



# ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y PERIODONTITIS

Tesis presentada por:

**C.D. LUIS DANIEL SANORES ESPAÑA**

En opción al Diploma de Especialización de:

**PERIODONCIA**

**DIRECTORES:**

**DR. VÍCTOR MANUEL MARTÍNEZ AGUILAR**

**DR. JAIME DÍAZ ZÚÑIGA**

Mérida, Yucatán, Julio 2020





**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

# ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y PERIODONTITIS

Tesis presentada por:  
C.D. LUIS DANIEL SANSORES ESPAÑA

En opción al Diploma de Especialización de:  
PERIODONCIA

DIRECTORES:  
DR. VÍCTOR MANUEL MARTÍNEZ AGUILAR  
DR. JAIME DÍAZ ZÚÑIGA

Mérida, Yucatán, Julio 2020



**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 1 de Julio de 2020

**C. LUIS DANIEL SANSORES ESPAÑA**

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada **"Asociación entre enfermedades de Alzheimer y periodontitis"**, presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Periodoncia, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

**Dr. José Rubén Herrera Atoche**  
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

**Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar**  
Director de Tesis

**Dr. Jaime Andrés Díaz Zúñiga**  
Director de Tesis

**M. en O. Rubén Castillo Bolio**  
Revisor

**Dra. Samanta Azucena Melgar Rodríguez**  
Revisora

Anexo 78 del reglamento interno de  
la Facultad de Odontología de la  
Universidad Autónoma de Yucatán

Aunque una tesis hubiera servido para  
el examen profesional y hubiera sido  
aprobada por el sínodo, solo su autor o  
autores son responsables de las  
doctrinas en ella emitidas.

El presente trabajo de tesis se realizó en el programa de Especialización en Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán y el Laboratorio de Biología Periodontal de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar y el Dr. Jaime Díaz Zúñiga. Los resultados de este estudio son parte del proyecto de investigación "Experimental periodontal infection induced by *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its association with Alzheimer's disease. Looking for the potential risk factor", by Regional Development Program de la IADR.

## INDICE GENERAL

### CONTENIDO

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SU ASOCIACIÓN CON PERIODONTITIS.....	4
2. ROL DE LOS PERIODONTOPATÓGENOS.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	12
VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	12
METODOLOGÍA.....	14
1. Aplicación del Test MoCA.....	14
2. Examen periodontal.....	14
3. Obtención del fluido crevicular.....	15
4. Obtención de microbiota subgingival.....	16
5. Cuantificación de proteínas mediante inmunoensayos multiplex.....	16
6. Identificación de <i>Porphyromonas gingivalis</i> mediante qPCR.....	17
7. Cuantificación de APOE-ε4 mediante ELISA.....	17
ANÁLISIS DE DATOS.....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIÓN.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS.....	40

## **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en la población adulta a nivel mundial y se caracteriza por la pérdida progresiva de la función cognitiva que inicia con el deterioro de la memoria (1,2,3).

En la actualidad los mecanismos biológicos que inician esta enfermedad no son claros, sin embargo se considera que la neuroinflamación tiene un rol fundamental en su inicio y progresión, generando el inicio de la cascada amioide (1,3). Esta hipótesis establece que ante un evento inflamatorio crónico las microglías se activan y secretan elevados niveles del péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ). Este péptido y el ambiente inflamatorio es capaz de alterar la función fisiológica de los astrocitos, los que inducirán un desbalance oxidativo, energético y metabólico en las neuronas. En estas condiciones, las neuronas acumularán la proteína Tau en un estado hiper-fosforilado, originando los ovillos neurofibrilares (NFTs) (4). Estos eventos moleculares y celulares son los que llevan a la pérdida de función neuronal y posterior muerte y constituyen los eventos patológicos característicos de la EA (4).

Las enfermedades inflamatorias crónicas pueden cumplir un rol importante en el establecimiento de un estado inflamatorio en el sistema nervioso central que conduciría a un estado de neuroinflamación (4,5). En este contexto la periodontitis es una enfermedad crónica no transmisible altamente prevalente en la población adulta mayor, desencadenada por una microbiota oral disbiótica que genera una respuesta inmuno-inflamatoria capaz de inducir la destrucción del tejido conectivo periodontal y la resorción ósea, que sin tratamiento puede llevar a la pérdida de los dientes (6).

Múltiples bacterias presentes en el microbioma disbiótico durante el curso de la PE como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), y *Prevotella intermedia* (*Pi*) se asocian con abscesos cerebrales, lo que demuestra su capacidad para invadir el tejido cerebral. De estos *P. gingivalis* ha sido identificado como factor de riesgo para el desarrollo de placas de  $A\beta$  y deterioro del estado cognitivo (6,7).

Dos vías han sido señaladas en el nexo entre estas enfermedades, por una parte una producción local exacerbada y sostenida de mediadores proinflamatorios derivada de la activación del sistema inmune del hospedero por los patógenos clave y, por otra parte, la difusión de las bacterias o sus factores de virulencia a otros tejidos u órganos. En efecto, las citoquinas, bacterias o sus factores de virulencia podrían tener la capacidad de difundir por la barrera hematoencefálica (BHE) y acceder al tejido cerebral donde podrían generar el inicio de los eventos neuroinflamatorios que conduzcan a la EA (7,8).

No obstante ambas enfermedades son las más prevalentes en adultos mayores a nivel mundial y comparten similitudes en sus rutas patológicas, aún se desconoce el nexo que las relaciona, por lo que es necesario determinar si la periodontitis puede ser un factor de riesgo para la EA.

Considerando lo anterior se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existe asociación entre el estado cognitivo en presencia de Enfermedad de Alzheimer y la periodontitis?

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en adultos mayores, constituyendo una de las principales causas de dependencia y discapacidad a nivel mundial (1). Según el World Alzheimer's Report de 2018 existe un estimado de 50 millones de personas en el mundo afectadas por algún tipo de demencia, de las cuales dos tercios presentan EA. A medida que incrementa la esperanza de vida se estima que la incidencia de EA ascienda a 152 millones para el 2050 convirtiéndose en un problema importante de salud pública (2,3). No obstante la EA afecta con mayor frecuencia a personas mayores de 65 años de edad, existe un grupo afectado de menor edad (2,3). En la literatura se describen 2 tipos de EA, la de inicio temprano y la de inicio tardío. Mientras la EA de inicio temprano está determinada por factores genéticos y corresponde a un 5% de los pacientes diagnosticados, la EA de inicio tardío se produce por factores ambientales e incluye al 95% de los afectados. Entre los factores de riesgo para la EA se destacan la dieta alta en grasas, enfermedades crónicas no transmisibles, estrés, insomnio, estilo de vida sedentario, tabaquismo, alcoholismo, abuso de sustancias, edad, antecedentes de traumatismo craneoencefálico o genes de susceptibilidad como la proteína precursora amiloidea (APP),  $\beta$ -secretasa (BACE) y Apolipoproteína E (APOE) (4).

Actualmente existen diversos modelos que explican la patología de la EA y atribuyen múltiples causas de inicio y progresión, sin embargo se considera que la neuroinflamación cumple un rol fundamental al ser el primer evento que genera la cascada amiloide (5,6,7). La teoría más aceptada para explicar la patogénesis de la EA es la cascada amiloide la cual afirma que la acumulación y agregación de péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) es el evento inicial que conduce a la demencia, seguido por la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) conformados por una forma hiperfosforilada de la proteína Tau (7,8). La presencia de  $A\beta$  induce la hiperfosforilación de las proteínas Tau y la formación de NFTs y así, disfunción axonal que genera mayor acumulación de  $A\beta$  en los espacios sinápticos. Los agregados de  $A\beta$  conforman las placas seniles y, en conjunto con los NFTs, constituyen las características histopatológicas de la EA (9,10).

Se ha especulado que las infecciones podrían cumplir un rol importante en el establecimiento de un estado inflamatorio en el sistema nervioso central. En efecto, la periodontitis es la enfermedad crónica no transmisible oral más común en la población adulta, según la Organización Mundial de la Salud es la segunda enfermedad oral más frecuente en los humanos y es la primera causa de pérdida de los dientes (11,12). La periodontitis se origina por la disbiosis de la microbiota subgingival generado por patobiontes o bacterias *keystone* (13). Estas bacterias o sus factores de virulencia pueden inducir un daño directo en los tejidos periodontales y un daño indirecto mediante la inducción de la respuesta inmune del hospedero (12,13). La respuesta inmune inducida ante estas bacterias se caracteriza por la producción exacerbada de mediadores pro-inflamatorios tales como interleuquina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , prostanoïdes y Metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que tienen el potencial de difundir a la circulación (14). La presencia de estas moléculas en la circulación periférica de pacientes afectados de periodontitis ha permitido asociar a esta enfermedad con otras condiciones, tales como diabetes, dislipidemia, artritis reumatoide y recientemente, con la EA (15,16).

## 1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SU ASOCIACIÓN CON PERIODONTITIS

Durante la periodontitis, las moléculas pro-inflamatorias producidas localmente difunden desde el tejido conectivo periodontal hacia la circulación sanguínea periférica donde pueden afectar otros tejidos u órganos (17). Recientemente, distintos estudios han propuesto que, al menos en parte, las enfermedades inflamatorias crónicas podrían desencadenar eventos neuroinflamatorios que originen la cascada amiloide, mediante la difusión de los mediadores pro-inflamatorias hacia el cerebro. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en estos eventos no están dilucidados aún (18).

Durante la EA se produce un incremento en la secreción del péptido A $\beta$  el cual se acumula en distintas formas insolubles: fibras, fibrillas u oligómeros. Esta condición de insolubilidad induce un estado inflamatorio cerebral crónico que desencadena una serie de eventos moleculares y celulares (19). En particular, las microglías son los fagocitos del sistema nervioso central y son las responsables del clearance del A $\beta$  en condiciones

fisiológicas, al que reconocen mediante el receptor tipo *Toll* (del inglés *Toll-like receptor*, TLR) 4. En condiciones fisiológicas, las microglías se encuentran en un estado neuroprotector, caracterizado por fagocitar cualquier depósito extracelular que sea ajenos al ambiente cerebral, inhibir cualquier efecto de citoquinas pro-inflamatorias mediante la secreción de IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF)  $\beta$ 1 (20,21). Sin embargo, cuando el A $\beta$  se insolubiliza, no es posible de ser fagocitado por las microglías y se activan a un fenotipo inflamatorio o M1. En respuesta a esta acumulación, las M1 secretan una serie de moléculas pro-inflamatorias: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , MMP2, MMP9, CCL5, entre otras (22). En este estado inflamatorio los astrocitos, que son las células que mantienen el balance energético, oxidativo y metabólico del cerebro, reconocen a las moléculas pro-inflamatorias y modifican su fenotipo a un astrocito reactivo. El astrocito reactivo responde aumentando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la expresión y traducción de la proteína precursora amiloide (APP) y de las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas, generando la producción de A $\beta$ . La modificación de la función de los astrocitos genera un desequilibrio en la neurona que incrementará el estado fosforilado de la proteína asociada a los microtúbulos Tau, creando un estado de hiperfosforilación. La proteína Tau que se ubica distribuida en el axón y es esencial para el transporte de vesículas sinápticas, en su estado hiperfosforilado se acumula en el soma, generando ovillos neurofibrilares, los que finalmente, interfieren con la función (23, 24). De esta manera, el estado neuro-inflamatorio desencadena una serie de eventos moleculares y celulares que llevan de manera irreversible, a la muerte neuronal (24).

En términos generales, las microglías cumplen un rol neuroprotector, pero en condiciones inflamatorias, uno neuro-inflamatorio, siendo de esta forma la célula que puede iniciar la EA (24). No obstante la hipótesis de la cascada amiloide establece al péptido A $\beta$  como el eje central de la neurodegeneración y que tanto los A $\beta$  solubles e insolubles son detectados en cerebros de pacientes afectados de EA, todas las terapias dirigidas a inhibir el reconocimiento de estos péptidos no han evitado la progresión de la enfermedad (25,26). Así se ha propuesto recientemente que la EA podría tener su causa fuera del cerebro, donde enfermedades crónicas no transmisibles como la periodontitis, podría ser una de las causas del inicio y progresión de la EA (27).

La periodontitis es capaz de incrementar la concentración local de mediadores pro-inflamatorios tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , MMP2, MMP9, entre una gran variedad de moléculas características de la destrucción del tejido conectivo u óseo (28). En efecto, todas estas moléculas pueden ser detectadas a nivel sérico y tener un efecto no deseado en otro tejido u órgano (28). De esta manera, la periodontitis se asocia con un mal control metabólico en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II, con un incremento en la presión sanguínea por efecto en distintas arterias, con bajo peso al nacer, pre-eclampsia y parto prematuro y, recientemente, con la EA (29,30,31). En pacientes afectados de EA se observa que poseen un estado periodontal con mayor sangrado gingival, mayor pérdida de inserción y menos cantidad de dientes. En efecto, los pacientes afectados de EA tienen una higiene oral de baja frecuencia y calidad lo que contribuye a un peor estado periodontal. Sin embargo, se desconoce si un estado de periodontitis previa puede ser capaz de desencadenarla. En este sentido, algunos estudios han detectado la presencia de bacterias orales en cerebros en pacientes que fallecieron y estaban afectados de EA (32,33).

Durante la periodontitis se produce un incremento significativo tanto de moléculas pro-inflamatorias como de bacterias o sus factores de virulencia podrían difundir a la circulación periférica. Estos elementos moleculares o celulares podrían ingresar al Sistema Nervioso Central a través de áreas del cerebro que carecen de una BHE, mediante capilares fenestrados. También podrían difundir utilizando transportadores específicos de citoquinas, aumentando la permeabilidad de la BHE o activando las células del endotelio cerebral para producir citoquinas que inducen moléculas de señalización como el óxido nítrico o los prostanoídes (33,34). Algunos estudios han determinado que las citoquinas periféricas tienen la capacidad de estimular las fibras aferentes de los nervios periféricos, generando un aumento en los niveles de citoquinas en el cerebro por medio de canales o compartimentos asociados a nervios periféricos (35,36). Estos datos sugieren que las moléculas pro-inflamatorias originadas en el periodonto podrían alcanzar el cerebro por vías nerviosas y no solo por la circulación sanguínea periférica (37,38)

## 2. ROL DE LOS PERIODONTOPATÓGENOS

Durante la periodontitis existen diversos episodios de bacteremia, tales como la masticación o el cepillado de dientes. Durante estos eventos bacterias clave podrían difundir a la circulación sanguínea periférica y colonizar nuevos sitios del hospedero. Especies como *Treponema denticola* y *Treponema pallidum* se han detectado en el ganglio y la corteza del trigémino y, recientemente, *Porphyromonas gingivalis* en el cuarto ventrículo y el líquido cerebro-espinal (LCE) (38,39). De igual forma bacterias clave presentes en la microbiota disbiótica durante el curso de la periodontitis como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia* han sido detectadas en abscesos cerebrales en muestras *postmortem*, lo que demuestra su capacidad para invadir otros tejidos o espacios anatómicos (40). En modelos animales se ha demostrado que la neuroinflamación crónica inducida por la inoculación o inyección de lipopolisacárido (LPS) de *P. gingivalis* causa un incremento en la producción de mediadores pro-inflamatorios que conducen al incremento de A $\beta$  y de la proteína Tau en su forma fosforilada (41).

El mecanismo de invasión bacteriana al cerebro se desconoce aún, sin embargo, se proponen tres modelos para explicar la detección de bacterias orales en el cerebro. El primero establece que las bacterias difunden a la circulación sanguínea periférica y, una vez en los vasos cerebrales, induce una respuesta inflamatoria endotelial que podría inducir el *breakdown* de la barrera hematoencefálica (BHE). El segundo mecanismo determina que las bacterias orales migrarían mediante las terminaciones periféricas del nervio trigémino hacia el ganglio trigémino y luego al cerebro. La tercera ruta establece que las bacterias podrían migrar por la circulación linfática. De hecho, el IV ventrículo y los linfonodos regionales orales drenan al linfonodo cervical medio profundo (42,43,44). Aunque las tres teorías explican las posibles rutas de migración de bacterias orales al cerebro, no se ha demostrado aún por cuál de ellas estas bacterias pueden ingresar más fácilmente (44).

La caracterización reciente de amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ) como un péptido antimicrobiano ha reforzado la asociación causal de bacterias con la neuro-inflamación. Estudios en ratones APOE -/- han observado que la infección oral por *P. gingivalis* tiene la capacidad de activar el sistema del complemento cuando alcanza el tejido cerebral, situación no

observada con otras bacterias (45). En ratones transgénicos que sobre-expresan la APP humana mutada (hAPP-J20), la infección oral con *P. gingivalis* provocó un deterioro de la función cognitiva, un aumento en la deposición de placas de A $\beta$  y una mayor pérdida ósea alveolar en comparación con ratones control (46). Estos datos promueven la hipótesis de que la infección oral por *P. gingivalis* cumple un rol importante en la patogénesis de EA (45,46). En pacientes afectados de periodontitis, la presencia de *P. gingivalis* podría ser considerado un elemento para definir hospederos con susceptibilidad microbiológica para desarrollar otras enfermedades, tales como la EA (47).

## **JUSTIFICACIÓN**

El aumento en la esperanza de vida alcanzado en las últimas décadas y derivado de una mejora en los servicios de salud a nivel mundial, ha contribuido a un incremento de la población de adultos mayores. Esta situación ha generado un incremento en la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles y degenerativas consideradas como co-morbilidades implícitas en esta etapa de la vida. Así, el informe mundial sobre la enfermedad de Alzheimer del año 2018 estimó que 2/3 de los 50 millones de adultos mayores tienen EA y se proyecta que esta cifra aumente a 152 millones para el 2050, situación que incrementa considerablemente los costos en salud destinados a la atención de las personas mayores y define a la EA como un problema de salud pública.

La EA es una enfermedad neuro-degenerativa y progresiva generando limitaciones médicas y sociales durante la historia natural de la enfermedad. El déficit progresivo de la cognición afecta severamente las actividades diarias, afectando directamente a la persona afectada de EA y a su entorno social. Así, las personas con EA suelen estar afectadas de mala higiene, malnutrición, sarcopenia, entre otros. Datos de la OMS señalan a la periodontitis como la enfermedad crónica no transmisible más prevalente en adultos mayores a 65 años, afectando a más del 60% de este grupo etario. Además, la periodontitis constituye la principal causa de pérdida de dientes, discapacidad, disfunción masticatoria y estado nutricional deficiente comprometiendo la calidad de vida de los afectados. En este contexto numerosos estudios han especulado una relación entre periodontitis y EA. En términos generales, la EA podría predisponer al desarrollo de periodontitis y la periodontitis podría predisponer a un estado de mayor deterioro cognitivo. Los pacientes con EA tienen una peor higiene oral debido a su pobre destreza manual para realizar su higiene oral o por la incapacidad del propio sujeto para acudir al odontólogo, lo que favorecería la disbiosis de la microbiota oral. Además, el aumento de los mediadores pro-inflamatorios en la circulación sanguínea periférica y la colonización bacteriana cerebral podrían ser considerados un factor de riesgo para el inicio y progresión de la EA generando un círculo vicioso entre estas enfermedades.

No obstante la evidencia sugiere una posible asociación entre ambas patologías, no existen estudios en población mexicana que evalúen el estado periodontal en individuos

afectados de EA y los efectos de la progresión de la periodontitis en el grado del deterioro cognitivo en EA. Considerando que ambas patologías presentan altas tasas de prevalencia e incidencia en los adultos mayores y que presumiblemente comparten rutas patológicas, el presente estudio pretende determinar si existe asociación entre el estado periodontal con el estado cognitivo en individuos afectados de EA..

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL.

Determinar la asociación entre el estado cognitivo en sujetos con enfermedad de Alzheimer y los principales marcadores clínicos y moleculares de periodontitis.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar el estado cognitivo y periodontal de pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer.
2. Cuantificar los niveles de las moléculas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 y APOE- $\epsilon$ 4 en fluido crevicular gingival.
3. Determinar la carga bacteriana de *P. gingivalis* en muestras de microbiota oral.
4. Correlacionar el estado cognitivo con los niveles detectados de los mediadores inflamatorios, la carga bacteriana y la secreción de APOE- $\epsilon$ 4.

## **MATERIALES Y METODOS**

### DISEÑO DEL ESTUDIO.

Descriptivo, prospectivo, transversal, de casos y controles.

### VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Salud Periodontal: Estado caracterizado por una ausencia o niveles mínimos de inflamación clínica en un periodonto con estructuras de soporte normales.

Gingivitis: Infamación gingival localizada, reversible, iniciada por bacterias del microbioma oral que se forma en los dientes y tejidos gingivales. Se caracteriza por no presentar pérdidas de las estructuras gingivales y periodontales, y representa el paso previo a la enfermedad periodontal.

Periodontitis: Patología inflamatoria desencadenada por un microbioma subgingival disbiótico. En sus diferentes formas (localizada-generalizada, etapas I-IV, y grados A, B, C), tiene la capacidad de estimular la secreción de distintos moduladores inflamatorios que provocan una respuesta inflamatoria local, llevan a la destrucción de los tejidos periodontales, y a su vez pueden estimular una respuesta inflamatoria sistémica secundaria.

Citoquinas: Proteínas asociadas a los mecanismos inflamatorios, destructivos o reguladores de la respuesta inmune. Son secretadas por una diversidad de células, en particular, en un periodonto afectado de periodontitis, las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T colaboradores secretan un perfil de estas moléculas dependiendo del antígeno que se encuentre presente. Estas se estudian según su función las que podemos resumir como citoquinas pro-inflamatorias: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-21 e IL-27, citoquinas pro-resortivas: IL-17, IL-22 e IL-23, citoquinas inmuno-moduladoras: IL-4, IL-5 y citoquinas inmuno-reguladoras: IL10.

*P. gingivalis*: Bacteria Gram-negativa anaerobia, asacrolítica, que posee múltiples factores de virulencia y capacidad para migrar a sitios extra-orales. Se le reconoce como un patógeno *keystone* o clave para el desarrollo de la periodontitis.

ApoE-ε4: Apoproteína derivada de la apolipoproteína E (gen *APOE*), transportadora de lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol, principalmente en el sistema linfático, hígado, riñón cerebro y sistema nervioso. La isoforma ε4 es una de sus tres isoformas y se relaciona con alteraciones del *clearance* de lípidos y colesterol. Se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de EA.

#### POBLACIÓN DE ESTUDIO

Sujetos adultos hombres y mujeres mayores de 60 años residentes del Asilo Brunet Celarain que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo comprendido entre septiembre - noviembre de 2019.

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Hombres o mujeres de 60 años de edad o más.
- Pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer y que presenten o no signos y síntomas clínicos de periodontitis.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Sujetos fumadores o alcohólicos.
- Sujetos que hayan recibido tratamiento antibiótico seis meses anteriores a la aplicación del estudio.
- Sujetos que hayan recibido tratamiento periodontal seis meses previos a la aplicación del estudio.

#### CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- Pacientes con enfermedad de Alzheimer inhabilitados para colaborar con el estudio por presentar demencia grave.

- Pacientes que ya incluidos dentro del estudio se nieguen a seguir participando.

## TIPO DE MUESTREO

No probabilístico por conveniencia.

## METODOLOGÍA

Para el presente estudio se reclutaron adultos mayores de 60 años de edad residentes del Asilo Brunet Celarain que cumplieron con todos los criterios establecidos durante el periodo comprendido entre septiembre - noviembre de 2019. Todos los pacientes fueron informados del objetivo del estudio y se firmó el consentimiento informado por sus apoderados (Anexo 1). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

### 1. Aplicación de Test MoCA.

Al inicio a todos los pacientes se les realizó el test Montreal Cognitive Assessment (MoCA, Anexo 2). Para ello, se capacitó y certificó al investigador en el test MoCA vía *e-learning* en la plataforma <http://www.mocatest.org/training-certification/>. Brevemente, el test consta de 7 items que evalúan la orientación visuoespacial/ejecutiva, la identificación de elementos, la memoria, la atención, el lenguaje, la capacidad de abstracción, el recuerdo diferido y la orientación. Cada pregunta tiene puntajes asignados y de un total de 30 se considera un valor normal de 30 a 26. Los datos de cada test se numeraron de forma correlativa por el Director del Estudio, quien recopiló de forma diaria los tests realizados por los integrantes del estudio y luego gestionó junto al SOME la citación a evaluación odontológica, si correspondiera. La versión en castellano se descarga de forma gratuita desde la página [http:// www.mocatest.org/paper-tests/moca-test-full/](http://www.mocatest.org/paper-tests/moca-test-full/).

### 2. Examen periodontal.

Posteriormente, a cada paciente se le realizó un examen periodontal por un único operador y en el periodontograma se registró el índice gingival, la profundidad al sondaje, la posición de la encía marginal, el nivel de inserción clínico y el índice de placa en 6 sitios periodontales por diente, excluyendo los terceros molares. El periodontograma utilizado fue el Periodontal Chart, un programa diseñado por la Universidad de Berna y

de acceso gratuito: <http://www.periodontalchart-online.com/es/>. Para el diagnóstico periodontal se tuvieron en cuenta los parámetros de la clasificación de enfermedades periodontales de 2017 de la AAP y EFP. El diagnóstico de “salud periodontal” se determinó utilizando los criterios presentados de *salud periodontal clínica* definido como: un estado caracterizado por una ausencia o niveles mínimos de inflamación clínica en un periodonto con estructuras de soporte normales. El diagnóstico de gingivitis se estableció cuando se detectó cuando existió un sangrado al sondeo entre  $\geq 10\%$  (localizada) y  $\geq 30\%$  (generalizada); en pacientes con un periodonto reducido se consideró una pérdida de inserción y sangrado al sondeo con  $\geq 10\%$ , y sin sangrado al sondeo y sitio de sondeo con  $\geq 4$  mm de profundidad. La periodontitis fue diagnosticada según los criterios del estadiaje presentada. El estadio I se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de 1 a 2 mm, una puntuación de sondaje máxima de  $\leq 4$  mm y sin pérdida de dientes debido a periodontitis. El estadio II se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de 3 a 4 mm, una puntuación de sondaje máxima de  $\leq 5$  mm y sin pérdida de dientes debido a periodontitis. El estadio III se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de  $\geq 5$  mm, las complicaciones del estadio II y adicionalmente una puntuación de sondaje de  $\geq 6$  mm con pérdida de dientes debido a periodontitis en al menos 4 dientes. El estadio IV se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de  $\geq 5$  mm, las complicaciones del estadio III y la pérdida de dientes debido a periodontitis de más de 5 dientes.

### 3. Obtención del fluido crevicular gingival.

A todos los pacientes se le tomaron muestras de fluido crevicular gingival y microbiota subgingival, tal como se detalla a continuación:

Las muestras de fluido crevicular gingival se tomó según el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biología Periodontal de la Universidad de Chile . Brevemente, se realizó el aislamiento relativo del diente que tuvo el mayor valor detectado en las bolsas periodontales del examen periodontal. Luego, se eliminó la microbiota supragingival con una cureta Gracey 11-12 o 13-14 estéril y se introdujo un PerioPaper<sup>®</sup> (OralFlow Inc.) en el surco gingivo-dentario o saco periodontal durante 1 min. Posteriormente, se introdujo en un tubo estéril rotulado con los datos del paciente y almacenó a 4°C hasta su traslado

al laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología UADY, para almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron. Posteriormente, se adicionó  $100\mu\text{L}$  de tampón de fosfato salino (PBS) estéril y se centrifugó a  $10.000 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La muestra eludida se almacenó nuevamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 4. Obtención de microbiota subgingival.

Los sitios periodontales seleccionados se aislaron en forma relativa con torundas de algodón y se secaron suavemente con aire a presión. Se seleccionaron al menos 2 sitios en dientes distintos con la mayor profundidad al sondaje y realizó el protocolo establecido por Abusleme *et al* (REF). En pacientes sin enfermedad periodontal, se tomó la microbiota supragingival. Para los pacientes con algún grado de enfermedad periodontal, la placa bacteriana supragingival se eliminó utilizando una cureta Gracey 11-12 o 13-14 estéril. Una nueva cureta estéril se introdujo subgingivalmente hasta lograr una mínima resistencia tisular y se retiró arrastrando la biopelícula adherida a la superficie radicular. Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron. La muestra se depositó en un tubo Eppendorf con  $1\text{mL}$  de medio microbiológico RTF (Reduced Transport Fluid, que contiene:  $200\text{ mg/L}$  de ditiotreitól y  $0,1\text{mg/L}$  de resarzurina) a pH 8 almacenándolo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron.

#### 5. Cuantificación de proteínas mediante inmunoensayo Multiplex

A partir de  $100\mu\text{L}$  de eluido de fluido crevicular gingival y muestras de saliva se cuantificaron los niveles de secreción de las moléculas IL- $1\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-21 e IL-27, IL-17, IL-22 e IL-23 mediante inmunoensayo Multiplex, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™ Cytokine 25-Plex Human Panel- Thermo Fisher Scientific®) disponibles en línea ([https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAassets%2FLSG%2Fmanuals%2FLHC0009M\\_Lot\\_1402357.pdf&title=SHVtYW4gQ3l0b2tpbmUgTWFn](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAassets%2FLSG%2Fmanuals%2FLHC0009M_Lot_1402357.pdf&title=SHVtYW4gQ3l0b2tpbmUgTWFn)

[bmV0aWMgMjUtUGxleCBQYW5lbA==](#)) y evaluó la absorbancia usando un lector automatizado de placas del sistema Luminex™ (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

## 6. Identificación de *P. gingivalis* mediante qPCR

Antes de 2 horas de su obtención se realizó un *pool* de las muestras de microbiota subgingival por cada paciente y se agitaron vigorosamente. Luego se procedió con la purificación del DNA total utilizando el kit FavorPrep™ (Tissue Genomic DNA extraction Mini Kit, Favorgen Biotech Corp). Brevemente, a partir de 50 ng de DNA se amplificaron mediante qPCR la subunidad rRNA 16S, utilizando partidores específicos (Tabla 1) y el kit SuperScript Strand III, utilizando un termociclador qPCR StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) según el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de 95°C durante 3 min y 40 ciclos de 95°C durante 3 seg y 60° durante 30 seg. Para la cuantificación absoluta, previamente se realizó una correlación entre los valores de CT de detección de la subunidad 16 rRNA con el valor correlativo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para la confección de esta curva se utilizó la cepa ATCC®33277™. Con la curva obtenida se origina la ecuación de la recta que nos permite definir la carga bacteriana mediante la determinación del valor del CT de cada muestra.

Tabla 1. Partidores utilizados para la identificación de *P. gingivalis* y control positivo de 16S DNA

<b>Bacteria</b>	<b>Partidor Forward</b>	<b>Partidor Reverse</b>
16S DNA	aaaccaatctctgagttctcttc	atgccaacttgacgttaa

## 7. Cuantificación de ApoE-ε4 mediante ELISA

A partir de 100 µL de eluido de fluido crevicular gingival se cuantificaron los niveles de ApoE-ε4 mediante inmunoensayo ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™ Apolipoprotein E4 Human ELISA Kit- Thermo Fisher Scientific®) disponibles en línea (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/EHAPOE4.pdf>) y evaluó la absorbancia usando un lector automatizado de placas del sistema Luminex™ (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

## ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos de cada paciente tales como edad, diagnóstico periodontal, profundidad de sondeo, porcentaje de pérdida de inserción y porcentaje de sangrado al sondeo se expresan en porcentaje o promedios. Los niveles cuantificados de las moléculas se representan con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar y en valores de concentración. Los datos de carga bacteriana se representan con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar y en valores de UFC/mL. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). Para determinar la normalidad de la distribución de los datos se utilizó el test de Shapiro Wilk y para los análisis multivariados, el test ANOVA-Tukey. Para la correlación de los datos se utilizó el test de Pearson. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando el *p-value*  $<0,05$ .

## 9. ASPECTOS ÉTICOS.

La presente investigación se llevó a cabo bajo las consideraciones éticas que van aparejadas y que se cumplen de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Estuvo sujeto a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente o bien la persona que se encuentre en desacuerdo debe ser respetada su decisión (48).

## RESULTADOS

### *1. Datos epidemiológicos*

En el presente estudio se incluyeron 30 sujetos, con un promedio de edad de 69 años, donde 19 fueron mujeres (63%) y 11 hombres (37%). De ellos, 10 (33.3%) pacientes fueron sanos (control), 10 (33.3%) presentaron periodontitis y 10 (33.3%) presentaron enfermedad de Alzheimer y periodontitis. Las características generales de la población en función del estado cognitivo y periodontal se describen en la tabla 1.

En los pacientes afectados de EA y periodontitis (grupo 3) se detectó una diferencia significativa en el resultado del test MoCA en comparación con sujetos sanos y en la profundidad al sondaje en comparación con sujetos sanos o afectados de periodontitis sin enfermedad de Alzheimer (grupo 2). Además, en el grupo 3 se detectó un incremento significativo en la carga de *P. gingivalis* en comparación a las otras condiciones.

	MoCa	PS	PI	PSS	Pg
<b>Grupo 1:</b> Sanos	25,8 ± 1,03	2,7 ± 0,48	12,7% ± 2,5	5,3% ± 2,91	6,08 ± 1,09
<b>Grupo2:</b> Periodontitis	25,2 ± 1,62	6,7 ± 1,25	31,7% ± 7,27	28,8% ± 5,79	7,91 ± 2,78
<b>Grupo 3:</b> Periodontitis y Alzheimer	16,56 ± 2,65*	7,2 ± 2,04**	45,5% ± 7,09	41,9% ± 10,24	9,02 ± 2,83**

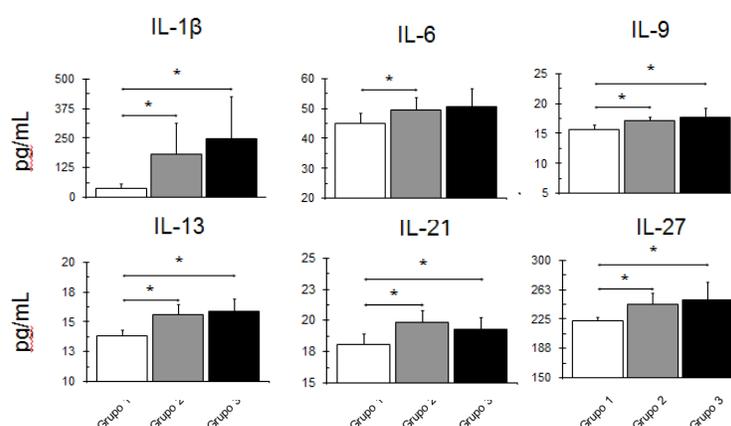
**Tabla 1. Características generales de la población de estudio en función del estado cognitivo y el estado periodontal.** La tabla representa los valores promedios del test MoCA, índices periodontales y carga bacteriana en los grupos estudiados. MoCA: Montreal Cognitive Assesement Test, PS: Profundidad de sondeo, PI: Porcentaje de pérdida de inserción, PSS: Porcentaje de sangrado al sondeo, Pg: carga bacteriana de *P.gingivalis* en UFC/mL. \* $p < 0.05$  entre grupos 1 y 3, \*\*  $p < 0.05$  entre grupos 1, 2 y 3.

### *2. Niveles de secreción de moléculas en fluido crevicular gingival*

A partir de muestras de fluido crevicular gingival, los niveles de secreción de las moléculas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-21 e IL-27, IL-17, IL-22, IL-23 y ApoE- $\epsilon$ 4 se cuantificaron mediante Multiplex o ELISA (Figura 1 a 3).

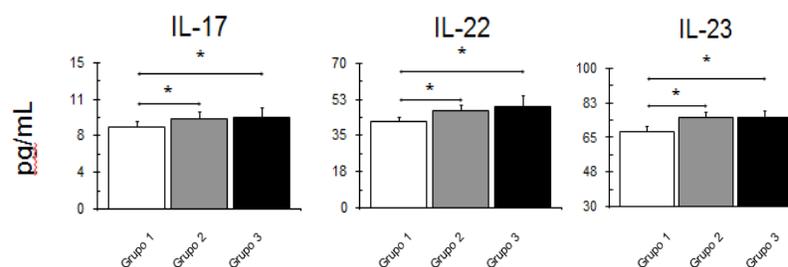
Para los pacientes del grupo 3 se detectó un incremento en los niveles secretados de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-13, IL-21 e IL-27 en comparación con los sujetos sanos (Figura 1). Además, en los pacientes del grupo 2 se detectaron diferencias para todas las citoquinas en comparación con los sujetos sanos. No se detectaron diferencias entre el grupo 2 y 3.

**Figura 1. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias en FCG.** A partir de muestras de FGC de 8 pacientes de cada grupo se cuantificaron las moléculas mediante Multiplex. IL: interleuquina, FCG: fluido crevicular gingival. \* $p < 0,05$ .



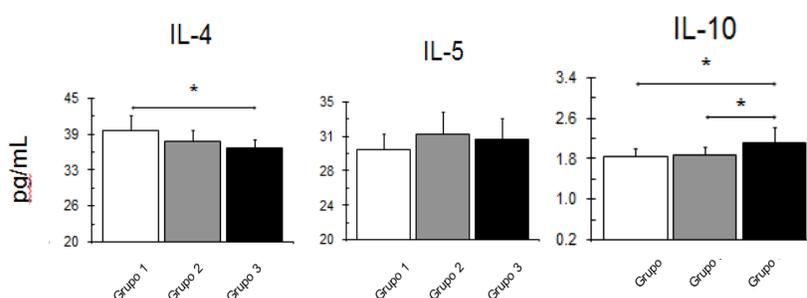
Con relación a las moléculas pro-resortivas, tanto en el grupo 2 como 3 se detectó un incremento en los niveles de IL-17, IL-22 e IL-23 en comparación con sujetos sanos (Figura 2). No se observaron diferencias entre el grupo 2 y 3.

**Figura 2. Cuantificación de citoquinas pro-resortivas en FCG.** A partir de muestras de FGC de 8 pacientes de cada grupo se cuantificaron las moléculas mediante Multiplex. IL: interleuquina, FCG: fluido crevicular gingival. \* $p < 0,05$ .



Luego, al evaluar los niveles secretados de las citoquinas inmuno-moduladoras o reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10 se detectó que en el grupo 3 existe una disminución significativa de IL-4 pero controversialmente, un incremento en IL-10, al comparar con los sujetos sanos (Figura 3). Además, para IL-10 se detectó una diferencia significativa entre el grupo 2 y 3. Para IL-5 no se detectaron diferencias entre los distintos grupos.

**Figura 3. Cuantificación de citoquinas moduladoras o reguladoras en FCG.** A partir de muestras de FGC de 8 pacientes de cada grupo se cuantificaron las moléculas mediante Multiplex. IL: interleuquina, FCG: fluido crevicular gingival. \* $p < 0,05$ .



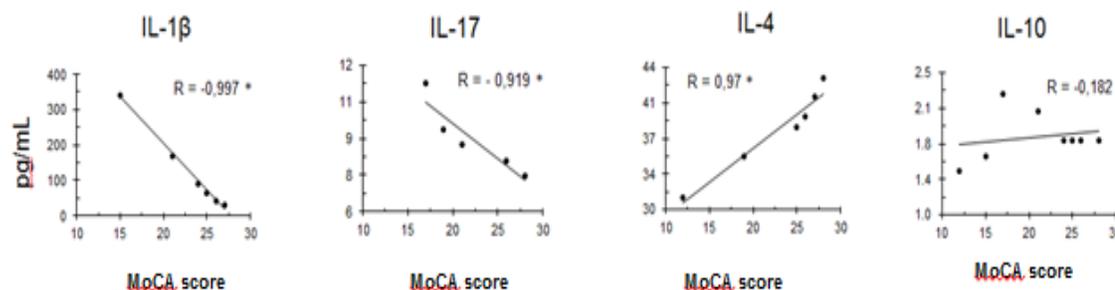
En resumen se observó una mayor secreción de citoquinas pro-inflamatorias, pro-resortivas e inmuno-reguladoras en pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer y periodontitis en comparación con las otras condiciones.

### 3. Correlación de los niveles de secreción de citoquinas con el estado cognitivo.

A partir de las citoquinas más representativas de cada fenotipo de linfocito T efector (T colaborador o T helper) 1, Th2, Th17 o T regulador se realizó la correlación de los niveles secretados de IL-1 $\beta$  (Th1), IL-17 (Th17), IL-4 (Th2) e IL-10 (Treg) con los valores obtenidos en el test MoCA en los pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer (Figura 4).

Para las citoquinas de los perfiles Th1 y Th17 se observó una correlación negativa con el MoCA. Estos datos sugieren que a medida que incrementan los niveles secretados de estas moléculas existe mayor deterioro cognitivo. Para las citoquinas de los perfiles Th2 y Treg se observa una correlación positiva, lo que sugiere que a medida que estos mediadores incrementan, mejora la capacidad cognitiva de los pacientes.

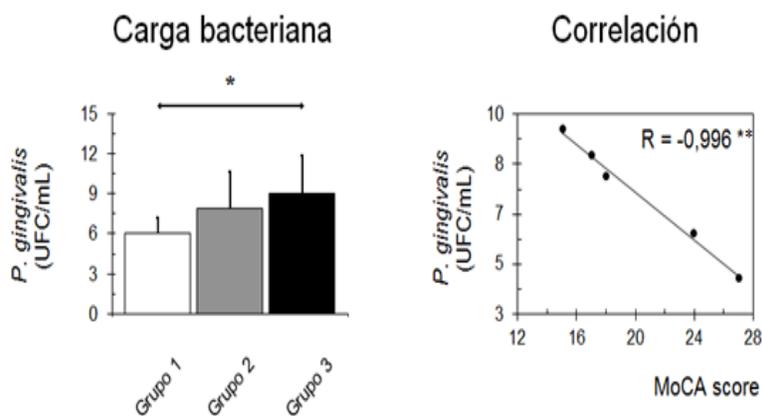
**Figura 4. Correlación de citoquinas y MoCA test.** A partir de los niveles secretados de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-17 y los valores del MoCA test se realizó la correlación de Pearson (R). IL: Interleuquina. \* $p < 0,05$ .



#### 4. Determinación de la carga bacteriana

La carga bacteriana de *P. gingivalis* se determinó mediante la cuantificación absoluta (Figura 5). En los pacientes del grupo 3 se detectó una mayor carga bacteriana en comparación con los sujetos sanos. No se detectaron diferencias entre los grupos 2 y 3. Además, en los pacientes afectados de periodontitis y enfermedad de Alzheimer se determinó la correlación entre la carga bacteriana y el estado cognitivo. En ellos se detectó una correlación negativa, sugiriendo que a mayor carga de *P. gingivalis* mayor es el deterioro cognitivo.

**Figura 5. Carga bacteriana.** A partir de 30 muestras de microbiota subgingival se cuantificó la carga bacteriana y se realizó la correlación con los valores del MoCA test. UFC: unidades formadoras de colonias, MoCA: Montreal Cognitive Assessment. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ .

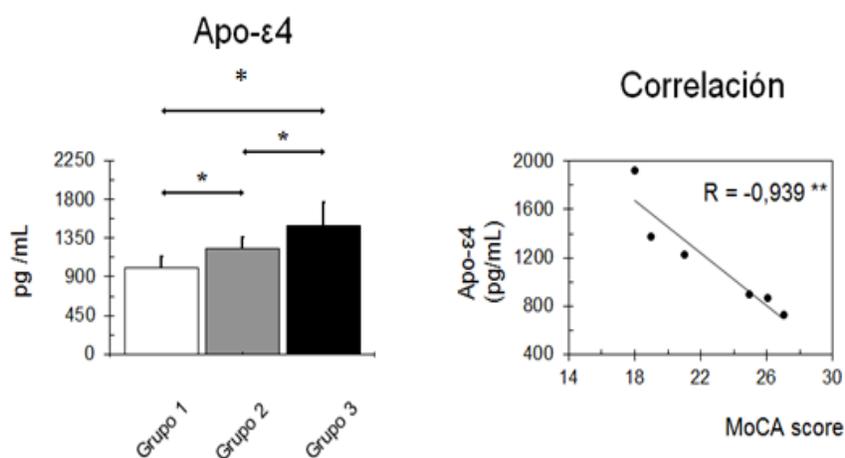


### 5. Cuantificación de APO- $\epsilon$ 4

Finalmente se determinaron los niveles de secreción de APO- $\epsilon$ 4, principal marcador sistémico de EA, en FCG (Figura 6). En los pacientes del grupo 3 se detectó un incremento significativo de APO- $\epsilon$ 4 en comparación con todas las condiciones. Además, en el grupo 2 también se logró detectar un incremento de APO- $\epsilon$ 4 en comparación con los sujetos sanos.

Al correlacionar los valores de APO- $\epsilon$ 4 con los resultados del test MoCA en los pacientes del grupo 3 se logró determinar una correlación negativa, lo que sugiere que a medida que incrementan los niveles secretados de APO- $\epsilon$ 4 existe mayor deterioro cognitivo. Con relación a este resultado es importante informar que es el primer estudio que logra determinar los niveles de APO- $\epsilon$ 4 en fluido crevicular gingival.

**Figura 6. Cuantificación de APOE- $\epsilon$ 4.** A partir de 30 muestras de fluido crevicular gingival se cuantificaron los niveles de APO- $\epsilon$ 4 mediante ELISA y se realizó la correlación con los datos del test MoCA. APO- $\epsilon$ 4: Apolipoproteína  $\epsilon$ 4, MoCA: Montreal Cognitive Assessment. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ .



## DISCUSIÓN

En el presente trabajo pudimos demostrar que los pacientes afectados de EA y que se encuentran con periodontitis presentan mayores niveles secretados de moléculas pro-inflamatorias y pro-resortivas en el FCG, mayor carga bacteriana de *P. gingivalis* y mayores niveles de ApoE- $\epsilon$ 4, en comparación con los pacientes afectados de periodontitis sin EA o sujetos sanos. Además, logramos determinar que los niveles de estos marcadores se correlacionan de forma negativa con los niveles del test MoCA, lo que sugiere que a medida que incrementa el deterioro cognitivo en los pacientes afectados de EA, también incrementan estos marcadores. Además, es el primer estudio en su tipo en determinar la presencia de ApoE-  $\epsilon$ 4, principal marcador molecular de EA, en FCG de sujetos sanos y enfermos y asociar sus concentraciones al deterioro cognitivo. De igual forma es el primero en determinar las características clínicas periodontales en sujetos con EA de acuerdo a la nueva clasificación de la AAP y EFP en nuestra población.

Los parámetros clínicos periodontales determinados en este estudio señalan un peor estado de salud periodontal en los sujetos que presentaron tanto EA como PE, lo que concuerda con reportes previos (49,50). Además, los pacientes afectados de EA podrían tener condiciones de susceptibilidad para desarrollar periodontitis, tales como la ausencia o poca higiene, pérdida de la motricidad fina u olvido de hábitos de higiene (51). Ésta reducción en la habilidad de los afectados con EA para realizar una higiene oral adecuada cumple un rol crítico para el inicio y progresión de periodontitis (28,51). En efecto, el peor estado periodontal caracterizado por una mayor profundidad al sondaje, mayor carga bacteriana y mayor concentración de citoquinas pro-inflamatorias y pro-resortivas en los pacientes afectados de EA se correlaciona con un mayor deterioro cognitivo (52,53). Así, se ha demostrado que personas afectadas de EA tienen peor salud oral, mayor pérdida de dientes y mayor pérdida de inserción. Además, el incremento significativo de moléculas pro-inflamatorias en el periodonto afectado conduce a un incremento sérico de las mismas creando un *feedback* positivo en la sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias, situación que también se asocia con un mayor deterioro cognitivo en EA (54).

El presente estudio determinó que en FCG de los sujetos de estudio hubo una mayor detección de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-9, IL-13, IL-27 en sujetos

que presentaron EA. No obstante otros autores han encontrado que TNF- $\alpha$  es la molécula más abundante en pacientes afectados de EA, en el presente trabajo los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-9 tuvieron los mayores niveles de secreción (55). A igual que nuestros hallazgos, Holmes et al observaron una mayor secreción de IL-1 $\beta$  en suero de sujetos con EA ante la presencia de una infección relacionando ambas situaciones al declive del estado cognitivo y sugiriendo que éste puede continuar su deterioro hasta dos meses posteriores a la resolución de la infección (56). En efecto, la presencia de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  son moléculas clave en el desarrollo de los eventos neuro-inflamatorios que llevan al inicio de la EA. Estudios recientes demostraron resultados similares al observar mayores niveles plasmáticos de este perfil de citoquinas en sujetos con EA que expresaron anticuerpos para bacterias periodontales (55, 57,58).

El perfil de citoquinas inmuno-reguladoras estudiado en el presente incluyó a IL-10, considerada la más representativa y con una fuerte acción reguladora. Ésta demostró una mayor concentración en sujetos con ambas enfermedades e incrementó su producción a medida que disminuyó el estado cognitivo, sin embargo la fuerza de esta correlación fue menor que la observada para las citoquinas pro-inflamatorias en sujetos con EA y periodontitis (59). Distintos estudios han detectado la presencia de IL-10 en pacientes con EA. En efecto, al ser una molécula reguladora de la respuesta inmune, su presencia obedecería a los mecanismos celulares o moleculares mediante el cual, la respuesta inmune del hospedero intenta proteger a las otras células, tejidos u órganos. Esto nos permite recordar que los eventos que desencadenan una enfermedad son los desbalances que suceden en ciertas condiciones y no solo la ausencia o presencia de un perfil de moléculas o células. Así, la periodontitis se define sobre la base de la aparición de moléculas pro-resortivas, tales como IL-17 o RANKL, las que activan a los osteoclastos que generan la resorción ósea. En un sitio afectado de periodontitis, también es posible de detectar linfocitos Th2 y Treg y sus citoquinas. De esta manera, las citoquinas y el perfil de células que predomine en el sitio periodontal definirá si la enfermedad se va a comportar como inflamatoria, pro-resortiva o en remisión, lo que explica los períodos de actividad e inactividad. Por ello, no resulta extraño detectar tanto moléculas pro-inflamatorias como inmuno-reguladoras en el FCG de pacientes afectados de periodontitis y detectar un incremento cuando además de periodontitis existe EA u otra condición

(60,61,62). Una explicación de esta relación es que IL-10 es conocido como un regulador de la producción de IL-1 $\beta$ , por lo que a mayores niveles de IL-1 $\beta$  también se detecta un incremento de IL-10. Si bien ambas patologías se definen sobre la base de mediadores inflamatorios capaces de desencadenar una respuesta inmuno-inflamatoria en los distintos tejidos, debe existir un equilibrio entre las moléculas y células inflamatorias y moduladoras y quien prevalezca definirá el inicio o progresión de ellas (63,64).

Un dato importante para una posible asociación entre ambas patologías es la detección de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Estas son moléculas centrales en la inflamación y destrucción de los tejidos periodontales (64). En efecto, la secreción de IL-1 $\beta$  se produce mediante una proteólisis intra-citoplasmática de la pre-IL-1 $\beta$  mediada por caspasa-1 y, la activación de IL-1 $\beta$  en el citosol de la célula permite la activación de MMP2, MMP8, MMP9 y MMP13. MMP2 y MMP9 son colagenasas y MMP8 y MMP13 gelatinasas y, en conjunto, son capaces de degradar una amplia variedad de proteínas que conforman la matriz extracelular. Por su parte, IL-17 es una molécula que en el fibroblasto induce la secreción de RANKL que activará a las células pre-osteoclastogénicas para diferenciarse a osteoclastos. Por su parte TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  mantienen una relación inversa, a mayor inflamación, menos concentración de IFN- $\gamma$ , sin embargo, la concentración de IFN- $\gamma$  suele triplicar a la de TNF- $\alpha$ , por lo que un incremento exacerbado de estas moléculas no siempre es un signo de inflamación o destrucción. Si nos ubicamos en el tejido cerebral, existe evidencia que demuestra que sobre los 250 pg/mL de TNF- $\alpha$ , 600 pg/mL de IFN- $\gamma$  y 150 pg/mL de IL-17 se produce el ambiente necesario para que, en conjunto con MMP2 y MMP9 se genere el *breakdown* de la BHE (65,66,67,68,69). Así, en pacientes con un estado neuro-inflamatorio crónico como el que sucede en EA, existe una BHE disrupcionada que permite el ingreso y salida de citoquinas, moléculas, fármacos, metabolitos activos, micro-organismos o sus factores de virulencia. En términos generales, podría existir una asociación molecular entre ambas patologías donde la periodontitis genera las citoquinas necesarias para generar el *breakdown* de la BHE y, en pacientes afectados de EA, la BHE disrupcionada permite la salida de las moléculas asociadas a neuroinflamación. En ambas condiciones la inflamación generada en el periodonto o en el cerebro podría afectar el inicio o progresión de la otra condición

patológica. De esta manera, no se puede estudiar la periodontitis aislándola del cuerpo o la EA aislándola del periodonto (70,71).

Al evaluar la carga bacteriana, pudimos detectar que los pacientes afectados de EA poseen mayor carga que los pacientes que no están afectados de EA. Curiosamente, en los pacientes afectados de periodontitis y EA la carga fue mayor, pero sin alcanzar la significancia, en comparación con pacientes con periodontitis. Estos datos sugieren que en presencia de EA existe una condición adicional y actualmente desconocida que permite que *P. gingivalis* se encuentre en mayor cantidad. Es posible que en los pacientes afectados de EA donde existe una alteración en el patrón de higiene personal se produzcan modificaciones en la microbiota (51). Recientemente se estableció que existe una fuerte asociación entre la microbiota intestinal y el cerebro, lo que se denomina eje gut-brain (72). Este eje explica que cualquier enfermedad inflamatoria crónica generada por la disbiosis de la microbiota intestinal, tal como sensibilidad al gluten, intolerancia a la lactosa, enfermedad de Chron, diverticulitis, entre otros, generará la difusión de estas bacterias anaerobias a la circulación sanguínea (73). Desde ahí, estos micro-organismos pueden colonizar el cerebro e inducir la neuro-inflamación. Así, lo que comenzó como una diarrea podría tener consecuencias a nivel cerebral. Considerando que este eje gut-brain cada día adquiere mayor evidencia, resulta interesante estudiar el eje *oral-brain*. De esta manera, las moléculas derivadas del periodonto afectado de periodontitis o las bacterias keystone podrían ser capaces de migrar al cerebro y generar los eventos moleculares necesarios para iniciar la neuro-inflamación (74).

La detección de bacterias en pacientes afectados de EA ha tomado mayor relevancia la última década. Una de las razones es porque luego de 25 años de hipótesis amiloide y todos los recursos destinados al estudio de terapias para evitar la formación de las placas seniles no lograron ser efectivos. En efecto, existen pacientes con placas amiloides y sin EA y pacientes sin placas amiloides y con EA. Debido a esto, se ha puesto énfasis a tejidos extra-cerebrales para explicar, al menos en parte, el inicio de la EA: Así, en cerebros de pacientes que fallecieron por EA se han detectado una serie de virus, bacterias y hongos, la gran mayoría de ellos, asociados a disbiosis de distintas microbiotas del hospedero. En el caso de las bacterias, *Treponema denticola*, *T. pallidum* y *P. gingivalis* se han detectado en el nervio trigémino, ganglio trigeminal, corteza cerebral,

hipocampo, IV ventrículo y LCE (75,76,77,78). La capacidad altamente virulenta de la *P. gingivalis* puede causar el desarrollo temprano de condiciones neurodegenerativas como la EA, con un acceso temprano al sistema nervioso central por vías periféricas, permitiendo el desarrollo del componente inflamatorio progresivo del proceso neurodegenerativo (79). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente, donde en pacientes afectados de EA la detección de IgG para *P. gingivalis* se asocia con un *odds ratio* de 2.2 para deterioro de la memoria espacial/episódica (80).

Finalmente en este estudio se determinó la presencia de ApoE- $\epsilon$ 4 en FCG y su asociación con deterioro cognitivo. Este es el primer estudio que realiza esta cuantificación en FCG ya que no existe evidencia científica de la determinación de este marcador importante de EA en tejidos periodontales que pueda servir como coadyuvante para el manejo de EA. Actualmente la ApoE- $\epsilon$ 4 y el gen que la codifica representan el principal factor de riesgo para el desarrollo de EA y estudios previos demuestran que la presencia de ApoE- $\epsilon$ 4 a una edad más temprana genera un riesgo dependiente de la concentración detectada (81). De igual forma se ha reportado su relación con la presencia de enfermedades periodontales, llegándose a especular que la sobre-expresión de esta proteína se asocian a la presencia de periodontitis agresiva o de progresión acelerada (82). Resultados similares a los de este estudio han sido reportados en pacientes con periodontitis agresiva o afectados de edentulismo, donde se detectaron mayores niveles de ApoE- $\epsilon$ 4 (83, 84). En efecto, la deposición de A $\beta$  es mayor en pacientes que sobre-expresan APOE- $\epsilon$ 4 y esta proteína está incrementada en pacientes afectados de EA (84, 85). Es por esto que este primer estudio en el tema sugiere que la detección temprana de ApoE- $\epsilon$ 4 en FCG a través de la evaluación periodontal de rutina puede ser de vital importancia debido al rol que estas proteínas pueden tener en el desarrollo de terapias orientadas a la prevención o tratamiento para modificar la tasa de deterioro cognitivo en presencia de EA. Así podría ser una alternativa al uso de suero para la detección de esta proteína. En términos generales, la periodontitis no puede ser considerada una enfermedad local, si no que una patología crónica no transmisible que afecta al 80% o más de la población. Además, nos encontramos en un momento importante de la historia al ser partícipes activos de la descripción y análisis del eje *oral-brain* que nos permita concluir que la periodontitis nunca se presentará como una patología sola o aislada en el hospedero,

al igual que la EA. De esta manera, nuestros antecedentes nos permiten suponer que podría existir una asociación no solo molecular sino también microbiológica para el desarrollo de la EA y que, en pacientes que son colonizados por algún serotipo bacteriano asociado a periodontitis, también podría existir una susceptibilidad microbiológica para desarrollar EA.

## CONCLUSIONES

Los pacientes afectados de EA y periodontitis presentan bolsas periodontales más profundas y mayor pérdida de inserción en comparación con pacientes no afectados de EA o sujetos sanos.

En pacientes afectados de EA y periodontitis se detectan mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias, pro-resortivas e inmuno-reguladoras, mayor carga de *P. gingivalis* y mayores niveles de ApoE-ε4 en comparación con pacientes no afectados de EA o sujetos sanos.

Los niveles secretados de las citoquinas IL-1β, IL-17 y ApoE-ε4 y una mayor carga bacteriana de *P. gingivalis* se correlacionan negativamente con el puntaje del test MoCA, lo que significa que el incremento de estos marcadores de inflamación o destrucción se correlacionan positivamente con un mayor grado de deterioro cognitivo

## REFERENCIAS.

- 1) Knopman D, De-Kosky S, Cummings J, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, et al. Practice parameter: Diagnosis of dementia (evidence-based review). Report of the Quality Standards Sub-committee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001; 56: 1143-53.
- 2) World Alzheimer's Report 2018, Alzheimer's disease International.
- 3) Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005; 366: 2112-7.
- 4) Bateman R, Xiong C, Benzinger T, Fagan A, Goate A, Fox N, Marcus D, Cairns N, Xie X, Blazey T, et al. Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. 2012; 367; 795–804.
- 5) Hardy J, Higgins G. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297: 353-6.
- 6) Kamara R, Ronald G, Craig B, Ananda P, Miroslaw B, et al. Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement*. 2008; 4(4): 242-50.
- 7) Kaye E, Valencia A, Baba N, Spiro T. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older man. *J Am Geriatr Soc*. 2010; 58:713-718.
- 8) Castello M, Soriano S. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Ageing Res Rev*. 2014; 13:10-2.
- 9) Cochran J, Hall A, Roberson E. The dendritic hypothesis for Alzheimer's disease pathophysiology. *Brain Res Bull*. 2014; 103:18-28.
- 10) Baranello R, Bharani K, Padmaraju V. Amyloid-beta protein clearance and degradation pathways and the role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2015; 12: 32- 46.
- 11) Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 135-87.
- 12) Farías RF. Enfermedad periodontal y microorganismos periodontopatógenos. *ODOUS científica*. 2009; 6(10):25-36.

- 13) Ximenez LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000.2007; 8: 648-57.
- 14) Ebersole J. Hummoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontology* 2000. 2003;31:135-136.
- 15) Javed F, Ahmed HB, Mikami T, Almas K, Romanos GE, Al- Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with chronic periodontitis. *J Invest Clin Dent*. 2014; 5(1): 1-8.
- 16) Menegat JSB, Lira-Junior R, Siqueira MA, Brito F, Carvalho AT, Fischer RG, *et al*. Cytokine expression in gingival and intestinal tissues of patients with periodontitis and inflammatory bowel disease: An exploratory study. *Arch Oral Biol*. 2016; 66: 141-6.
- 17) Ardila CM, Guzmán IC. Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein levels as inflammatory markers in periodontitis. *J. Periodontal. Implant Sci*. 2015; 45: 14–22
- 18) Gomes-Filho IS, Freitas JM, da-Cruz SS, Passos JS, Teixeira CO, Aragão NS, *et al*. Chronic periodontitis and C-reactive protein levels. *J Periodontol*. 2011;82: 969–978
- 19) McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22:799-809.
- 20) Elobeid A, Sylwia L, Marina L. Altered proteins in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016; 75(4): 316-325.
- 21) Thal D, Rub U, Orantes M. Phases of A $\beta$  deposition in the human brain and its relevance for development of AD. *Neurology*. 2002; 58: 1791-800.
- 22) Braak H, Thal D. Stages of the pathologic process in Alzheimer’s disease: age categories from 1-100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011; 121: 171-81.
- 23) Weitz T, Town T. Microglia in Alzheimer’s disease: it’s all about context. *Int J Alzheimer’s Dis*. 2012; 2012: 2-13

- 24) Schram MT, Euser SM, de Craen AJ, Witteman JC, Frolich M, Hofman A, et al. Systemic markers of inflammation and cognitive decline in old age. *J Am Geriatr Soc.* 2007; 55: 708-16.
- 25) Barron M, Gartlon J, Dawson L. A state of delirium. Deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2017; 94: 103-107.
- 26) Bolos M, Llorens M, Jurado A. Direct evidence of internalization of tau by microglia receptor. *J Alzheimer's Dis.* 2015; 50(1): 77-87.
- 27) Fiala M, Cribbs D, Rosenthal M. Phagocytosis of amyloid-beta and inflammation: two faces of innate immunity in alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2007; 11(4): 457-63.
- 28) Wang R, Ho YS, Leung WK, Goto T, Chang RC. Systemic inflammation linking chronic periodontitis to cognitive decline. *Brain, Behavior and Immunity.* 2019; 81:63-73.
- 29) Llambés F, Arias-Herrera S, Caffesse R. Relationship between diabetes and periodontal infection. *World J. Diab.* 2015;6:927–935.
- 30) D'Aiuto FN, Gkranias D, Bhowruth T, Khan M, Orlandi J, et al. Systemic effects of periodontitis treatment in patients with type 2 diabetes: a 12 month, single-centre, investigator-masked, randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:954–965
- 31) Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;125:2520–2544.
- 32) Pan W, Kastin AJ. TNFalpha transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol.* 2002; 174:193–200. H
- 33) Rochfort KD, Collins LE, Murphy RP, Cummins PM. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-

dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS One*.2014; 9:1-13.

- 34) Leira Y, Dominguez C, Seoane J, Pías J. Is periodontal disease associated with Alzheimer's disease? A systematic review with metaanalysis. *Neuroepidemiology*. 2017; 48: 21-31.
- 35) Chalmers JM, Carter KD, Spencer AJ. Oral diseases and conditions in community-living older adults with and without dementia. *Spec Care Dentist*. 2003;23:7-17.
- 36) Nee LE, Lippa CF. Alzheimer's disease in 22 twin pairs: 13-year follow-up—hormonal, infectious and traumatic factors. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1999; 10: 148-51.
- 37) Dantzer R, Konsman JP, Bluth RM, Kelley KW. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent?. *Auton Neurosci*. 2000;85:60-5.
- 38) Riviere GR, Riviere KH, Smith KS. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:113–118.
- 39) Belstrøm D, Holmstrup P, Damgaard C, Borch TS, Skjødtt MO, *et al*. The atherogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* evades circulating phagocytes by adhering to erythrocytes. *Infect Immun*. 2011; 79:1559–1565.
- 40) Singhrao SK, Poole S, Harding A, Kesavalu L, Crean S. *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection and its putative links with Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm*. 2015; 1: 1-10.
- 41) Miller AJ, Luheshi GN, Rothwell NJ, Hopkins SJ. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am J Physiol*. 1997; 272: 857– 61.
- 42) Singhrao SK, Olsen I. Are *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles microbullets for sporadic Alzheimer's Disease manifestation?. *J Alzheimers Dis Rep*. 2015; 2:219–228.
- 43) Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, La-Ferla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-

- dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005; 25: 8843-53.
- 44) Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedykt M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U. Porphyromona gingivalis in Alzheimer's disease brains: evidence of disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019; 5(1): 2-21.
- 45) Poole S, Singhrao S, Chukkapalli S, Rivera M, Velsko I. Active invasion of Porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in ApoE -/- mice brains. *J Alzheimers Dis*. 2015; 43: 67-80.
- 46) Ishida N, Ishihara K, Ishida K, Tada H, Funaki Y. Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis*. 2017; 3: 15-23.
- 47) Grenier D, Roy S, Chandad F, Plamondn P, Yoshioka M. Effect of inactivation of the Arg- and or Lys-gingipain gene on selected virulence and physiological properties of Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*. 2003; 71: 4742-4748.
- 48) Wma.net. Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [sede web]. Francia: wma.net; 2000. [actualización octubre de 2013, acceso el 4 de enero del 2015] disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>
- 49) Stewart R, Weyant R, García M. Adverse Oral Helth and cognitive decline: The health, aging and body composition study. *JAGS*. 2013; 61: 117-184.
- 50) Machado MC, Lopes GH, Marchini L. Oral health of Alzheimer's patients in Sao Jose´ dos Campos, Brazil. *Geriatr Gerontol Int*. 2012;12(2):265-270.
- 51) Pazos P, Leira Y, Domínguez C, Pías-Pleteiro JM, Blanco J, Aldrey JM. Asociación entre enfermedad periodontal y demencia. Revisión de la bibliografía. *Neurología*. 2018;33:602-613.
- 52) Aragón F, Zea-Sevilla MA, Montero J, Sancho P, Corral R, et al. Oral health in Alzheimer's disease: A multicenter case-control study. *Clinical Oral Investigations*. 2018; 22:3061-3070.
- 53) Cestari JA, Fabri GM, Kalil J, Nitrini R, Jacob-Filho W, Tesseroli de Siqueira JT, Siqueira SR. Oral infections and cytokine levels in patients with Alzheimer's

disease and mild cognitive impairment compared with controls. *J. Alzheimers Dis.* 2016; 54:845.

- 54) Martande S, Pradeep A, Pal S, Kumari M. Periodontal Health condition in patients with alzheimer's disease. *Am J Alzheimer's Dis.* 2014; 29(6): 498-502.
- 55) Sochoka M, Sobczyński M, Sender-Janeczek A, Zwolińska. Association between Periodontal Health Status and Cognitive Abilities. The Role of Cytokine Profile and Systemic Inflammation. *Current Alzheimer Research.* 2017; 14: 978-990.
- 56) Holmes C, Okl M, Williams A, Cunningham C, Wilcockson D, Perry V. Systemic infection, interleukin 1b, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:788–789
- 57) Kamer AR, Craig RG, Pirraglia E, Dasanayake AP, Norman RG, Boylan RJ, *et al.* TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *J Neuroimmunol.* 2009; 2: 92-97.
- 58) Farhad SZ, Amini S, Khalilian A, Barekataan M, Mafi M, Barekataan M, *et al.* The effect of chronic periodontitis on serum levels of tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer disease. *Dent Res J.*2014; 11(5).
- 59) Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, *et al.* Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE.* 2016;11(3).
- 60) Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.* 2014; 64:57–80.
- 61) Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:12–20.
- 62) Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010; 89:1349–1363.
- 63) Menegat JSB, Lira-Junior R, Siqueira MA, Brito F, Carvalho AT, Fischer RG, *et al.* Cytokine expression in gingival and intestinal tissues of patients with

- periodontitis and inflammatory bowel disease: An exploratory study. *Arch Oral Biol.* 2016; 66: 141-6.
- 64) Pradeep, A.R., Roopa, Y., Swati, P.P., 2008. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 2008; 43 (6):712–716.
- 65) Zhou Q, Amar S. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to *Porphyromonas gingivalis* or to its purified cell wall components. *J Immunol.* 2007; 179: 7777–7790.
- 66) Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior and Immunity.* 2004; 18:407–413.
- 67) Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 2013; 35:601–612
- 68) Perry VH. Contribution to systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathologica.* 2010;120:277-286.
- 69) Norden DM, Trojanowsky PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *GLIA.* 2016;64:300-316.
- 70) Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, Aljewari HW, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Watanabe K. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One.* 2018;13.
- 71) Liu Y, Wu Z, Zhang X, Ni J, Yu W, Zhou Y, Nakanishi H. Leptomeningeal cells transduce peripheral macrophage inflammatory signal to microglia in response to *Porphyromonas gingivalis* LPS. *Mediators Inflamm.* 2013; 5:407-562.
- 72) Andreo-Martínez P, García-Martínez N, Sánchez-Samper E. The gut microbiota and its relation to mental illnesses through the microbiota-gut-brain axis. *Rev Dis Clin Neuro.* 2017;4:52-58.

- 73) Mayer E, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest.* 2015; 125: 923-938.
- 74) Dinan T, Cryan F. The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin N Am.* 2016; 46:77-89.
- 75) S. Poole, S. K. Singhrao, L. Kesavalu, M. A. Curtis, S. Crean, Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J. Alzheimers Dis.* 2013; 36: 665–677.
- 76) Dominy S, Lynch C, Ermini F, Benedik M, Marzcyk A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci. Adv.* 2019; 5 (1).
- 77) Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, et al. Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017;3:15.
- 78) Teixeira, F.B., Saito, M.T., Matheus, F.C., Prediger, R.D., Yamada, E.S., Maia, C.S.F., Lima, R.R. Periodontitis and Alzheimer's disease: a possible comorbidity between oral chronic inflammatory condition and neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* 2017; 10(9):327.
- 79) Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S MI. Relationship of Periodontopathic Bacteria With Early-Onset Periodontitis in Down's Syndrome. *J Periodontol.* 2001;72(3):368–73.
- 80) Noble JM, Borrell LN, Papapanou PN, et al. Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80:1206–1211.
- 81) Morris, J.C., Roe, C.M., Xiong, C., Fagan, A.M., Goate, A.M., Holtzman, D.M., Mintun, M.A. APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann. Neurol.* 2010; 67: 122–131.
- 82) Gao H, Tian Y, Meng H, Hou J, Xu L, et al. Associations of apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *J Periodont Res.* 2015; 50: 509–518

- 83) Lönn J, Ljunggren S, Klarström-Engström K, Demirel I, Bengtsson T, Karlsson H. Lipoprotein modifications by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2018;53(3):403–13.
- 84) Kok, E., Haikonen, S., Luoto, T., Huhtala, H., Goebeler, S., Haapasalo, H., Karhunen, P.J. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann. Neurol.* 2009; 65: 650–657.
- 85) Reiman, E.M., Chen, K., Liu, X., Bandy, D., Yu, M., Lee, W., Ayutyanont, N., Keppler, J., Reeder, S.A., Langbaum, J.B. Fibrillar amyloidbeta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106: 6820–6825

## ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento informado y voluntario.

Título del protocolo: “**ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y PERIODONTITIS**”

Investigador principal: C.D. LUIS DANIEL SANSORES ESPAÑA

El (la) participante (familiar o representado legal) con nombre:

---

El presente formulario corresponde a un Consentimiento Informado y Voluntario y se dirige a todo paciente candidato a participar en el proyecto de investigación titulado: Asociación entre enfermedad de Alzheimer y Periodontitis.

Dicho proyecto pretende conocer la relación clínica y molecular existente entre estas enfermedades, siendo ambas dos de las entidades más frecuentes en pacientes adultos mayores a nivel mundial, es de vital importancia conocer sus mecanismos de convergencia para así establecer estrategias de tratamiento para su control y así mejorar la calidad de vida de los sujetos que como usted (familiar/ representado legal) puedan padecerlas.

Esta investigación incluirá un mínimo de dos intervenciones en las cuales se recabarán datos clínicos consistentes en una exploración clínica para sondeo periodontal, aplicación de examen para determinar la severidad de la demencia, toma de muestra de líquido crevicular y toma de muestra de sangre, procedimientos que nos ayudarán a determinar la asociación clínica y molecular de ambas enfermedades.

Su participación (familiar / representado legal) en esta investigación será totalmente voluntaria y no recibirá remuneración económica por ello, puede libremente elegir participar o no hacerlo, en cualquiera de las dos circunstancias usted continuará recibiendo todos los servicios de esta clínica sin ninguna repercusión. Por igual usted (familiar/representado legal) puede aceptar y más tarde cambiar de idea y dejar de participar sin ninguna repercusión.

Todos los procedimientos clínicos que se realizarán como la exploración y el sondeo periodontal son exámenes rutinarios para conocer el estado de salud gingivoperiodontal

que usted (familiar/representado legal) presentan. El sondeo periodontal consiste en introducir un instrumento marcado en cada milímetro en 6 superficies de cada diente, registrando cantidad de sangrado y placa dentobacteriana. Con respecto a el procedimiento de la toma de muestra de líquido crevicular este se realiza introduciendo una tira absorbente dentro del surco gingival mediante un procedimiento estandarizado que ha sido avalado por instituciones de salud y que no genera ninguna lesión o trauma gingival. La toma de muestra de saliva será en a travpes de una torunda de algodón para su posterior estudio.

Toda información solicitada durante este proyecto, será completamente confidencial y utilizada exclusivamente por los investigadores con fines de aprendizaje científico. Únicamente los datos generales, resultados del examen clínico y de laboratorio serán utilizados para fines de divulgación científica.

Este estudio será financiado por los investigadores, mas no habrá remuneración monetaria para los participantes. Usted (familiar/representado legal) no se encuentra obligado a participar en esta investigación si no desea hacerlo y el negarse a participar no repercutirá en la calidad de atención que recibirá.

En caso de surgir alguna duda durante la aplicación del estudio estará en toda libertad de preguntar y el investigador está obligado a resolver todas sus aquejas antes, durante y después del estudio.

**Expreso consentimiento para que el Cirujano Dentista Luis Daniel Sansores España realice en mi persona, dentro de los límites otorgados a sus aptitudes profesionales, la elaboración de cuestionarios, exploración clínica, así como toma de muestras.**

**He sido informado(a) convenientemente en forma detallada y suficiente, comprendiendo en su totalidad sobre el tipo de procedimiento a efectuarse en mí, habiéndome explicado detalladamente los objetivos de la investigación aceptando en su totalidad por mí parte la propuesta ofrecida.**

**Nombre del Participante o tutor** \_\_\_\_\_

**Firma del Participante o tutor** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_

Anexo 2. Instrumento de medición.

**FICHA DE IDENTIFICACION:**

NOMBRE:

EDAD:

SEXO:

ESTADO CIVIL:

LUGAR DE RESIDENCIA:

**ANTECEDENTES HEREDITARIOS Y FAMILIARES:**

Padecimientos Maternos:

Padecimientos Paternos:

Padecimientos de sus hermanos:

Padecimientos de sus hijos:

**PADECIMIENTO ACTUAL:**

---

# Periodontograma

Fecha

BERN

Apellido del paciente

Nombre

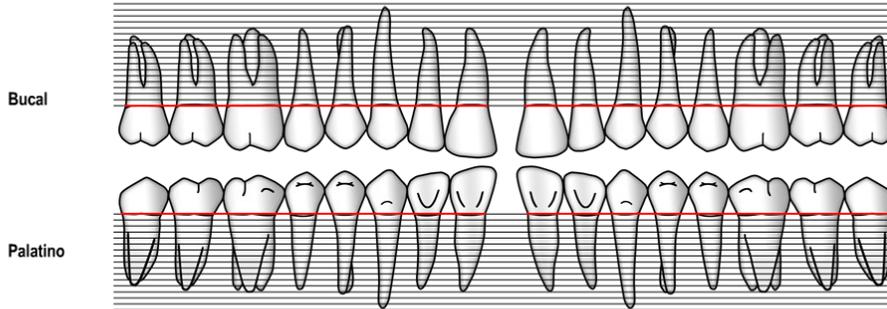
Fecha de nacimiento

Examen inicial

Reevaluación

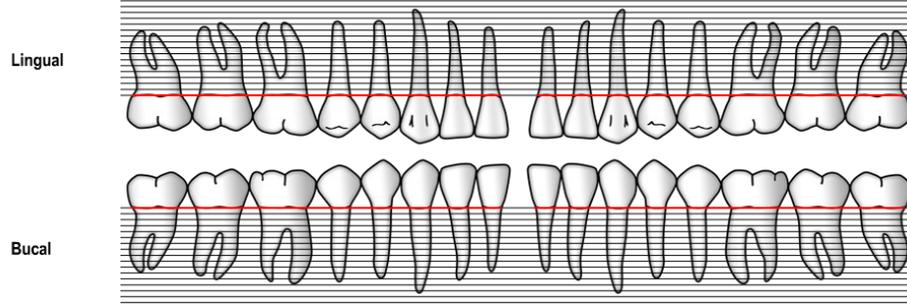
Clínico

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Movilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implante																
Furca																
Sangrado al sondaje																
Placa																
Margen gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidad de sondaje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Margen gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidad de sondaje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa																
Sangrado al sondaje																
Furca																
Nota																

Nota																
Furca																
Sangrado al sondaje																
Placa																
Margen gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidad de sondaje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

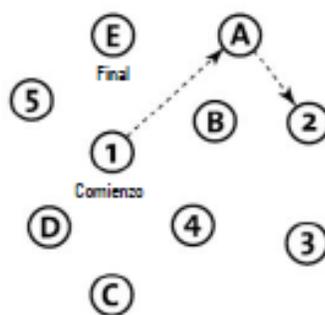
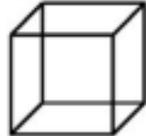
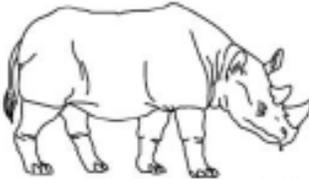


Margen gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidad de sondaje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa																
Sangrado al sondaje																
Furca																
Implante																
Movilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)**  
(EVALUACIÓN COGNITIVA MONTREAL)

NOMBRE:  
Nivel de estudios:  
Sexo:

Fecha de nacimiento:  
FECHA:

<b>VISUOESPACIAL / EJECUTIVA</b>		 					Copiar el cubo Dibujar un reloj (Once y diez) (3 puntos)		Puntos	
[ ] [ ] [ ] [ ] [ ]		[ ] [ ] [ ] [ ] [ ]					[ ] [ ] [ ] Contorno    Números    Agujas		___/5	
<b>IDENTIFICACIÓN</b>										
								[ ] [ ] [ ]		___/3
<b>MEMORIA</b>		Lea la lista de palabras. el paciente debe repetirlas. Haga dos intentos. Recuerde las 5 minutos más tarde.					ROSTRO    SEDA    IGLESIA    CLAVEL    ROJO		Sin puntos	
		1er intento								
		2º intento								
<b>ATENCIÓN</b>										
Lea la serie de números (1 número/seg.)					El paciente debe repetirla. [ ] 2 1 8 5 4 El paciente debe repetirla a la inversa. [ ] 7 4 2					___/2
Lea la serie de letras. El paciente debe dar un golpecito con la mano cada vez que se diga la letra A. No se asignan puntos si ≥ 2 errores.										
[ ] FBACMNAAJKLBAFAKDEAAAJAMOFAB										___/1
Restar de 7 en 7 empezando desde 100. [ ] 93    [ ] 86    [ ] 79    [ ] 72    [ ] 65										
4 o 5 sustracciones correctas: 3 puntos. 2 o 3 correctas: 2 puntos. 1 correcta: 1 punto. 0 correctas: 0 puntos.										___/3
<b>LENGUAJE</b>										
Repetir: El gato se esconde bajo el sofá cuando los perros entran en la sala. [ ] Espero que él le entregue el mensaje una vez que él se lo pida. [ ]										___/2
Fluidez del lenguaje. Decir el mayor número posible de palabras que comiencen por la letra "P" en 1 min. [ ] _____ (N ≥ 11 palabras)										___/1
<b>ABSTRACCIÓN</b>										
Similitud entre p. ej. manzana-naranja = fruta [ ] tren-bicicleta [ ] reloj-regla										___/2
<b>RECUERDO DIFERIDO</b>		Debe acordarse de las palabras SIN PISTAS					ROSTRO    SEDA    IGLESIA    CLAVEL    ROJO		Puntos por recuerdos SIN PISTAS únicamente	
		[ ] [ ]		[ ] [ ]		[ ] [ ]		[ ] [ ]		
Optativo		Pista de categoría								
		Pista elección múltiple								
<b>ORIENTACIÓN</b>										
[ ]		[ ]		[ ]		[ ]		[ ]		___/6
Día del mes (fecha)		Mes		Año		Día de la semana		Lugar		Localidad
© Z. Nasreddine MD Versión 07 noviembre 2004    Normal ≥ 26 / 30										
TOTAL								___/30		
Añadir 1 punto si tiene ≤ 12 años de estudios										

