajo de investigación donde obtuvimos una alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal. Además, cuando se evaluó la excreción renal del marcador los resultados demuestran que no hay diferencias significativas en la concentración detectada en riñón entre los grupos control y con periodontitis, lo que sugiere que la periodontitis no afectaría la función renal. Este resultado se asemeja a lo descrito en la literatura, ya que el marcador traspasa la barrera intestinal sin ser digerido y luego se elimina por excreción renal (Hoffmann et al. 2011). De esta manera, el incremento del índice de permeabilidad en el hipocampo y el mesencéfalo de las ratas con periodontitis sugiere que la periodontitis inducida por ligadura podría afectar la integridad de la barrera hematoencefálica en estas áreas. Este hallazgo es relevante, ya que la barrera hematoencefálica desempeña un rol fundamental en la protección del cerebro ante toxinas y patógenos y que exista la presencia del marcador hace mención de un compromiso de la barrera, pudiendo contribuir a la patogénesis de enfermedades neuroinflamatorias.

El incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica podría explicar cómo la periodontitis se asocia con enfermedades neurodegenerativas. En el trabajo de Lei (Lei et al. 2023) se realizó un estudio con un modelo de bacteriemia en ratas mediante inoculaciones de *P. gingivalis* en la cola de ratas tres veces por semana durante ocho semanas y analizó la relación con la barrera

hematoencefálica. En efecto, la presencia de *P. gingivalis* aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, pudiendo contribuir a un deterioro cognitivo de las ratas. Del mismo modo en el estudio de Furutama (Furutama, et al. 2020) se realizó un modelo de periodontitis experimental con ligadura, donde se evaluó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica mediante el análisis de los niveles de ARNm y de proteínas relacionadas con las uniones estrechas, detectando que la inflamación periodontal está relacionada con la neuroinflamación y la alteración de la barrera hematoencefálica.

La barrera hematoencefálica constituida por sus componentes celulares como células endoteliales, uniones estrechas, pericitos, astrocitos, microglías y membrana basal tienen la función de filtrar selectivamente las sustancias desde la circulación sanguínea evitando que agente nocivos traspasen la barrera y lleguen al cerebro causando daño (Zhao et al. 2015). En efecto, la alteración de cualquiera de sus componentes podría provocar una disrupción de la barrera. Una disrupción de la barrera hematoencefálica se caracteriza por degradación de las proteínas de unión de los pericitos y endotelios a la lámina basal endotelial. Además, se produce la degradación de las proteínas de las uniones estrechas induciendo de esta manera el ingreso de moléculas, fármacos, metabolitos, toxinas, o incluso bacterias desde la sangre hacia la zona del cerebro que se encuentre afectada (Sweeney 2018).

Las microglías activadas y los astrocitos liberan citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Visentin, Gobin, and Maglica 2023), las cuales tienen el potencial de aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. También se ha demostrado que la neuroinflamación regula positivamente la expresión de las moléculas de adhesión de los leucocitos endoteliales, lo que facilita la trans migración de los leucocitos al SNC. El paso de tales células inmunes al cerebro puede resultar en la producción intracerebral de más citoquinas pro-inflamatorias, IL-17, IL-22, TNF- α e IFN- γ , que comprometen aún más la integridad de la barrera hematoencefálica al alterar la expresión de las proteínas de unión (Kouki et al. 2022). De esta manera los factores pro-inflamatorios pueden afectar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo infiltración de patógenos

o agentes pro-inflamatorios al cerebro, conduciendo a una neuroinflamación y deterioro del SNC que podría terminar en el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa. En conjunto estos estudios y nuestros resultados ayudan a complementar nuestra hipótesis de investigación donde la periodontitis experimental genera una disrupción de la barrera hematoencefálica e intestinal, caracterizada por una alteración en la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas.

Por último, es importante analizar y considerar las limitaciones del estudio, es necesario sugerir nuevas investigaciones que permitan dilucidar los mecanismos que están presentes y que contribuyen a un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en modelos de periodontitis experimental. Futuros estudios podrían emplear nuevas técnicas para poder caracterizar la neuroinflamación y evaluar el impacto funcional en la disfunción de la barrera hematoencefálica inducida por periodontitis. En cuanto a las implicancias clínicas, tanto la permeabilidad y posterior disfunción de la barrera intestinal y hematoencefálica podría ser una vía potencial mediante la cual la periodontitis afecta a otros tejidos u órganos del individuo. De esta manera, la necesidad de una atención integral para el paciente evitará que se genere un ambiente que favorezca al desarrollo de una neuroinflamación y posteriormente el desarrollo de alguna enfermedad neurodegenerativa.

7. CONCLUSIONES

La periodontitis experimental induce el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica en ratas Sprague-Dawley jóvenes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, Toshiharu, and George Hajishengallis. 2013. "Optimization of the Ligature-Induced Periodontitis Model in Mice." *Journal of Immunological Methods* 394, no. 1-2 (2013-08-01): 49-54. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002>.
- Alahmari, Abeer. 2021. "Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation." *Neural Plasticity* 2021 (2021-12-06): 1-10. <https://dx.doi.org/10.1155/2021/6564585>.
- Albuquerque-Souza, Emmanuel, and Sinem E. Sahingur. 2022. "Periodontitis, Chronic Liver Diseases, and the Emerging Oral-Gut-Liver Axis." *Periodontology* 2000 89, no. 1 (2022-06-01): 125-141. <https://dx.doi.org/10.1111/prd.12427>.
- Alvarenga, María Olimpia Paz, Deborah Ribeiro Frazão, Isabella Gomes De Matos, Leonardo Oliveira Bittencourt, Nathália Carolina Fernandes Fagundes, Cassiano Kuchenbecker Rösing, Lucianne Cople Maia, and Rafael Rodrigues Lima. 2021. "Is There Any Association between Neurodegenerative Diseases and Periodontitis? A Systematic Review." *Frontiers in Aging Neuroscience* 13 (2021-05-24). <https://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2021.651437>.
- Baciu, Sorana Florica, Anca-Ştefania Mesaroş, and Ina Maria Kacso. 2023. "Chronic Kidney Disease and Periodontitis Interplay—a Narrative Review." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20, no. 2 (2023-01-11): 1298. <https://dx.doi.org/10.3390/ijerph20021298>.
- Baeza, Mauricio, Alicia Morales, Carlos Cisterna, Franco Cavalla, Gisela Jara, Yuri Isamitt, Paulina Pino, and Jorge Gamonal. 2020. "Effect of Periodontal Treatment in Patients with Periodontitis and Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Applied Oral Science* 28 (2020-01-01).

<https://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0248>.

Bian, Mengyao, Lili Chen, and Lihong Lei. 2022. "Research Progress on the Relationship between Chronic Periodontitis and Parkinson's Disease." *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)* (2022-03-01). <https://dx.doi.org/10.3724/zdxbyxb-2021-0111>.

Bitencourt, Fernando Valentim, Gustavo G. Nascimento, Susilena Arouche Costa, Silvana Regina Perez Orrico, Cecilia Claudia Costa Ribeiro, and Fábio Renato Manzolli Leite. 2023. "The Role of Dyslipidemia in Periodontitis." *Nutrients* 15, no. 2 (2023-01-06): 300. <https://dx.doi.org/10.3390/nu15020300>.

Borsa, Leslie, Margaux Dubois, Guillaume Sacco, and Laurence Lupi. 2021. "Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer's Disease: A Systematic Review." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, no. 17 (2021-09-03): 9312. <https://dx.doi.org/10.3390/ijerph18179312>.

Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Verne GN. 2012. "Intestinal Barrier Function in Health and Gastrointestinal Disease." *Neurogastroenterology & Motility* 24, no. 6 (2012-06-01): 503-512. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>.

Czesnikiewicz-Guzik, Marta, Grzegorz Osmenda, Mateusz Siedlinski, Richard Nosalski, Piotr Pelka, Daniel Nowakowski, Grzegorz Wilk, Tomasz P Mikolajczyk, Agata Schramm-Luc, Aneta Furtak, Pawel Matusik, Joanna Koziol, Miroslaw Drozd, Eva Munoz-Aguilera, Maciej Tomaszewski, Evangelos Evangelou, Mark Caulfield, Tomasz Grodzicki, Francesco D'Aiuto, and Tomasz J Guzik. 2019. "Causal Association between Periodontitis and Hypertension: Evidence from Mendelian Randomization and a Randomized Controlled Trial of Non-Surgical Periodontal Therapy." *European Heart*

Journal 40, no. 42 (2019-11-01): 3459-3470.
<https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehz646>.

Daneman, Richard, and Alexandre Prat. 2015. "The Blood–Brain Barrier." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, no. 1 (2015-01-01): a020412.
<https://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>.

Darby, Ivan. 2022. "Risk Factors for Periodontitis & Peri-Implantitis." *Periodontology* 2000 90, no. 1 (2022-10-01): 9-12. <https://dx.doi.org/10.1111/prd.12447>.

De Molon, Rafael Scaf, Chan Ho Park, Qiming Jin, Jim Sugai, and Joni Augusto Cirelli. 2018. "Characterization of Ligature-Induced Experimental Periodontitis." *Microscopy Research and Technique* 81, no. 12 (2018-12-01): 1412-1421. <https://dx.doi.org/10.1002/jemt.23101>.

Del Pinto, Rita, Davide Pietropaoli, Eva Munoz-Aguilera, Francesco D’Aiuto, Marta Czesnikiewicz-Guzik, Annalisa Monaco, Tomasz J. Guzik, and Claudio Ferri. 2020. "Periodontitis and Hypertension: ¿Is the Association Causal?" *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention* 27, no. 4 (2020-08-01): 281-289. <https://dx.doi.org/10.1007/s40292-020-00392-z>.

Díaz Zúñiga, J, J Yáñez Figueroa, S Melgar Rodríguez, C Álvarez Rivas, C Rojas Lagos, and R Vernal Astudillo. 2012. "Virulencia Y Variabilidad De *Porphyromonas Gingivalis* Y *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Y Su Asociación a La Periodontitis." *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral* 5, no. 1 (2012-04-01): 40-45.
<https://dx.doi.org/10.4067/s0719-01072012000100007>.

Fischer, Ricardo Guimarães, Ronaldo Lira Junior, Belén Retamal-Valdes, Luciene Cristina De Figueiredo, Zilson Malheiros, Bernal Stewart, and Magda Feres. 2020. "Periodontal Disease and Its Impact on General Health in Latin America. Section V: Treatment of Periodontitis." *Brazilian Oral Research* 34,

no. suppl 1 (2020-01-01). <https://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0026>.

Furutama, Daisuke, Shinji Matsuda, Yosuke Yamawaki, Saki Hatano, Ai Okanobu, Takumi Memida, Hiroshi Oue, Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Mikihiro Kajiya, Noriyoshi Mizuno, Takashi Kanematsu, Kazuhiro Tsuga, and Hidemi Kurihara. 2020. "IL-6 Induced by Periodontal Inflammation Causes Neuroinflammation and Disrupts the Blood–Brain Barrier." *Brain Sciences* 10, no. 10 (2020-09-27): 679. <https://dx.doi.org/10.3390/brainsci10100679>.

Galipeau, H J, and E F Verdu. 2016. "The Complex Task of Measuring Intestinal Permeability in Basic and Clinical Science" *Neurogastroenterology & Motility* 28, no. 7 (2016-05-24): 957-965. <https://dx.doi.org/10.1111/nmo.12871>

Gomes-Filho, IS, MT Oliveira, SSD Cruz, EMM Cerqueira, SC Trindade, GO Vieira, PH Couto Souza, LFF Adan, AM Hintz, JS Passos-Soares, FA Scannapieco, PM Loomer, GJ Seymour, and ACMG Figueiredo. 2022. "Periodontitis Is a Factor Associated with Dyslipidemia" *Oral disease* 28, no. 3 (2022-03-07): 813-823. <https://dx.doi.org/10.1111/odi.13779>

Graves, Dana T., Daniel Fine, Yen-Tung A. Teng, Thomas E. Van Dyke, and George Hajishengallis. 2008. "The Use of Rodent Models to Investigate Host–Bacteria Interactions Related to Periodontal Diseases." *Journal of Clinical Periodontology* 35, no. 2 (2008-02-01): 89-105. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.2007.01172.x>.

Hickey, Niall A., Liliana Shalamanova, Kathryn A. Whitehead, Nina Dempsey-Hibbert, Christopher Van Der Gast, and Rebecca L. Taylor. 2020. "Exploring the Putative Interactions between Chronic Kidney Disease and Chronic Periodontitis." *Critical Reviews in Microbiology* 46, no. 1 (2020-01-02): 61-77. <https://dx.doi.org/10.1080/1040841x.2020.1724872>.

- Hiyari, Sarah, Ryan L. Wong, Aline Yaghsezian, Azadi Naghibi, Sotirios Tetradis, Paulo M. Camargo, and Flavia Q. Pirih. 2018. "Ligature-Induced Peri-Implantitis and Periodontitis in Mice." *Journal of Clinical Periodontology* 45, no. 1 (2018-01-01): 89-99. <https://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12817>.
- Hoffmann, Angelika, Jörg Bredno, Michael Wendland, Nikita Derugin, Peter Ohara, and Max Wintermark. 2011. "High and Low Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate (Fitc)–Dextrans to Assess Blood-Brain Barrier Disruption: Technical Considerations." *Translational Stroke Research* 2, no. 1 (2011-03-01): 106-111. <https://dx.doi.org/10.1007/s12975-010-0049-x>.
- Huang, Xiaowen, Basharat Hussain, and Junlei Chang. 2021. "Peripheral Inflammation and Blood–Brain Barrier Disruption: Effects and Mechanisms." *CNS Neuroscience & Therapeutics* 27, no. 1 (2021-01-01): 36-47. <https://dx.doi.org/10.1111/cns.13569>.
- Ide, Mark, Marina Harris, Annette Stevens, Rebecca Sussams, Viv Hopkins, David Culliford, James Fuller, Paul Ibbett, Rachel Raybould, Rhodri Thomas, Ursula Puenter, Jessica Teeling, V. Hugh Perry, and Clive Holmes. 2016. "Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer’s Disease." *PLOS ONE* 11, no. 3 (2016-03-10): e0151081. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151081>.
- Jiao, Yizu, Mizuho Hasegawa, and Naohiro Inohara. 2014. "Emerging Roles of Immunostimulatory Oral Bacteria in Periodontitis Development." *Trends in Microbiology* 22, no. 3 (2014-03-01): 157-163. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.005>.
- Joly Condet, Claire, Hafida Khorsi-Cauet, Patrice Morlière, Luciane Zabijak, Julie Reygner, Véronique Bach, and Jérôme Gay-Quéheillard. 2014. "Increased Gut Permeability and Bacterial Translocation after Chronic Chlorpyrifos

Exposure in Rats." PLOS ONE 9, no. 7 (2014-07-14): e102217. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102217>.

Kadry, Hossam, Behnam Noorani, and Luca Cucullo. 2020. "A Blood–Brain Barrier Overview on Structure, Function, Impairment, and Biomarkers of Integrity." *Fluids and Barriers of the CNS* 17, no. 1 (2020-12-01). <https://dx.doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>.

Kitamoto, Sho, Hiroko Nagao-Kitamoto, Yizu Jiao, Merritt G. Gilliland, Atsushi Hayashi, Jin Imai, Kohei Sugihara, Mao Miyoshi, Jennifer C. Brazil, Peter Kuffa, Brett D. Hill, Syed M. Rizvi, Fei Wen, Shrinivas Bishu, Naohiro Inohara, Kathryn A. Eaton, Asma Nusrat, Yu L. Lei, William V. Giannobile, and Nobuhiko Kamada. 2020. "The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis." *Cell* 182, no. 2 (2020-07-01): 447-462.e14. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.048>.

Knox, Emily G., Maria R. Aburto, Gerard Clarke, John F. Cryan, and Caitriona M. O’Driscoll. 2022. "The Blood-Brain Barrier in Aging and Neurodegeneration." *Molecular Psychiatry* 27, no. 6 (2022-06-01): 2659-2673. <https://dx.doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>.

Kobayashi, Ryoki, Yasuhiro Ogawa, Tomomi Hashizume-Takizawa, and Tomoko Kurita-Ochiai. 2020. "Oral Bacteria Affect the Gut Microbiome and Intestinal Immunity." *Pathogens and Disease* 78, no. 3 (2020-04-01). <https://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftaa024>.

Kose, Oğuz, Ahmet Altın, Sevda Kurt, Semih Alperen, Tolga Mercantepe, Akyildiz Kerimali, Tumkaya Levent, Yılmaz Adnan, Kose Sefanur, Yemenoglu Hatice, Turker Leyla, and Kuluslu Göker. 2021. "Influences of Periodontitis on Hippocampal Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis in Rats" *Journal of periodontal research* 56, no 6 (2021-09-06): 1154-1162. <https://dx.doi.org/10.1111/jre.12929>

- Kouki, Mhd Ammar, Anna Barlach Pritchard, Jane Elizabeth Alder, and Stjohn Crean. 2022. "Do Periodontal Pathogens or Associated Virulence Factors Have a Deleterious Effect on the Blood-Brain Barrier, Contributing to Alzheimer's Disease?" *Journal of Alzheimer's Disease* 85, no. 3 (2022-02-01): 957-973. <https://dx.doi.org/10.3233/jad-215103>.
- Kwon, TaeHyun, Ira B Lamster , and Liran Levin 2021. "Current Concepts in the Management of Periodontitis" *International Dental Journal* 71, no. 6 (2021-02-19): 462- 476. <https://dx.doi.org/10.1111/idj.12630>.
- Lam, GA, H Albarrak, CJ McColl, A Pizarro, H Sanaka, A Gomez-Nguyen, F Cominelli, and Paes Batista da Silva A. 2023. "The Oral-Gut Axis: Periodontal Diseases and Gastrointestinal Disorders" *Inflammatory bowel diseases* 29, no 7 (2023-07): 1153-1164. <https://doi.org/10.1093/ibd/izac241>.
- Lei, Shuang, Jian Li, Jingjun Yu, Fulong Li, Yaping Pan, Xu Chen, Chunliang Ma, Weidong Zhao, and Xiaolin Tang. 2023. "Porphyromonas Gingivalis Bacteremia Increases the Permeability of the Blood-Brain Barrier Via the Mfsd2a/Caveolin-1 Mediated Transcytosis Pathway." *International Journal of Oral Science* 15, no. 1 (2023-01-12). <https://dx.doi.org/10.1038/s41368-022-00215-y>.
- Li, Shiyi, Wenmin Zeng, Guojing Liu, Jing Zang, and Xiaoqian Yu. 2023. "Evaluation of Morphological, Histological, and Immune-Related Cellular Changes in Ligature-Induced Experimental Periodontitis in Mice." *Journal of Dental Sciences* 18, no. 4 (2023-10-01): 1716-1722. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2023.01.002>.
- Li, X., M. Kiprowska, T. Kansara, P. Kansara, and P. Li. 2022. "Neuroinflammation: A Distal Consequence of Periodontitis." *Journal of Dental Research* 101, no. 12 (2022-11): 1441-1449. <https://dx.doi.org/10.1177/00220345221102084>.

- Lin, Peiya, Hiromi Niimi, Yujin Ohsugi, Yosuke Tsuchiya, Tsuyoshi Shimohira, Keiji Komatsu, Anhao Liu, Takahiko Shiba, Akira Aoki, Takanori Iwata, and Sayaka Katagiri. 2021. "Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 16 (2021-08-18): 8900. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22168900>.
- Lu, Jiangyue, Shuang Zhang, Yuezhen Huang, Jun Qian, Baochun Tan, Xueshen Qian, Jia Zhuang, Xihong Zou, Yanfen Li, and Fuhua Yan. 2022. "Periodontitis-Related Salivary Microbiota Aggravates Alzheimer's Disease Via Gut-Brain Axis Crosstalk." *Gut Microbes* 14, no. 1 (2022-12-31). <https://dx.doi.org/10.1080/19490976.2022.2126272>.
- Marcano, Rosalia, M. Ángeles Rojo, Damián Cordoba-Diaz, and Manuel Garrosa. 2021. "Pathological and Therapeutic Approach to Endotoxin-Secreting Bacteria Involved in Periodontal Disease." *Toxins* 13, no. 8 (2021-07-29): 533. <https://dx.doi.org/10.3390/toxins13080533>.
- Marchesan, Julie, Mustafa S. Girnary, Li Jing, Michael Zhe Miao, Shaoping Zhang, Lu Sun, Thiago Morelli, Mark H. Schoenfish, Naohiro Inohara, Steven Offenbacher, and Yizu Jiao. 2018. "An Experimental Murine Model to Study Periodontitis." *Nature Protocols* 13, no. 10 (2018-10-01): 2247-2267. <https://dx.doi.org/10.1038/s41596-018-0035-4>.
- Palioto, D. B., L. S. Finoti, D. F. Kinane, and M. Benakanakere. 2019. "Epigenetic and Inflammatory Events in Experimental Periodontitis Following Systemic Microbial Challenge." *Journal of Clinical Periodontology* 46, no. 8 (2019-08): 819-829. <https://dx.doi.org/10.1111/jcpe.13151>.
- Pihlstrom, B. L., B. S. Michalowicz, and N. W. Johnson. 2005. "Periodontal Diseases." *Lancet* 366, no. 9499 (2005-11-19): 1809-20.

[https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67728-8](https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67728-8).

Preshaw, Philip M., and Susan M. Bissett. 2019. "Periodontitis and Diabetes." *British Dental Journal* 227, no. 7 (2019-10-01): 577-584. <https://dx.doi.org/10.1038/s41415-019-0794-5>.

Ramos-Perfecto, Donald. 2020. "Tannerella Forsythia: Patógeno Importante En La Periodontitis, Integrante Del Complejo Rojo." *Odontología Sanmarquina* 23, no. 3 (2020-08-03): 253-259. <https://dx.doi.org/10.15381/os.v23i3.18400>.

Sansores-España, L. D., A Carrillo-Avila, S Melgar-Rodriguez, J Díaz-Zuñiga, and V Martínez-Aguilar. 2021a. "Periodontitis and Alzheimer'S Disease" *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 26, no 1 (2021-01-01): e43-e48. <https://dx.doi.org/10.4317/medoral.23940>.

Sansores-España, L. D., S. Melgar-Rodríguez, K. Olivares-Sagredo, E. A. Cafferata, V. M. Martínez-Aguilar, R. Vernal, A. C. Paula-Lima, and J. Díaz-Zúñiga. 2021b. "Oral-Gut-Brain Axis in Experimental Models of Periodontitis: Associating Gut Dysbiosis with Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Aging* 2 (2021-12-10): 781582. <https://dx.doi.org/10.3389/fragi.2021.781582>.

Sanz, Mariano, Alvaro Marco Del Castillo, Søren Jepsen, Jose R. Gonzalez-Juanatey, Francesco D'Aiuto, Philippe Bouchard, Iain Chapple, Thomas Dietrich, Israel Gotsman, Filippo Graziani, David Herrera, Bruno Loos, Phoebus Madianos, Jean-Baptiste Michel, Pablo Perel, Burkert Pieske, Lior Shapira, Michael Shechter, Maurizio Tonetti, Charalambos Vlachopoulos, and Gernot Wimmer. 2020. "Periodontitis and Cardiovascular Diseases: Consensus Report." *Journal of Clinical Periodontology* 47, no. 3 (2020-03-01): 268-288. <https://dx.doi.org/10.1111/jcpe.13189>.

Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. 2018. "Blood-Brain Barrier Breakdown in Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Disorders"

Nature reviews. Neurology 14, no 3 (2018-01-29): 133-150. <https://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>.

Sweeney, Melanie D., Zhen Zhao, Axel Montagne, Amy R. Nelson, and Berislav V. Zlokovic. 2019. "Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back." *Physiological Reviews* 99, no. 1 (2019-01-01): 21-78. <https://dx.doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>.

Visentin, David, Ivana Gobin, and Željka Maglica. 2023. "Periodontal Pathogens and Their Links to Neuroinflammation and Neurodegeneration." *Microorganisms* 11, no. 7 (2023-07-18): 1832. <https://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11071832>.

Wang, Lirui, Cristina Llorente, Phillipp Hartmann, An-Ming Yang, Peng Chen, and Bernd Schnabl. 2015. "Methods to Determine Intestinal Permeability and Bacterial Translocation During Liver Disease." *Journal of Immunological Methods* 421 (2015-06-01): 44-53. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015>.

Woting, Anni, and Michael Blaut. 2018. "Small Intestinal Permeability and Gut-Transit Time Determined with Low and High Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate-Dextrans in C3h Mice." *Nutrients* 10, no. 6 (2018-05-28): 685. <https://dx.doi.org/10.3390/nu10060685>.

Wu, Chen-Zhou, Yi-Hang Yuan, Hang-Hang Liu, Shen-Sui Li, Bo-Wen Zhang, Wen Chen, Zi-Jian An, Si-Yu Chen, Yong-Zhi Wu, Bo Han, Chun-Jie Li, and Long-Jiang Li. 2020. "Epidemiologic Relationship between Periodontitis and Type 2 Diabetes Mellitus." *BMC Oral Health* 20, no. 1 (2020-12-01). <https://dx.doi.org/10.1186/s12903-020-01180-w>.

Xue, L., X. Zou, X. Q. Yang, F. Peng, D. K. Yu, and J. R. Du. 2020. "Chronic Periodontitis Induces Microbiota-Gut-Brain Axis Disorders and Cognitive

Impairment in Mice." *Experimental Neurology* 326 (2020-03): 113176.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113176>.

Zhao, Zhen, Amy R. Nelson, Christer Betsholtz, and Berislav V. Zlokovic. 2015.
"Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier." *Cell* 163, no. 5
(2015-11-01): 1064-1078. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>.

9. ANEXO

Anexo N°1



DIRECCIÓN GENERAL DE
DESARROLLO ACADÉMICO

COORDINACIÓN GENERAL DEL SISTEMA
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SIST/162/2022

A quien corresponda:

Me permito informarle el registro en el SISTPROY del proyecto que a continuación se describe:

Clave:	FODO-2022-0012
Responsable:	Martinez Aguilar Victor Manuel
Nombre del Proyecto:	Evaluación del efecto de 3 modelos de periodontitis experimental en el eje gut-brain.
Tipo de Proyecto:	Investigación
Tipo de financiamiento:	Interno
Vigente a partir del:	06/05/2022 hasta el 06/05/2025
Colaboradores:	Sauri Esquivel Eduardo Almigar, Rodríguez Solís Eugenia, Castillo Bolio Rubén, Melgar Rodríguez Samanta, Díaz Zúñiga Jaime Andrés, Luis Daniel Sansores España, Arreguin Cano Juan Antonio y Martínez Aguilar Víctor Manuel.

Se expide la presente, en la Ciudad de Mérida Yucatán, el 14 de octubre de 2022.

Atentamente
"Luz, Ciencia y Verdad"

Dr. Ramón Peniche Mena
Coordinador General



Ccp Archivo



Administración
Central UADY



Av. Rafael Matos Escobedo No.731 Fracc.
del Parque C.P. 97160. Mérida, Yucatán



Tel. 999.930.01.30 ext. 74115
y 74119 | www.uady.mx



Anexo N°2



Comité Local de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Dra.
Eloísa Díaz.
FDO N°182

Santiago, 25 de octubre de 2024.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de investigación Regional Development Program (IADR) titulado “**Evaluación del efecto de 3 modelos de periodontitis experimental en el eje Gut-Brain**”. El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Jaime Díaz Zúñiga, Académico del Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile (FOUCH).

Los ensayos propuestos en este Proyecto y, que por tanto el CIB certifica, son aquellos que se realizarán en la Unidad Académica mencionada anteriormente e involucran el manejo de:

○ **Sustancias Químicas Peligrosas:**

- Se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo inflamable y corrosivas.

○ **Material Biológico:**

- Se utilizarán muestras de animales (Ratas Sprague-Dawley): Alícuotas de suero y proteínas totales liofilizadas obtenidas de homogeneizado de intestinos y cerebros. Secciones de intestinos, cerebros, hígados y páncreas embebidos en parafina previamente fijados. Todas las muestras se obtendrán en el Laboratorio de Ciencias Odontológicas de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México y serán enviadas al Laboratorio de Biología Periodontal de FOUCH.

Los ensayos se realizarán en el Laboratorio de Biología Periodontal, en donde desarrolla sus investigaciones el Dr. Díaz.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados, FONDECYT/ ANID 2018. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Díaz para ser presentado en la Dirección de Investigación de la FOUCH.

Carla Lozano



Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 29781792-29781816, Fax: 29781748, Santiago.
<http://odontologia.uchile.cl>

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 29781793 Fax: 29781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>