

**EVALUACIÓN DEL ESTÍMULO DE *Porphyromonas gingivalis* SOBRE LA  
INTEGRIDAD CELULAR, RESPUESTA PROINFLAMATORIA Y PRODUCCIÓN DE  
PÉPTIDO A $\beta$  EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE MICROVASCULATURA DE CEREBRO**

**Ana María Vargas Correa**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
BOGOTÁ DC.- JULIO 2023**

## HOJA DE IDENTIFICACIÓN

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Maestría en Ciencias Odontológicas
<b>Título</b>	Evaluación del estímulo de <i>Porphyromonas gingivalis</i> sobre la integridad celular, respuesta proinflamatoria y producción de péptido A $\beta$ en células endoteliales de microvasculatura de cerebro.
<b>Grupo de Investigación:</b>	Unidad de Investigación Básica Oral – UIBO
<b>Línea de investigación</b>	Medicina periodontal -- Biotecnología
<b>Tipo de investigación:</b>	Maestría/Grupo
<b>Estudiantes</b>	Ana María Vargas Correa
<b>Director:</b>	Diana Marcela Buitrago Ramírez
<b>Asesor metodológico:</b>	Diana Marcela Buitrago Ramírez
<b>Asesor y análisis estadístico:</b>	Diana Marcela Buitrago Ramírez

## **DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

<b>OTTO BAUTISTA GAMBOA</b>	Presidente del Claustro
<b>MIGUEL RUIZ RUBIANO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL GALVIS</b>	Rector(a)
<b>NATALIA RUÍZ ROGERS</b>	Vicerrector(a) Académico
<b>RICARDO ENRIQUE GUTIÉRREZ MARÍN</b>	Vicerrector Administrativo
<b>GUSTAVO SILVA CARRERO</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>CRISTINA MATIZ MEJÍA</b>	Secretaria General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>HERNEY ALONSO RENGIFO REINA</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ</b>	Director Área Bioclínica
<b>ALEJANDRO PERDOMO RUBIO</b>	Director Área Comunitaria
<b>JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>SANDRA HINCAPIE NARVAEZ</b>	Coordinadora Postgrados Facultad de Odontología
<b>MARIA CONSUELO ROMERO SANCHEZ</b>	Directora Maestría en Ciencias Odontológicas
<b>LORENA CHILA MORENO</b>	Coordinadora Maestría en Ciencias Odontológicas

**La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.**

***Dedicado a:***

*A Dios todo poderoso,*

*A mi mamita Ana por ser mi ejemplo a seguir,*

*A mi esposo y mi gran amor Daniel.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios y a la Virgen por todas las bendiciones y permitirme culminar esta etapa de mi vida académica. A mi mamá por hacer de mí una mejor persona a través de su ejemplo, de sus consejos, de sus enseñanzas y de su infinito amor, por esto y más todos mis triunfos son tan míos como suyos. A toda mi familia por creer en mí siempre.

A mi esposo y gran amor Daniel, quien me alentó día a día para continuar, cuando parecía que me iba a rendir. Eres mi fortaleza, mi motor y mis alas, este logro es más tuyo que mío.

A mi directora, la Doctora Diana Marcela Buitrago, por creer en mí, por su ayuda, su paciencia y su entrega total a este proyecto, sin la cual nada habría sido posible.; a la Doctora Gloria Lafaurie, por vincularme en este proyecto desde el posgrado y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado en el laboratorio de investigaciones del Instituto UIBO.

A las Dras. Yormaris Castillo y Diana Marcela Castillo del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO de la Universidad El Bosque, por su colaboración en la obtención del inóculo bacteriano y lisado de *P. gingivalis* W83, como también en todas las enseñanzas en el área microbiológica. Al Dr. Diego Gualtero por regalarnos LPS de *P. gingivalis* W83.

A las Dras. Myriam Velandia y María Angelica Calderón del Instituto de Virología de la Universidad El Bosque por el apoyo en los ensayos de cultivo de las células de endoteliales de microvasculatura de cerebro y los análisis respectivos, como también en los experimentos de inmunofluorescencia (MBEC).

A la Dras Yormaris Castillo del Instituto UIBO y Sandra Perdomo Lara, del grupo INMUBO de la Universidad El Bosque por su apoyo en el desarrollo de las pruebas de PCR en tiempo real. A todos ellos y a quienes hicieron parte de este proceso tan grande y que en algún momento aportaron en mi formación académica, y personal, gracias totales.

## GUÍA DE CONTENIDO

**Resumen**

**Abstract**

**Abreviaturas**

<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico.</b>	<b>4</b>
<b>3. Planteamiento del problema.</b>	<b>46</b>
<b>4. Justificación.</b>	<b>50</b>
<b>5. Situación Actual.</b>	<b>54</b>
<b>6. Objetivos.</b>	<b>59</b>
<b>7. Metodología</b>	<b>60</b>
<b>7.1. Tipo de estudio.</b>	<b>60</b>
<b>7.2. Población y muestra.</b>	<b>60</b>
<b>7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información.</b>	<b>60</b>
<b>7.4. Hipótesis de estudio.</b>	<b>70</b>
<b>7.5 Plan de análisis estadístico.</b>	<b>71</b>
<b>8. Consideraciones éticas.</b>	<b>72</b>
<b>9. Resultados.</b>	<b>74</b>
<b>10. Discusión.</b>	<b>88</b>
<b>11. Conclusiones.</b>	<b>93</b>
<b>12. Recomendaciones.</b>	<b>95</b>
<b>13. Financiación.</b>	<b>96</b>
<b>14. Referencias.</b>	<b>97</b>
<b>15. Anexos.</b>	<b>123</b>

## LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
<b>Figura 1</b>	Ubicación anatómica y organización de la barrera hematoencefálica, de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y del conducto olfativo.	6
<b>Figura 2</b>	Esquema de la barrera hematoencefálica.	7
<b>Figura 3</b>	Esquema de la unidad neurovascular.	8
<b>Figura 4</b>	Funciones principales de la microglía: vigilancia inmunitaria, poda sináptica, fagocitosis y su nivel de actividad a lo largo de la vida de un individuo.	12
<b>Figura 5</b>	Asociaciones celulares de la BHE: representación esquemática de las uniones estrechas y la UNV.	13
<b>Figura 6</b>	Representación esquemática del ciclo celular en ausencia de enfermedad o ausencia de alteraciones.	15
<b>Figura 7</b>	Uniones intercelulares entre las células endoteliales microvasculares del SNC que forman la BHE y las células epiteliales del plexo coroideo que forman el BSLCR.	21
<b>Figura 8</b>	Esquema de los complejos Bacterianos por Socransky y cols, 1998.	34
<b>Figura 9</b>	Microfotografía de la bacteria gramnegativa: <i>Porphyromonas gingivalis</i> , observada en un microscopio estereoscópico con un objetivo de 4,5 de aumento. Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología oral, instituto UIBO, Universidad El Bosque.	35
<b>Figura 10</b>	Esquema de los posibles mecanismos de penetración/entrada de bacterias gramnegativas al sistema nervioso central.	38
<b>Figura 11</b>	La disfunción de la BHE promueve la Neurodegeneración	45
<b>Figura 12</b>	Esquema de los insertos transwell® y los diferentes estímulos/tratamientos y controles utilizados.	66
<b>Figura 13</b>	Esquema del montaje realizado para las fluorescencias, Microfotografías tomadas en el microscopio Zeiss Imager.M2.	67
<b>Figura 14</b>	Curva estándar de calibración kit amiloide Aβ42 ELISA (KHB3544, Invitrogen).	69
<b>Figura 15</b>	Citotoxicidad en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón expuesta a diferentes concentraciones MOI (5.0, 1.0, 50, 100 y 200) de bacteria completa viva, LPS (1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml) y LC (20 µg/ml) de <i>Porphyromonas gingivalis</i> cepa W83 por un periodo de 6h (A), 12h (B), 24h (C) y 48h (D) horas	76
<b>Figura 16</b>	Efecto sobre el ciclo de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, tratadas durante 24 horas, a diferentes concentraciones MOI (5.0, 1.0, 50, 100 y 200), LPS (1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml) y LC (20 µg/ml) de bacteria completa viva de <i>Porphyromonas gingivalis</i> cepa W83. A). Histogramas del ciclo celular de MBEC, B) Cuantificación en porcentaje de las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2M).	78
<b>Figura 17</b>	Efecto sobre el ciclo de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, tratadas durante 48 horas, a diferentes concentraciones MOI (5.0, 1.0, 50, 100 y 200), LPS( 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml) y LC (20 µg/ml) de bacteria completa viva	80

- de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. **A).** Histogramas del ciclo celular de MBEC, **B)** Cuantificación en porcentaje de las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2M).
- Figura 18** Inmunofluorescencias para la detección de las moléculas de unión estrecha (ZO-3 y  $\beta$ -Catenina) en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón de 1 día postnatal, infectadas con diferentes concentraciones de MOI (5.0 y 100), LPS (1.0  $\mu$ g/ml) y LC (20  $\mu$ g/ml) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. Se muestra la localización de ZO-3 (**A-B-C-D-E**) y de  $\beta$ -Catenina (**F-G-H-I-J**). 82
- Figura 19** Inmunofluorescencias para la detección de las moléculas de adhesión (PECAM, V-CAM, ICAM-1, E-Selectina) en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón de 1 día postnatal, infectadas con diferentes concentraciones MOI (5.0 y 100), LPS (1.0  $\mu$ g/ml) y LC (20  $\mu$ g/ml) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. Se muestra la localización de PECAM (**A-B-C-D-E**), de V-CAM (**F-G-H-I-J**), de ICAM-1 (**K-L-M-N-O**) y E-Selectina (**P-Q-R-S-T**). 84
- Figura 20** Expresión de las citoquinas proinflamatorias: IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  y quimiocina MCP-1 en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón infectadas con diferentes concentraciones MOI (5.0 y 100), LPS (1.0  $\mu$ g/ml) y LC (20  $\mu$ g/ml) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. **(A)** Expresión IL-6; **(B)** Expresión IL-10, **(C)** Expresión TNF- $\alpha$ , **(D)** Expresión MCP-1. 86
- Figura 21** Cuantificación de péptido A $\beta$ 42 en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón infectadas con diferentes concentraciones MOI (5.0 y 100), LPS (1.0  $\mu$ g/ml) y LC (20  $\mu$ g/ml) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. 87

## LISTADO DE TABLAS

		<b>Págs.</b>
<b>Tabla 1</b>	Proteínas de unión y de adhesión expresadas en el endotelio cerebrovascular.	20
<b>Tabla 2</b>	Patologías del SNC que implican disfunción de la BHE.	25
<b>Tabla 3</b>	Posibles causas y consecuencias de la disfunción BHE en la EA.	42

## LISTADO DE ANEXOS

		<b>Págs.</b>
<b>Anexo 1</b>	Lista de las concentraciones de los anticuerpos primarios.	123
<b>Anexo 2</b>	Lista de las secuencias de los primers para las citocinas y quimiocinas.	124

## RESUMEN

### **Evaluación del estímulo de *Porphyromonas gingivalis* sobre la integridad celular, respuesta proinflamatoria y producción de péptido A $\beta$ en células endoteliales de microvasculatura de cerebro.**

**Antecedentes:** Se han demostrado que la enfermedad periodontal puede contribuir y jugar un papel en la etiología, progresión e inflamación de la enfermedad de Alzheimer. La barrera hematoencefálica (BHE) juega un papel importante en el mantenimiento del microambiente especializado del Sistema nervioso central, siendo componente clave, las células endoteliales de microvasculatura de cerebro, por sus características únicas e importantes. Se ha evidenciado que la disfunción de la BHE es un biomarcador temprano de EA. **Objetivo:** Evaluar el efecto de *Porphyromonas gingivalis* W83 sobre la respuesta proinflamatoria y la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células de microvasculatura de cerebro de ratón (MBEC). **Métodos:** Las MBEC se estimularon con bacteria viva (MOI: 5 -200 y LPS (1.0 -10  $\mu$ g/ml) de *P. gingivalis*, se evaluó la viabilidad celular por el método de rezasurina, el efecto sobre el ciclo celular mediante el método 7AAD, la expresión de las moléculas de unión y de adhesión mediante inmunofluorescencia; así mismo, se realizó RT-PCR para determinar la expresión génica de citocinas proinflamatorias finalmente se realizó la medición de la secreción de A $\beta$ 42 mediante ELISA. Los datos se expresaron como  $\pm$ SEM y se analizaron mediante ANOVA de una vía y pruebas post-hoc de Tukey. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. **Resultados:** *P. gingivalis* a las 48h, indujo cambios en la viabilidad celular a MOI 200: 61.42% y 100: 44.75%; así mismo se observó que tanto la bacteria como el LPS produce modificaciones en el ciclo celular (Fase S). en relación a la las moléculas de unión a MOI: 5 y 100 se presentó cambios en la localización y sobreexpresión de  $\beta$ -catenina y VECAM-1. Así mismo se observó que *P.gingivalis* aumenta la expresión génica de TNF- $\alpha$  y MCP-1 en las células MBEC e induce la producción de péptidos A $\beta$  a una concentración no mayor de 10 pg/ml. **Conclusiones:** *P.gingivalis* indujo disminución en la viabilidad celular, alteraciones en la distribución de las fases del ciclo celular, provoco cambios en el marcaje de las proteínas de unión y adhesión, y aumento en la producción de la expresión de TNF- $\alpha$  y MCP-1 y la producción de péptidos A $\beta$  en las MBEC.

**Palabras claves:** Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, Barrera hematoencefálica, Células de microvasculatura de cerebro, Disfunción endotelial, Péptido A $\beta$ , inflamación.

## ABSTRACT

### **Assessment of the Stimulus of *Porphyromonas gingivalis* on Cellular Integrity, Proinflammatory Response and A $\beta$ Peptide Production in Brain Microvascular Endothelial Cells**

**Background:** Periodontal disease may contribute in the aethiology, progression and inflammation of Alzheimer's disease. The haematoencephalic barrier (HEB) plays an important role in maintaining the specialized environment of the central nervous system and brain microvascular endothelial cells play a key role. A dysfunction in the HEB is a biomarker of early AD. **Objective:** to assess the effect of *Porphyromonas gingivalis* W83 on the proinflammatory response and production of A $\beta$  peptide production in microvascular mice brain cells (MBEC). **Methods:** Said cells were stimulated with live bacteria (MOI: 5 -200 y LPS (1.0 -10  $\mu$ g/ml) of *P. gingivalis*, cellular viability was evaluated with the resazurin method, the effect on the cell cycle with the 7AAD method and expression of adhesion molecules with immunofluorescence. RT-PCR was performed in order to determine gene expression of proinflammatory cytosines and A $\beta$ 42 secretion with ELISA. Data was expressed as  $\pm$ SEM and analysed with one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. **Results:** *P. gingivalis* induced changes in cell viability after 48 hours with MOI 200: 61.42% and 100: 44.75%. It was also observed that the bacteria and LPS produce modifications of the cell cycle (phase S). There was a shift in MOI: 5 y 100 localization and over-expression of  $\beta$ -catenin, VECAM-1, *P.gingivalis* increased the expression of TNF- $\alpha$  and MCP-1 in the MBEC and induced production of A $\beta$  peptides in a concentration no greater than 10 pg/ml. **Conclusions:** *P.gingivalis* induced cell viability, cycle phase alterations, marker change of adhesion proteins, increment of production of TNF- $\alpha$  and MCP-1 expression and production of A $\beta$  peptides in the MBEC.

**Key words:** Alzheimer disease, periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, haematoencephalic barrier, brain microvascular cells, endothelial dysfunction, A $\beta$  peptide, inflammation.

## ABREVIATURAS

- SN: Sistema nervioso.
- BHE: Barrera hematoencefálica.
- DENV: Virus como el dengue.
- EA: Enfermedad de Alzheimer.
- A $\beta$ : Beta-amiloide.
- EP: Enfermedad Periodontal.
- PPA: Proteína precursora amiloide.
- SNC: Sistema nervioso central.
- NFk- $\beta$ : Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.
- MBEC: Células endoteliales de microvasculatura de cerebro.
- LPS: Lipopolisacárido.
- BSLCR: Barrera de sangre-líquido cefalorraquídeo.
- LCR: Líquido cefalorraquídeo.
- UNV: Unidad neurovascular.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- GABA: Ácido  $\gamma$ -amino butírico.
- GGTP:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa.
- TJP: Proteínas de unión estrecha (Tight Junction Proteins).
- JAM: Proteínas de unión adherentes (Junctional Adhesion Molecules).
- BL: Lamina basal.
- CX<sub>3</sub> CR1: Receptor de quimiocina: receptor fractalquina.
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante- beta.
- MeCP2: Gen que codifica la proteína MECP2.
- MafB: Factor de transcripción MafB: proteína que está codificada por el gen MAFB.

- Mef2C: Factor potenciador específico de miocito 2C: proteína codificada por el gen mef2C.
- CD200R: Glicoproteína de membrana OX-2.
- Pgp: P-glicoproteína.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.
- HTLV-1: Virus Leukemia de células T humano.
- WNV: Virus West Nile.
- JEV: Encefalitis Japonesa.
- MAGUK: Proteínas guanilato quinasa asociadas a la membrana.
- ZO: Zona occludens.
- AJ: Uniones adherentes.
- ZO-1: Proteína zona occludens -1 (proteínas de andamiaje de unión estrecha).
- ZO-3: Proteína zona occludens -3 (proteínas de andamiaje de unión estrecha).
- GUK: Guanilato quinasa catalíticamente inactivo.
- PECAM-1: Proteína de adhesión celular endotelial plaquetaria-1 (CD31).
- VCAM-1: Proteína de adhesión celular vascular (CD106).
- ICAM-1: Proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD102).
- $\beta$ -Cat:  $\beta$ -Catenina.
- E- sele: E-selectina (CD62E).
- IL: Interleucinas.
- AQP4: Acuaporina 4.
- Ig: Inmunoglobulinas.
- EM: Esclerosis múltiple.
- OMS: Organización mundial de la salud.
- SISPRO: Sistema Integrado de Información de la Protección Social.
- OCDE: Organización para la cooperación y el desarrollo económico.
- CIE10: Clasificación internacional de enfermedades edición 10.
- RgpA: Arginina-gingipaína A.

- RgpB: Arginina-gingipaína B.
- Kgp: Lisina-gingipaína.
- MMP: Metaloproteinasas de matriz.
- PICALM: Proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol.
- APOE: Gen de la Apolipoproteína E.
- BM: Membrana basal.
- MMP9: Metaloproteinasas de la matriz -9.
- ECA1: Enzima convertidora de la angiotensina I.
- ECM: Matriz extracelular.
- EDI: Enzima degradadora de insulina.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- NHANES: Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición.
- CAL: Pérdida de inserción clínica.
- iNOS: Óxido nítrico.
- HCP-1: Haem carrier protein 1.
- *E.coli: Escherichia coli.*
- *H.pylori: Helicobacter pylori.*
- OmPA: Proteína A de la membrana externa.
- IbeA: Proteína de invasión del endotelio cerebral.
- Ecgp96: Receptores endoteliales de choque térmico
- CNTNAP1: Proteína 1 asociada a la contactina.
- CCM: Malformación cavernosa cerebral.
- EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental.
- LRP-1: Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas.
- AR: Ácido retinoico.
- RAGE: Receptor para productos finales de glicación avanzada.
- TCE: Lesión cerebral traumática.
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.
- CENNA: Centro Nacional de Coordinación de Alzheimer.

- AAC: Angiopatía amiloide cerebral.
- APOE\* $\epsilon$ 4: Gen con alelo  $\epsilon$ 4 de la apolipoproteína E.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- IFN: Interferón.
- DCL: Deterioro cognitivo leve.
- NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos.
- TLR: Receptor tipo Toll.
- MCP-1: Quimiocina y proteína quimioatrayente de monocitos-1.
- SNP: Sistema nervoso central.
- SHSY5Y: Células de neuroblastoma humano.
- FSC: Flujo sanguíneo cerebral.
- ISF: Líquido intersticial.
- SVD: Enfermedad de los vasos pequeños.
- OMV: Vesículas de membrana.
- PCR: Proteína C reactiva.
- NLRP3: Inflamosoma.
- mg: Miligramo.
- Kg: Kilogramo.
- Rpm: Revoluciones por minuto.
- Hps: Horas post-siembra.
- SC: Solución de criopreservación.
- SFB: Suero fetal bovino.
- IF: Inmunofluorescencia.
- SE: Sin estímulo.
- LC: Lisado celular.
- Bc: Bacteria completa.
- BHI: Brain Heart Infusion.
- DO: Densidad óptica.
- UFC: Unidades formadoras de colonia.

- TJP: Proteínas de unión estrecha.
- MOI: Multiplicidad de infección.
- kDa: KiloDalton.
- NFT: Ovillos neurofibrilares.
- PBS: Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino o buffer fosfato salino).
- CMT: Transporte mediado por transportadores de solutos.
- ECS: Espacios extracelulares.
- L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina.
- RMT: Transcitosis mediada por receptor.
- EMS: Error estándar de la media.
- LtxA: Leucotoxina.
- hCMEC/D3: Células endoteliales de cerebro humano.
- HCAEC: Células endoteliales de las arterias coronarias humana.
- HAEC: Células endoteliales aórticas humanas.
- SHSY5Y: Células de neuroblastoma humano.
- HUVEC: Células endoteliales de vena umbilical humana.
- APP770: Proteína precursora de amiloide 770.

## 1. Introducción

El sistema nervioso (SN) cuenta con una protección altamente selectiva, esta defensa la confiere una barrera de difusión celular conocida como Barrera Hematoencefálica (BHE), la cual está compuesta por diferentes tipos de células muy especializadas como lo son las células endoteliales de microvasculatura cerebral, que restringen el paso de moléculas desde los capilares y circulación periférica hacia el tejido parenquimatoso cerebral, lo cual asegura y adjudica la homeostasis. Pese a esto, algunas moléculas y microorganismos logran penetrar la BHE y llegan al tejido nervioso para causar daños irreversibles y graves en la fisiología de estos tejidos involucrados. Dentro de los microorganismos que causan daños irreversibles, alteraciones en la BHE y luego infectan el tejido nervioso, encontramos algunas amebas, hongos, virus como el dengue (DENV) (Velandia-Romero et al. 2016) y bacterias sobre todo las gramnegativas.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de trastornos neurodegenerativos en la población adulta, con casi 47 millones de personas afectadas en todo el mundo. A pesar de los avances logrados en los últimos 30 años en la comprensión de los mecanismos neuropatológicos, particularmente relacionados con los procesos de la proteína Tau y péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ), existen aún preguntas sobre la etiopatogenia y los factores de riesgo de la EA. Actualmente en algunos estudios epidemiológicos se ha empezado a demostrar que la enfermedad periodontal (EP) en estadios crónicos/severos es un factor de riesgo y juega un papel protagónico en la etiología, en la progresión y en el desarrollo de la EA.

La cavidad oral representa un tema de interés creciente para estudiar asuntos relacionados con el vínculo establecido entre la salud bucal y más de cincuenta enfermedades sistémicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y pulmonares, la diabetes y algunas formas de cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Se plantean diferentes hipótesis de la relación de EA y EP, la hipótesis que toma más fuerza es la relacionada con la bacteria

gramnegativa de *Porphyromonas gingivalis* y sus respectivos factores de virulencia. Se cree que algunas proteínas proinflamatorias como las citocinas y algunos marcadores sistémicos de inflamación originados de la infección causada por la EP, perturban el microambiente de la BHE hasta penetrar y llegar al cerebro.

Se ha demostrado la presencia de especies periodontopatógenas en el cerebro como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola* y sus respectivos factores de virulencia, estos son capaces de influir en el aumento la proteína precursora amiloide (PPA) en sangre y así mismo en la producción, formación y acumulación de péptidos A $\beta$ , siendo un actor principal para la fisiopatología de la EA. La PPA genera producción y acumulación desregulada de péptidos A $\beta$  en el sistema nerviosos central (SNC) y también genera la producción de NF $\kappa$ - $\beta$  y el TNF- $\alpha$  que están presentes en la EP.

También se ha encontrado una densidad siete veces mayor de bacterias orales en el tejido cerebral de pacientes fallecidos con EA en comparación con los controles. Las bacterias orales que más se encuentran en el SNC y que se asocian con el deterioro cognitivo son las *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Helicobacter pylori* y *Borrelia burgdorferi*. Patógeno clave de la periodontitis *Porphyromonas gingivalis* se ha identificado significativamente en los cerebros de pacientes que han muerto por EA. Además, en modelos de ratones, una infección con *Porphyromonas gingivalis* resulta en una colonización del cerebro y en una mayor producción de placas A $\beta$  dentro de él y disfunción de la BHE.

Considerando que los patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* puede y está relacionado con causar disfunción endotelial y aumento en la producción de péptido A $\beta$ , es de gran importancia establecer los cambios en la integridad celular, la producción de citocinas proinflamatorias, la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  y la alteración de las proteínas de unión y adhesión en células endoteliales de microvasculatura de cerebro (MBEC), dado que solo existen posibles hipótesis sobre la fisiopatología de la EA, de la alteración o disfunción de la BHE asociada a la EP y a su vez poder identificar posibles dianas

terapéuticas útiles para el desarrollo de fármacos que puedan ser usados como tratamiento del Alzheimer.

Por tal motivo, el alcance de este trabajo está en evaluar el efecto de la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, el Lipopolisacárido (LPS) y el Lisado celular (LC) sobre la respuesta proinflamatoria, la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón.

## 2. Marco teórico o conceptual

El SNC es una parte del sistema nervioso que se divide en el cerebro y la médula espinal. La función principal del SNC es procesar la información que recibe del sistema nervioso periférico. Las características neuroanatómicas importantes del SNC incluyen a las neuronas, las células gliales, los axones, las membranas, el tubo neural y el sistema ventricular. Las principales subdivisiones del encéfalo son el telencéfalo, el diencéfalo y el tronco encefálico.

Los aspectos conductuales del SNC incluyen sensación y percepción, sistema motor, lateralización cerebral y lenguaje. El SNC y sus tejidos son altamente especializados, pero poseen una regeneración endógena limitada y por tal motivo cualquier lesión puede producir deficiencias funcionales de por vida. La reparación de estos tejidos se ve alterada aún más por el desarrollo de un microambiente hostil y una arquitectura tisular compleja (Daly et al. 2012).

La protección del sistema nervioso contra la invasión microbiana está dada por barreras celulares, tales como la barrera hematoencefálica y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLQR). Además de esto, las células propias del sistema nervioso central son capaces por sí solas de producir una respuesta inmunitaria innata contra los patógenos invasores y demás agresores, pues esta respuesta es muy sensible a cambios y es capaz de secretar mediadores solubles y presentar antígenos (Dando et al. 2014).

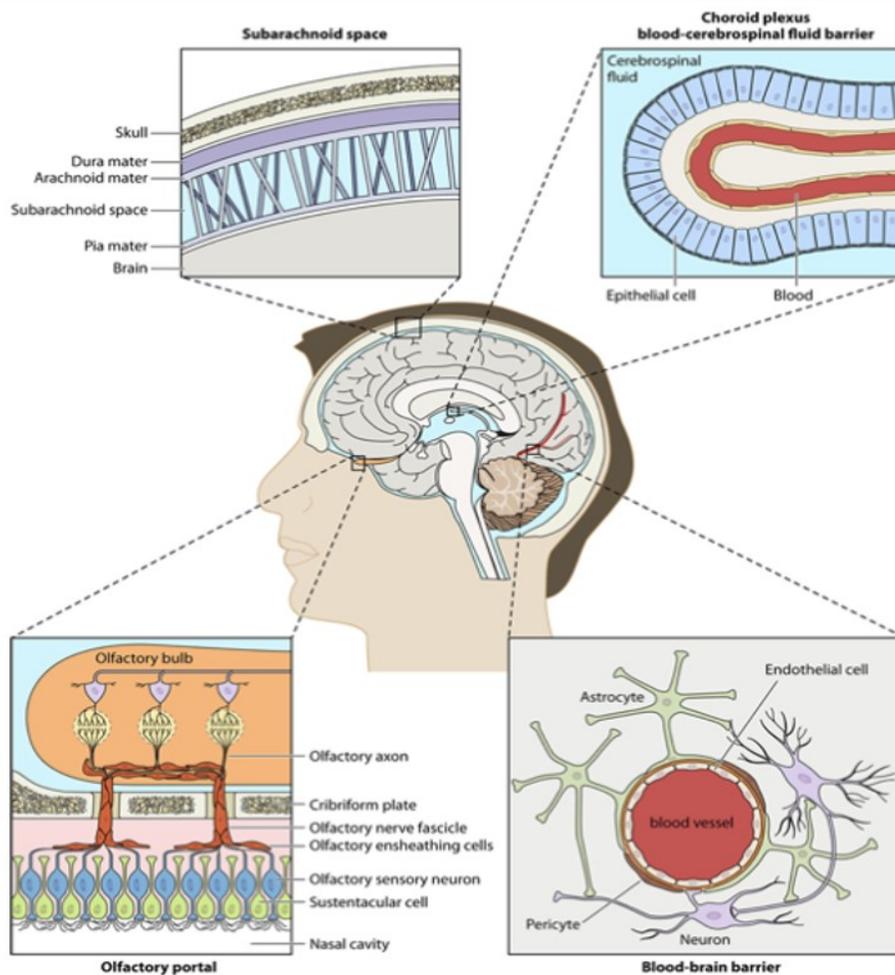
Se ha demostrado que las bacterias gramnegativas y sus factores de virulencia alteran el microambiente cerebral causando disfunción a nivel del SNC, y participando en la progresión y el establecimiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Pero aún existen muchos dogmas de la relación de la EA y los microorganismos emergentes como *Porphyromonas gingivalis*, microorganismo principal en la EP.

## 2.1. Barreras del Sistema nervioso central

El sistema nervioso central está protegido anatómicamente de traumatismos por estructuras óseas, como las vértebras y el cráneo y está envuelto por las meninges y rodeado por el líquido cefalorraquídeo (LCR). El cráneo y las meninges: la duramadre, la aracnoides y la piamadre, protegen el cerebro. La aracnoides y la piamadre están unidas por fibras de tejido conjuntivo llamadas trabéculas aracnoideas, que recorren el espacio subaracnoideo que contiene LCR. A su vez a nivel celular, la BHE y la BSLCR mantienen la homeostasis del cerebro, es decir se encargan de adaptar al cerebro a los cambios del entorno para ayudar a mantenerlo sano y a mantener los niveles de hormonas, electrolitos, proteínas, temperatura, energía, oxígeno y sangre dentro de los límites normales (Daly et al. 2012).

La BHE está compuesta por uniones estrechas entre las células endoteliales que recubren los microvasos cerebrales, además de los pericitos y los astrocitos. La BSLCR está formado por uniones estrechas entre las células epiteliales en el plexo coroideo, las células endoteliales de las venas y vénulas dentro del espacio subaracnoideo y las células epiteliales de la aracnoides (Figura 1)(Hawkins 2005; Dando et al. 2014).

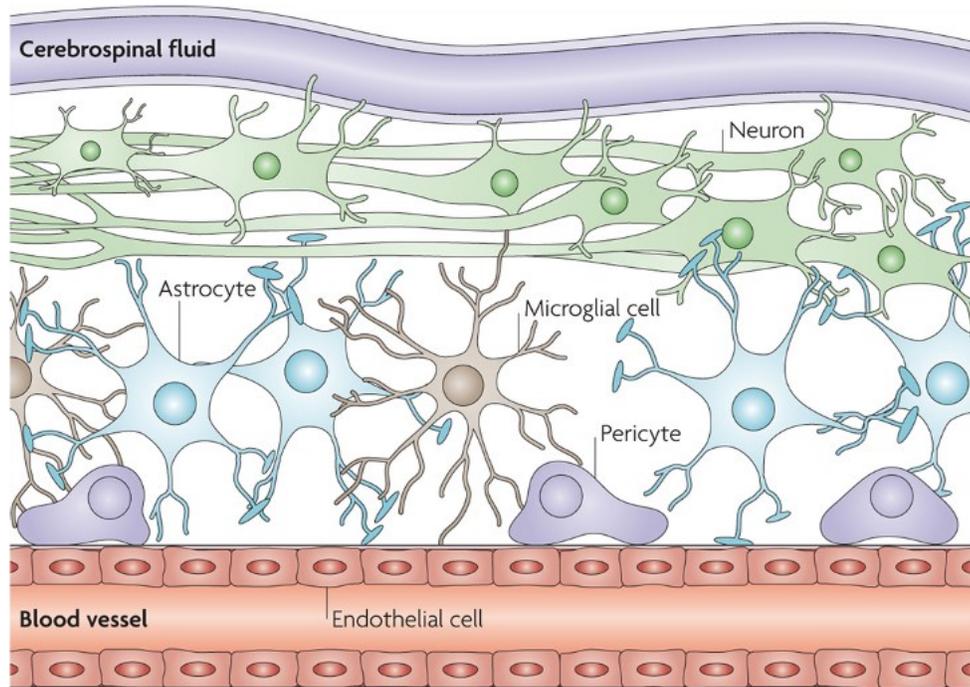
Existen tres capas principales y de gran importancia que limitan y regulan el intercambio molecular entre la sangre y el tejido neural. La BHE se ubica entre el tejido conectivo sangre y el líquido intersticial cerebral, el epitelio del plexo coroideo que a su vez se ubica entre la sangre y el LCR ventricular y por último el epitelio aracnoides que se ubica entre la sangre y el LCR subaracnoideo. Entre estas tres barreras, la BHE ejerce un mayor control sobre el microambiente de las células cerebrales (Figura 1) (Abbott 2013).



**Figura 1:** Ubicación anatómica y organización de la barrera hematoencefálica, de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y del conducto olfativo. Las meninges que protegen y se encuentran alrededor del cerebro, son la duramadre, la aracnoides y la piamadre. La aracnoides y la piamadre están conectadas por hebras de tejido conjuntivo llamadas trabéculas aracnoideas, que atraviesan el espacio subaracnoideo que contiene LCR. La BHE está formada por uniones estrechas entre células endoteliales que revisten microvasos cerebrales, además de pericitos y astrocitos. El BSLCR está formado por uniones estrechas entre (a) células epiteliales en el plexo coroideo, (b) células endoteliales de las venas y vénulas dentro del espacio subaracnoideo y (c) las células epiteliales de la aracnoides. Tomado de: Dando, 2014 (Dando et al. 2014).

### 2.1.1. Fisiología-anatomía de la Barrera Hematoencefálica

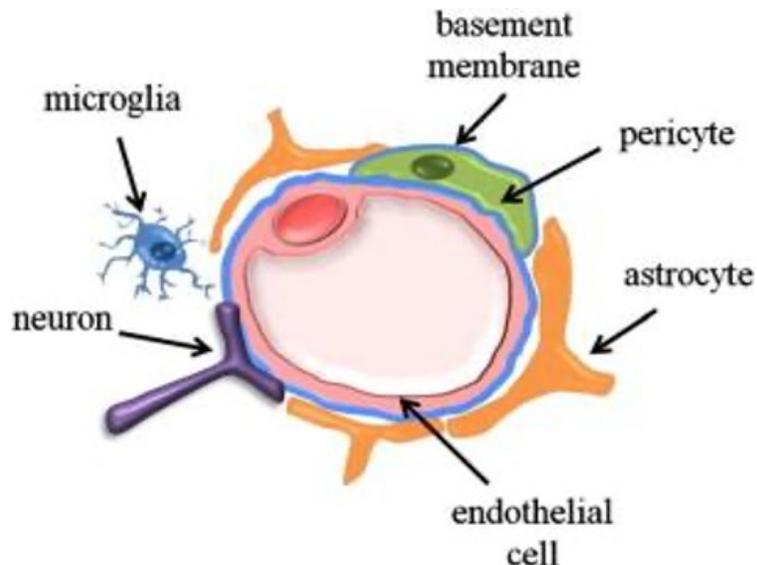
La BHE es una barrera de configuración estructural y funcional que está conformada por células endoteliales que a su vez recubren los microvasos cerebrales en asociación con las demás células como pericitos, astrocitos y la membrana basal, esta juega un papel muy importante en el mantenimiento de un microambiente neuronal al regular el paso de moléculas dentro y fuera del cerebro, además protege el cerebro de cualquier microorganismo y/o toxina que esté circulando en la sangre (Figura 2)(KS 2008; Abbott 2013).



**Figura 2:** Esquema de la barrera hematoencefálica. Tomado de: Ks, 2008 (KS 2008).

Las 4 funciones principales de la BHE, son: 1. Aísla/separa y defiende al cerebro de compuestos circulantes potencialmente tóxicos, 2. Transportar selectivamente compuestos necesarios, 3. Localiza y capta cambios en la sangre e informa estos cambios al cerebro y 4. Asimila y transforma sustancias presentes en el cerebro y en la sangre (Rokad et al. 2017; Uwamori et al. 2019).

Las células endoteliales, la lámina basal, los astrocitos, los pericitos, las neuronas y las células de la microglía, conforman la barrera hematoencefálica, que constituyen la unidad neurovascular (UNV)(Figura 3). Todos estos componentes tienen diferentes funciones importantes en el establecimiento y mantenimiento de la BHE (Cardoso et al. 2010).



**Figura 3.** Esquema de la unidad neurovascular. Tomado de: Cardoso, 2010 (Cardoso et al. 2010).

Los pericitos son un componente celular muy importante de la barrera hematoencefálica. Estos desempeñan un papel regulador en la angiogénesis cerebral, en la formación de uniones estrechas de células endoteliales, en la diferenciación de la barrera hematoencefálica, además también contribuyen en la capacidad vasodinámica microvascular y en la estabilidad estructural. Pero una de las funciones más importantes de los pericitos del sistema nervioso central es que expresan funciones de macrófagos y participan activamente en la red neuroinmune que trabaja activamente en la barrera hematoencefálica (Cardoso et al. 2010).

Los pericitos se adhieren a la superficie abluminal del endotelio y, junto con los extremos de los astrocitos, forman una barrera de membrana adyacente. En la hendidura interendotelial

se forma una barrera física mediante uniones complejas que regulan el flujo de iones, moléculas polarizadas y macromoléculas procedentes de la circulación sistémica (Abbott et al. 2010a; Abbott 2013; Dando et al. 2014).

También en esta hendidura interendotelial, la BHE está formada por dos tipos de uniones: las uniones adherentes y las uniones estrechas. Estas uniones bloquean el transporte de una amplia gama de moléculas, restringiendo la permeabilidad paracelular a través de la BHE (Abbott et al. 2010; Cardoso et al. 2010). Además, las células endoteliales que forman la BHE carecen de fenestraciones en sus membranas plasmáticas y tienen un número reducido de vesículas pinocitóticas en comparación con las células endoteliales de otros tejidos, lo que restringe el flujo transcelular (Engelhardt and Sorokin 2009).

A pesar de ello, ciertos solutos y macromoléculas logran atravesar o pueden ser transportados a través de la BHE mediante mecanismos específicos e inespecíficos, como lo son: la difusión pasiva y la transcitosis mediada por receptores y/o adsorción, o a través de transportadores de tipo de unión a adenosín trifosfato (ATP) y transportadores de solutos, que se expresan en los microvasos cerebrales. Las vías transcelulares y paracelulares de entrada al SNC son muy importantes para los patógenos microbianos (Geier EG et al. 2013; Dando et al. 2014).

Cabe destacar que las células endoteliales microvasculares del cerebro tienen características particulares, como son sus uniones estrechas y bajos porcentajes de pinocitosis (ingestión de líquidos y solutos mediante pequeñas vesículas, incluidas macromoléculas). Los astrocitos y los pericitos ayudan a conservar la propiedad de barrera física de las células endoteliales de microvasculatura del cerebro. Por otro lado, los astrocitos junto con las células microgliales, regulan el reclutamiento de células hematógenas infiltrantes y esto puede afectar a la translocación de algunos microorganismos, los astrocitos también poseen funciones antimicrobianas y los pericitos modulan las vías de transducción de señales en las células endoteliales y esto puede afectar el paso microbiano (KS 2008; Cardoso et al. 2010; Liu et al. 2017; Hemonnot et al. 2019; Lue et al. 2019).

La lámina basal también llamada membrana basal, rodea las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y envuelve a los pericitos, fijando las células en su lugar y contribuyendo en el establecimiento de conexiones entre las células endoteliales y las otras células de la UNV (Cardoso et al. 2010).

La barrera sangre-líquido cefalorraquídeo está compuesta por uniones estrechas entre las células epiteliales ubicadas en el plexo coroideo, en los ventrículos laterales, en el ventrículo tercero y en el cuarto ventrículo del cerebro; y las células endoteliales de las venas y vénulas dentro del espacio subaracnoideo. Entre las células epiteliales de la capa de la aracnoides las uniones estrechas contribuyen a BSLCR para formar una barrera entre el espacio subaracnoideo y los vasos sanguíneos fenestrados y permeables de la duramadre. Al igual que la BHE, la BSLCR protege el SNC y contribuye en mantener la homeostasis; pero las células epiteliales coroideas de esta barrera a su vez secretan LCR del plexo coroideo al sistema ventricular cerebral, y las uniones estrechas entre las células epiteliales tienen una resistencia eléctrica menor que la de las células endoteliales de la BHE (Dando et al. 2014). Por consiguiente, se sustenta que esta barrera es más vulnerable a la penetración microbiana a través de mecanismos paracelulares (Abbott 2013).

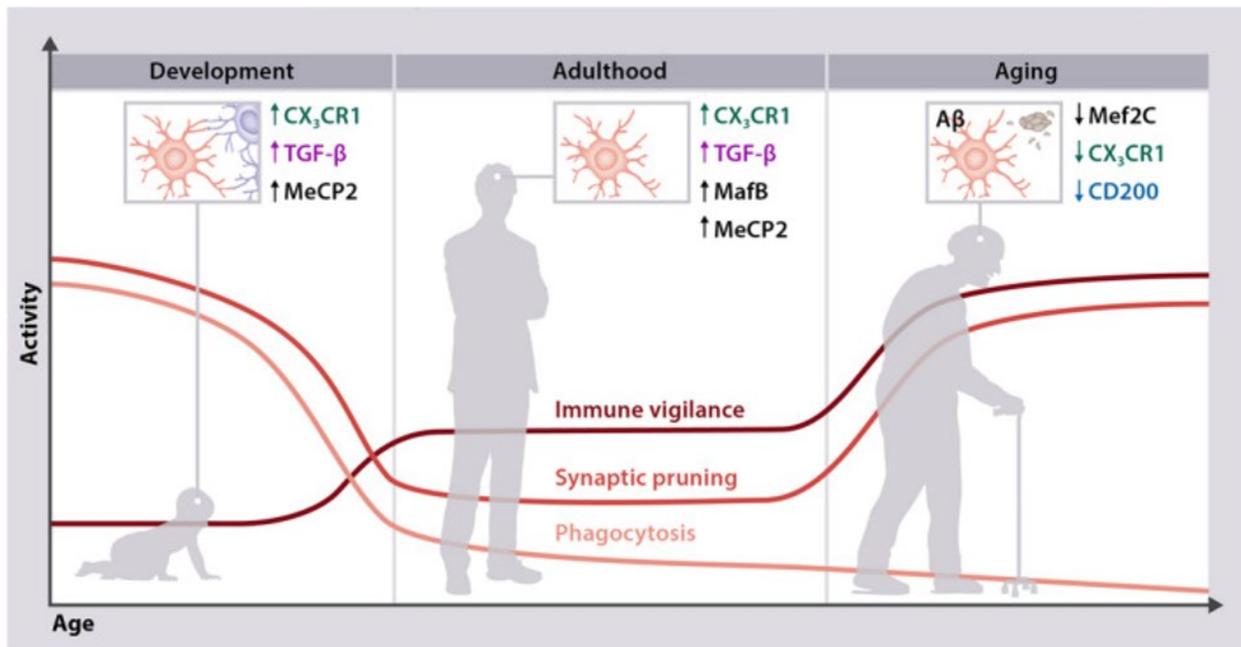
Las neuronas regulan la función de los vasos sanguíneos como resultado a los requisitos metabólicos como la vasodilatación o vasoconstricción, liberando neurotransmisores como: norepinefrina (neuronas noradrenérgicas), serotonina (neuronas serotonérgicas), acetilcolina (neuronas colinérgicas) y ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y glutamato (neuronas GABA-érgicas), también ellas inducen la expresión de enzimas exclusivas de células endoteliales de microvasculatura de cerebro, como la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (GGTP) encargada del transporte de aminoácidos a través de la BHE. Estos procesos, ayudan al mantenimiento del microambiente en el cerebro que permite el funcionamiento neuronal adecuado, favoreciendo la señalización exacta y reproducible entre neuronas (Cardoso et al. 2010; Abbott 2013).

La microglía que son macrófagos tisulares altamente especializados, se mantienen a través de la autorrenovación *in situ*, esta juega un papel importante en las respuestas inmunes del SNC, ya que la microglía actúa inspeccionando el microambiente local y cambiando el fenotipo en respuesta a la alteración homeostática del SNC, es decir que la microglía se activó y asume una función fagocítica típica de células inmunes (Engelhardt and Sorokin 2009; Cardoso et al. 2010).

La actividad inmunitaria de la microglía en condiciones fisiológicas (en envejecimiento normal) consta de tres etapas, la primera de ellas es durante el desarrollo del cerebro, las células neuronales se desarrollan en exceso y muchas de ellas entran en apoptosis, en esta etapa aparecen/nacen las comunicaciones o conexiones sinápticas. Las células microgliales actúan de forma reguladora en ambas direcciones mediante la liberación de citoquinas que respaldan el crecimiento y la diferenciación de las células progenitoras neuronales y mediante la eliminación de células apoptóticas y la poda de sinapsis superfluas o que no cumplen su función. En cada etapa existen puntos de control, estos no solo evitan que la microglía genere respuestas superiores a los estímulos inmunitarios, sino que también orquestan las funciones microgliales hacia las necesidades cambiantes del cerebro en desarrollo. Varias moléculas (TGF- $\beta$ , MeCP2 y CX 3 CR1) son cruciales para estas actividades microgliales tempranas (Figura 4) (Deczkowska et al. 2018; Jungbauer et al. 2022).

En la siguiente etapa la edad adulta, la fagocitosis microglial de los cuerpos apoptóticos y la poda sináptica continúan, aunque en un nivel bajo. Además de TGF- $\beta$ , MeCP2 y CX 3 CR1, ahora MafB juega un papel importante. La falta de MafB dentro de las células microgliales conduce a una mayor expresión de interferón y genes relacionados con la inflamación. En la etapa del envejecimiento, la microglía experimenta cambios fuertes que afectan su homeostasis y cambian su fenotipo de moduladores sinápticos en la infancia a reposo en la edad adulta y se activan en el cerebro humano anciano. Las células microgliales envejecidas expresan más moléculas relacionadas con la inflamación. La poda sináptica aumenta mientras que la actividad fagocítica disminuye (Figura 4) (Deczkowska et al. 2018; Jungbauer et al. 2022). En el SNC también se encuentran otras células inmunitarias residentes, como lo

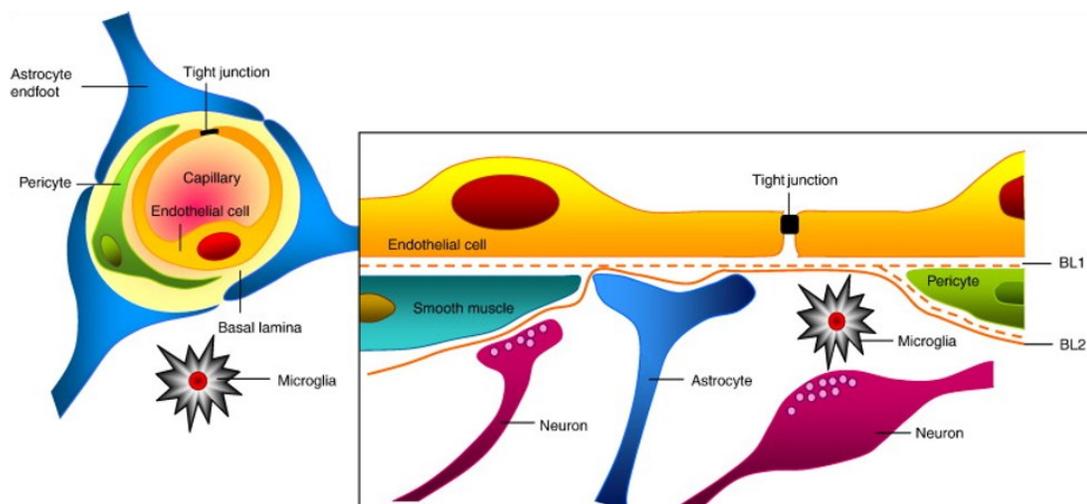
son los macrófagos perivasculares, pequeñas poblaciones de células dendríticas derivadas de la sangre y macrófagos dentro del plexo coroideo y las meninges (Engelhardt and Sorokin 2009; Cardoso et al. 2010).



**Figura 4:** Funciones principales de la microglía: vigilancia inmunitaria, poda sináptica, fagocitosis y su nivel de actividad a lo largo de la vida de un individuo. Tomado de: Deczkowska y Jungbauer, 2022 (Deczkowska et al. 2018; Jungbauer et al. 2022).

La BHE está constituida por moléculas que establecen una barrera de difusión paracelular, que son proteínas que componen las uniones estrechas, las uniones adherentes, las proteínas de transmembrana y están localizadas en los contactos célula-célula fuera de las uniones estrechas organizadas y las uniones adherentes, y las proteínas de andamiaje de las uniones intracelulares. La diferencia entre el endotelio extraneural y las células endoteliales de microvasculatura cerebral es principalmente por la ausencia de fenestraciones (agujeros en la membrana celular, y esto permite el intercambio de moléculas entre las células), de las cuales carecen estas segundas células MBEC (Dias et al. 2019).

Esta carencia junto con la instauración de las uniones estrechas entre las células, por medio de proteínas integrales y periféricas de membrana, son denominadas proteínas de unión estrecha (TJ) y proteínas de unión adherentes (JAM) (Figura 5). Esto permite al endotelio tener una transcitosis (o transporte transcelular: es un conjunto de procesos que permiten el paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro) y una difusión paracelular (paso de moléculas a través de dos células por el espacio intercelular) en bajo nivel (Abbott et al. 2010; Dias et al. 2019).



**Figura 5:** Asociaciones celulares de la BHE: representación esquemática de las uniones estrechas y la UNV. Tomado de: Abbott, 2010 (Abbott et al. 2010).

## 2.2. Células endoteliales de microvasculatura de cerebro

Las células endoteliales del SNC tienen propiedades diferentes de las células endoteliales en otros tejidos, dentro de estas propiedades se destaca: la presencia de proteínas transportadoras y receptoras específicas de la BHE para controlar la entrada y salida de metabolitos a través de las células (transporte transcelular) y uniones estrechas de alta resistencia eléctrica, para limitar el movimiento entre células adyacentes (transporte paracelular); por otro lado también poseen niveles bajos de vesículas transcitóticas en

comparación con el endotelio periférico y ausencia de fenestras (pequeños poros que permiten el paso rápido de moléculas en las células endoteliales periféricas) (Keaney and Campbell 2015).

Estas células tienen tasas de pinocitosis muy bajas en comparación con el endotelio periférico. Una de las principales proteínas que contiene el dominio de la superfamilia facilitadora 2 (Mfsd2a), es una proteína de transporte de membrana, se expresa específicamente en el endotelio del SNC y actúa como un regulador clave que suprime la actividad vesicular en la BHE (Ben-Zvi et al. 2014; Andreone et al. 2017).

Para garantizar el paso de nutrientes de la sangre al SNC y eliminar posibles agentes tóxicos del cerebro, las células endoteliales de la BHE expresan transportadores específicos y bombas de expulsión. En particular, la bomba de flujo MDR1/P-glicoproteína (Pgp), que transloca moléculas lipófilas o endógenas potencialmente dañinas desde el SNC a la sangre. El transportador de glucosa GLUT-1 (*SLC2A1*) también está altamente enriquecido en el endotelio de la BHE, lo que permite el suministro de glucosa al SNC (Daneman 2012).

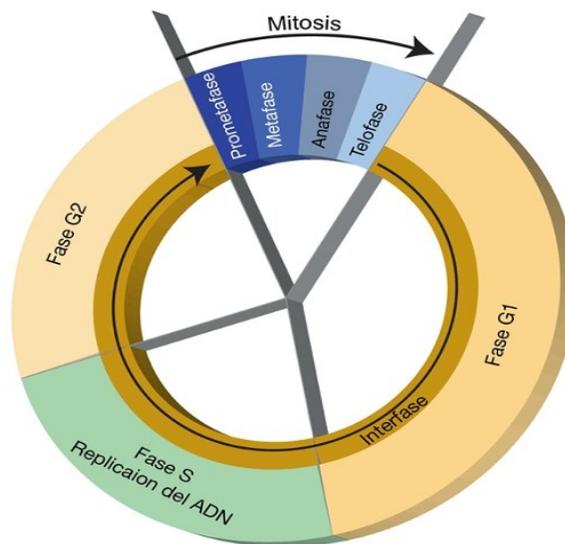
### *2.2.1. Ciclo celular de las células endoteliales*

El ciclo celular comprende una lista de eventos/etapas que tienen lugar en la célula durante su crecimiento y división. El ciclo celular de una célula sana (normalidad) consiste en cuatro fases, estas son importantes para la división/replicación y el crecimiento celular: fase G1, fase S, fase G2 y finalmente fase M. Este ciclo se repite de 40 a 60 veces en la vida de una célula sana, aproximadamente, pues depende del tipo de célula.

En cada fase del ciclo celular pasan diferentes acontecimientos importantes para la célula y para la fase próxima: En la fase G1 la célula se prepara para dividirse, para poder hacerlo entra a la fase S, en esta fase la célula sintetiza una copia exacta de su ácido desoxirribonucleico (ADN), y se prepara para entrar a la fase G2, en esta fase la célula

organiza y condensa su material genético y se prepara para la división celular, en la siguiente fase M, en esta fase la célula entra en mitosis.

Es decir, la célula madre reparte las dos copias de su propio material genético entre sus dos células hijas y el ciclo celular empieza de nuevo para cada una de ellas. Las células pasan la mayor parte de su tiempo de vida en la etapa llamada interfase, y en este tiempo crece, duplica sus cromosomas y se prepara para entrar en mitosis, entre cada interfase hay unos check point que como su nombre indica, son puntos de control donde la célula se cerciora que todo esté en un funcionamiento normal (Figura 6)(Cell cycle, NIH, 2023).



**Figura 6:** Representación esquemática del ciclo celular en ausencia de enfermedad o ausencia de alteraciones. Tomado de: Cell Cycle, 2023 (Cell cycle, NIH, 2023).

En un sistema nervioso y en un cerebro en desarrollo, las células sanas y en crecimiento cumplen con el ciclo y la división celular, pero en un sistema nervioso y en un cerebro adulto este proceso cesa, excepto en las células progenitoras neuronales que nunca se replican. A pesar de las diferencias estructurales, las células endoteliales normales se encuentran inactivas en todas partes del cuerpo. Este estado de reposo se define por una mínima o nula proliferación y migración a través de la barrera endotelial y una expresión mínima o

completamente ausente de moléculas de adhesión de leucocitos (Copani et al. 2008; Clark and Paluch 2011; Ricard et al. 2021).

El promedio de vida de una célula endotelial normal/sana en el corazón es de aproximadamente 6 años y la actividad proliferativa es ausente (a excepción del hígado y del bazo, donde el 1 % de las células endoteliales proliferan en un estado de reposo (Copani et al. 2008; Clark and Paluch 2011; Ricard et al. 2021).

Ahora bien, las células endoteliales proliferan en edades tempranas, donde el individuo está joven y en crecimiento (proliferación, completan el ciclo celular para poderse replicar), hasta llegar o alcanzar una edad adulta y madura, en donde entran a un estado quiescente (quietud, no hay proliferación, no completan el ciclo celular). Sin embargo, este endotelio 'quiescente' realiza una gran cantidad de trabajo activo e importante, desde la expresión de proteínas de unión y adhesión hasta el soporte activo del mantenimiento de la barrera para la supervivencia celular (Ricard et al. 2021).

Por ende, las células endoteliales de microvasculatura de cerebro son el componente celular más importante de la BHE, como tejido funcional, como estructura, al actuar frente a infecciones de patógenos y lo más importante como regulador del entorno de las neuronas del cerebro. Algunos estudios han relacionado la integridad de la BHE y de las células endoteliales con la supervivencia neuronal y la homeostasis del tejido cerebral. (Fisher et al. 2015).

### 2.3. *Proteínas de unión estrecha de la BHE*

Las proteínas de unión estrecha (TJP) están localizadas entre células endoteliales adyacentes, estas son elementos claves que participan activamente en el establecimiento de una barrera paracelular, limitando la difusión libre de iones y moléculas en las uniones célula-célula, adoptando una función de "compuerta/puerta". Las TJP se descubrieron mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión y se describieron como puntos de encuentro

donde las membranas de las células adyacentes se unen, eliminando la hendidura intercelular. Las TJP del endotelio de la BHE se parecen a las de las células epiteliales, al fabricar hebras/fibras de partículas continuas y complejas predominantemente protoplásmicas, la ocludina y las claudinas se localizan en las fibras de partículas de TJP y, por lo tanto, se plantea la hipótesis de que una alta porción de las TJP, están correlacionadas con una mayor afinidad por los elementos del citoesqueleto de actina (Abbott et al. 2010)

Las TJP actúan como una "cerca" al crear una barrera de difusión intramembranosa, esto impide el paso libre de proteínas y lípidos a través de la bicapa lipídica y también prohíbe la mezcla de los componentes de la membrana plasmática, creando sitios de membrana apical y basolateral distintos. Además de las funciones anteriores, también distribuyen componentes seleccionados de la membrana a la superficie celular y permiten la acumulación de proteínas internas de andamiaje, esenciales para establecer un vínculo con el citoesqueleto (Abbott et al. 2010).

La composición molecular de las TJP, es por proteínas de transmembrana, por proteínas de la placa citoplasmática, por proteínas de señalización y por adaptadores que unen estos complejos al citoesqueleto de actina. Las proteínas de transmembrana son los elementos que desempeñan la función de barrera/valla/cerca, ya que están constituidas por dominios transmembrana, citoplasmáticos y extracelulares (Abbott et al. 2010; Terry et al. 2010).

Se han localizado tres grupos de proteínas transmembrana en las TJP: las claudinas, las moléculas de adhesión de unión de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las proteínas MARVEL asociadas a las uniones estrechas (TAMP) (Figura 7). Las claudinas son los principales componentes de las TJP (27 miembros de esta familia en mamíferos). Estas son muy importantes y suficientes para formar cadenas de TJP en fibroblastos y que la permeabilidad paracelular aumente al interrumpirse las claudinas, lo que sugiere es que estas proteínas son esenciales para la formación de barreras. Las claudinas como las claudinas-1, -3, -5, -11, -14 y -19 actúan como proteínas de membrana de cierre de TJP,

mientras que las claudinas-2, -10, -15 y -17 participan en la formación de poros iónicos entre dos células adyacentes (Tabla 1 - Figura 7)(Amasheh et al. 2002, 2005).

En cuanto al endotelio de la BHE se ha descrito que la claudina-1, la claudina-3, la claudina-5, la claudina-11 y la claudina-12 se expresan en estas células endoteliales. Como por ejemplo: La claudina-5 posee una expresión elevada en el endotelio cerebral, es decir que la falta de claudina-5 conduce a una permeabilidad exacerbada de la BHE. La claudina-1 y la claudina-5 están asociadas con el mantenimiento de la función normal de la BHE y son importantes en la angiogénesis y en los procesos patológicos con aumento de la permeabilidad de los vasos. La claudina-3 es un componente adicional de las TJP de la BHE, que interviene en la maduración y en el mantenimiento de las TJP durante el desarrollo del ser humano, actuando como diana de la señalización de la vía Wnt/ $\beta$ -Catenina (Figura 7) (Amasheh et al. 2002)

La familia TAMP está constituida por las proteínas: ocludina, tricelulina y MARVELD3, que tienen cuatro dominios transmembrana y un dominio MARVEL (proteínas relacionadas con MAL para el tráfico de vesículas y la unión de membranas). Actualmente, se sabe que la ocludina y la tricelulina se expresan en las TJP de la BHE (Furuse et al. 1993; Steed et al. 2009; Iwamoto et al. 2013). La ocludina, la primera proteína transmembrana descubierta que se localiza exclusivamente en las TJP, está altamente expresada en las células endoteliales del SNC y desempeña un papel en la integridad de la barrera (Persidsky et al. 2006). Los altos niveles de ocludina aseguran una disminución de la permeabilidad paracelular y una alta resistencia eléctrica en las MBEC teniendo por tanto un papel activo en la función de BHE. Entonces, se sugiere que la ocludina está implicada en el movimiento del calcio a través de la BHE y en la regulación de la estabilidad de la TJP (Figura 7) (Gupta and Ryan 2010; Terry et al. 2010).

El tercer grupo de proteínas que se encuentran en la TJP de la BHE son los miembros de la familia JAM consta de JAM-1, JAM-2 y JAM-3, también denominados JAM-A, JAM-B y JAM-C, respectivamente. Estas proteínas son moléculas similares a las inmunoglobulinas (Ig), están

compuestas por un único dominio transmembrana, dos dominios Ig extracelulares y un motivo de unión PDZ en su extremo C que permite la interacción con proteínas citoplasmáticas que unen las JAM al citoesqueleto de actina. JAM-A contribuye a la integridad de la BHE, también se ha descrito que regula la migración de monocitos a través de los contactos célula-célula de la BHE. JAM-B y JAM-C se localizan en la TJP de la BHE, pero se ha descrito que JAM-B no es necesaria para la correcta función de la BHE y JAM-C no es necesaria para la integridad de unión de la BHE (Figura 7) (Ludwig et al. 2009; Mochida et al. 2010).

Las proteínas guanilato quinasa asociadas a la membrana (MAGUK) representan el principal subgrupo de proteínas de andamiaje en las TJP. Estas proteínas son estructuralmente similares en que comparten uno o más dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio de guanilato quinasa catalíticamente inactivo (GUK) y generalmente están implicadas en el establecimiento de la adhesión celular, la polaridad celular y la supervivencia celular. Las proteínas de zona ocludens (ZO) fueron las primeras proteínas de la familia MAGUK en ser identificadas, con ZO-1 y ZO-2 localizándose en TJP endoteliales, lo cual es esencial para la formación de hebras/fibras de TJP (Figura 7).

Estas proteínas (Ocludina y Claudina) actúan como reconocimiento de las TJP intramembranales organizando el complejo de unión, gracias a que su C-terminal que se une a los filamentos de actina, anclando las TJP, es decir que estas son esenciales en el funcionamiento adecuado de la barrera endotelial, baja expresión de ZO en el complejo de unión induce un aumento en la permeabilidad de la barrera (Abbott et al. 2010a; Cardoso et al. 2010; Paul et al. 2013).

#### *2.4. Proteínas de uniones adherentes de la BHE*

Antes de la formación de las TJP, las proteínas de unión adherentes (JAM) establecen contactos célula-célula, un requisito previo para la maduración y el mantenimiento de las TJP. Los JAM son generalmente necesarios para la formación de TJP, y la interacción continua entre JAM y TJP es necesaria para la organización y preservación de los complejos de unión

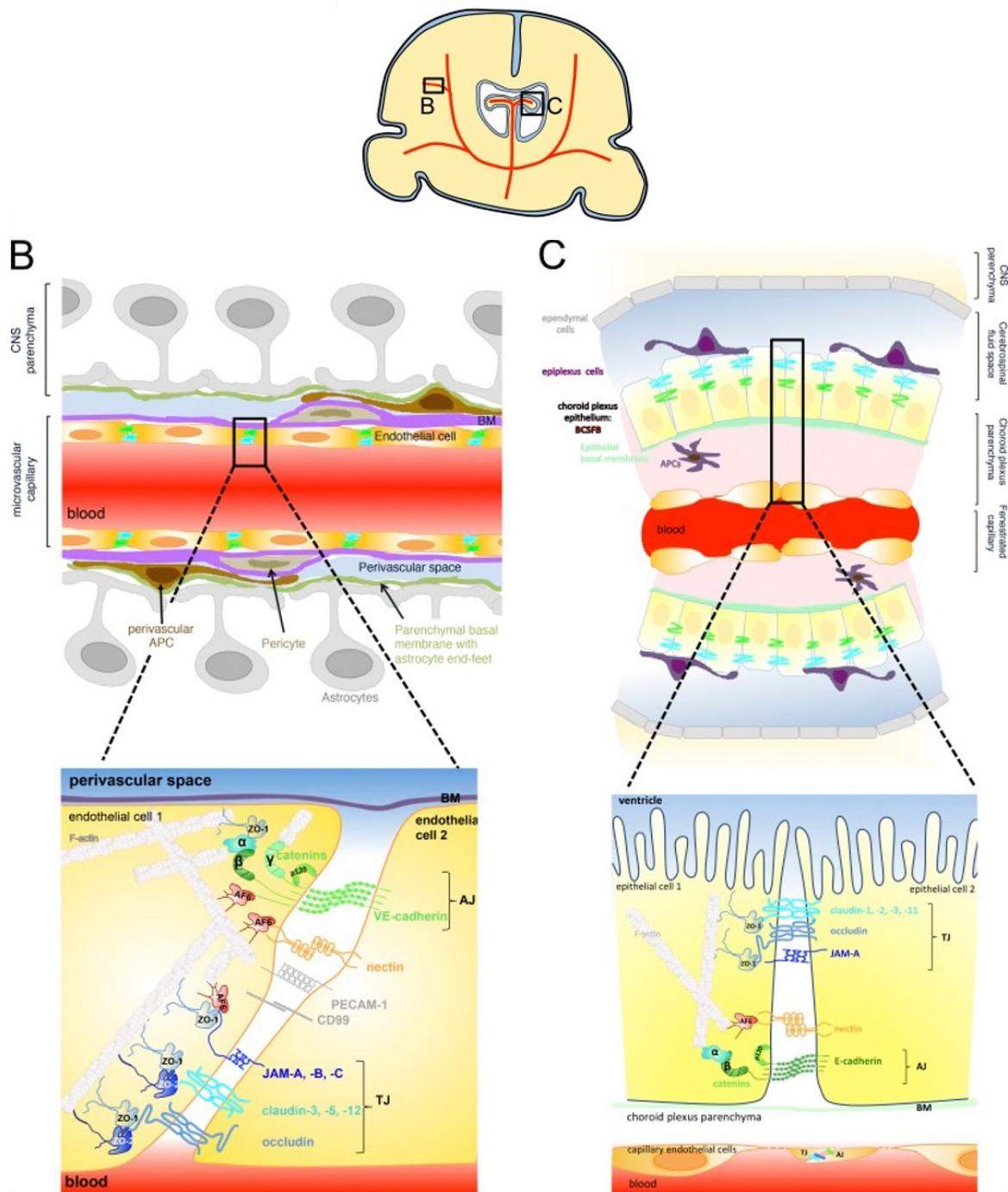
(Brown et al. 2007). La Catenina Endotelial Vascular (VE) es la principal proteína de las JAM endoteliales y está implicada en el ensamblaje de los vasos sanguíneos y en la estabilización y supervivencia endotelial (Tabla 1) (Tietz and Engelhardt 2015).

Al unirse a la  $\beta$ -Catenina, la proteína  $\alpha$ -Catenina actúa como un puente entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina, ya que se une, y se relaciona con  $\alpha$ -actinina, con ZO-1 o formina-1. Además, la VE-Cadherina promueve la expresión de claudina-5 en células endoteliales derivadas de células madre embrionarias, lo cual respalda la idea de que las JAM maduras son un requisito previo para el establecimiento de las TJP (Figura 7).

Otras moléculas que se localizan en las uniones célula-célula endotelial fuera de las JAM y las TJP organizadas, es la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria-1 (PECAM-1), esta es una proteína de transmembrana perteneciente a la superfamilia Ig. Está altamente concentrada y restringida a las uniones endoteliales, pero se encuentra fuera de los complejos TJP y JAM organizados. También desempeña un papel importante en la angiogénesis con una función mecanosensorial y está implicada en la regulación de la integridad vascular, es decir la deficiencia de PECAM-1 genera un deterioro de la integridad de la BHE (Figura 7)(Dias et al. 2019).

PROTEINAS DE UNIÓN	PROTEINAS DE UNIÓN ESTRECHA	PROTEINAS DE ADHESIÓN
VE-Cadherina	ZO-1 -2-3	VECAM
N-Cadherina	Claudina -1-3-5-11-12	PECAM
	JAM -1-2-3	ICAM
$\beta$ -Catenina	Ocludina	E-Selectina
$\alpha$ -Catenina	Tricelulina	P-Selectina
	ESAM	CD99
		CD99L

**Tabla 1:** Proteínas de unión y de adhesión expresadas en el endotelio cerebrovascular. Diseño de tabla: Diana Buitrago, Datos: Vargas-Correa, 2023.



**Figura 7:** Uniones intercelulares entre las células endoteliales microvasculares del SNC que forman la BBE y las células epiteliales del plexo coroideo que forman el BSLCR. **(A)** Localización de las barreras cerebrales en los microvasos parenquimatosos **(B)** y el plexo coroideo en los ventrículos **(C)** en una sección coronal del cerebro. Tomado de: Tietz y Engelhardt, 2015 (Tietz and Engelhardt 2015).

A continuación, se describen las moléculas, que son importantes en el proceso de unión intercelular y adhesión célula-célula y son expresadas en el endotelio cerebrovascular:

- **ZO-3 (ZO3):** Es una proteína de andamiaje de TJP que pertenecen a la familia de proteínas MAGUK (ZO-1, 2 y 3) caracterizadas por exhibir dominios PDZ, SH3 y GuK. Las proteínas ZO se asocian entre sí y con otras proteínas integrales y adaptadoras de la TJP, de la ZA y de uniones gap, así como con numerosas proteínas señalizadoras y el citoesqueleto de actina. Está bien establecido que las proteínas ZO (es un acrónimo de zónula occludens) son esenciales para el ensamblaje de claudina, ocludina y JAM-A en TJP, y luego anclan este complejo multimolecular al citoesqueleto de actina. Esta es una proteína citoplasmática asociada a la BHE (González-Mariscal et al. 2000, 2011).
- **$\beta$ -Catenina ( $\beta$ -Cat):** Es una proteína miembro de la familia de las cateninas, su localización es en el citoplasma y núcleo celular. La  $\beta$ -catenina es un componente estructural integral de las uniones adherentes basadas en cadherina y el efector nuclear clave de la señalización Wnt canónica en el núcleo también ayuda a anclar las cadherinas al citoesqueleto de actina. Interactúa con la molécula de adhesión celular E-cadherina. La  $\beta$ -catenina libre es reconocida por las moléculas clave del andamiaje Axin y APC, las cuales pueden interactuar directamente con la  $\beta$ -catenina y también entre sí (Valenta et al. 2012).
- **PECAM (platelet-endothelial cell adhesion molecule, CD31):** Es una glicoproteína de adhesión y señalización celular que comprende seis dominios de homología similares a inmunoglobulina (Ig) extracelulares, un dominio transmembrana corto y un dominio citoplasmático de 118 aminoácidos que se fosforila en serina y tirosina tras la activación celular. La expresión de PECAM-1 está restringida a las células sanguíneas y vasculares. En las plaquetas y leucocitos circulantes, PECAM-1 funciona en gran medida como un receptor de tipo inhibitorio, que a través de la fosforilación secuencial regulada de su dominio citoplasmático, limita las respuestas de activación celular (Privratsky and Newman 2014).

Esta proteína también se expresa en gran medida en las uniones intercelulares de las células endoteliales, donde funciona como un mecanosensor, como regulador del tráfico de leucocitos y en el mantenimiento de la integridad de las uniones de las células endoteliales. PECAM-1 tiene una estructura muy similar a ICAM-1 pero a diferencia de esta, solo se localiza en las uniones intercelulares (Fernandez-Borja et al. 2010; Privratsky and Newman 2014).

- VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1, CD106): Es una proteína de adhesión celular vascular, esta participa canónicamente en la adhesión y trans migración de los leucocitos. Esta proteína se encuentra altamente conservada entre especies, con un nivel de homología del 77% entre ratones, ratas y humanos, que al igual que ICAM hace parte de la superfamilia de proteínas Ig-like (Carlos and Harlan 1994; Triet M. Bui, Hannah L. Wiesolek 2014; Zhong et al. 2018; Troncoso et al. 2021).
- ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD102): Proteína de la superfamilia de las Ig y es fundamental para la detención firme y la trans migración de los leucocitos fuera de los vasos sanguíneos y hacia los tejidos. Esta proteína está presente de manera constitutiva en las células endoteliales, pero su expresión aumenta por las citocinas proinflamatorias. Puede ser expresada por leucocitos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, cuyos sitios de N-glicosilaciones, mostraron ser importantes en el proceso de unión a leucocitos (Carlos and Harlan 1994; Lawson and Wolf 2009; Troncoso et al. 2021).
- E-selectina (E-sele, CD62E): Proteína de la familia de las selectinas, estas son moléculas de adhesión vascular que median respuestas fisiológicas como la inflamación, la inmunidad y la hemostasia. Las selectinas son una familia de tres lectinas de tipo C expresadas por células derivadas de médula ósea y células endoteliales. Estas moléculas de adhesión de células vasculares se identifican como L-selectina expresada en leucocitos, E-selectina expresada en células endoteliales y P-selectina expresada en plaquetas y células endoteliales. Las tres selectinas tienen una estructura similar que consta de un

dominio de lectina amino-terminal, un dominio similar a EGF, varias repeticiones de consenso, un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático carboxi-terminal. La función fisiológica principal de todas las selectinas es mediar en el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación o a los tejidos linfoides (Bevilacqua et al. 1987; Carlos and Harlan 1994; Kansas 1996; Borsig 2018).

## 2.5. *Disfunción de la BHE*

La disfunción de la barrera hematoencefálica puede variar desde una apertura leve y transitoria de las uniones estrechas hasta la ruptura crónica de la barrera propiamente dicha y también pueden ocurrir cambios en los sistemas de transporte y en sus enzimas. Un signo temprano de inflamación del SNC es la activación de la microglía, incluso en trastornos que anteriormente no se consideraban de origen inflamatorio. En la mayoría de estos casos, no es posible determinar si el compromiso de la BHE es causal en el inicio y en la aparición de la enfermedad, pero ha ido en aumento, pues se observa que las alteraciones de la barrera contribuyen de forma significativa al desarrollo y la cronicidad de las diferentes patologías. Por tal motivo, es importante desarrollar métodos más exactos en el diagnóstico para identificar y poder localizar los sitios donde la barrera se encuentra alterada, ya que la correcta intervención de forma temprana puede reducir la progresión de la enfermedad y la discapacidad a largo plazo (Abbott et al. 2010). Actualmente existen muchas patologías del SNC y está en aumento, que implican un actor principal en la disfunción de la BHE (Tabla 2).

No está claro si los cambios y alteraciones en la BHE son la causa o el efecto de la neuropatología, y si es posible que los cambios en la BHE y la neuropatología se impulsen de manera bidireccional, que se perpetúen a sí mismos, contribuyendo a la progresión de la enfermedad (Tabla 2). La enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple (EM) y la disfunción del SNC en infecciones sistémicas son ejemplos de afecciones que son principalmente neurodegenerativas, neuroinflamatorias o sistémicas.

Patología del SNC	Disfunción BHE	Referencias
<b>Procesos infecciosos o inflamatorios</b>	Incluyen infecciones bacterianas, meningitis, encefalitis y sepsis. El LPS afecta la permeabilidad de las uniones estrechas BHE. Esto está mediado por la producción de radicales libres, IL-6 e IL-1 $\beta$ . El interferón- $\beta$ previene la interrupción de la BHE. Alteraciones en la expresión y actividad de la glicoproteína P en la BHE.	(Gaillard et al. 2003; Veldhuis et al. 2003; Roberts and Goralski 2008)
<b>Esclerosis múltiple</b>	Alteración de la BHE. Anomalías en las uniones estrechas. Regulación a la baja de laminina en la membrana basal. Pérdida selectiva de claudina-3 (mostrada con anticuerpo frente a Cl 1/3) en encefalomiелitis autoinmune experimental.	(Kermode et al. 1990; Minagar and Alexander 2003; Wolburg et al. 2003; Oki et al. 2004; McQuaid et al. 2009)
<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	Disminución del transporte de glucosa, regulación a la baja del transportador de glucosa GLUT1, niveles alterados de agrina, regulación al alza de la expresión de AQP4. Acumulación de péptido A $\beta$ , una característica neuropatológica clave de la enfermedad de Alzheimer, por niveles reducidos de expresión del transportador de glicoproteína P. Alteración de las relaciones celulares en la BHE, y cambios en la lámina basal y en el aclaramiento de péptido A $\beta$ .	(Cirrito et al. 2005; Zlokovic 2005; Bell and Zlokovic 2009; Tai et al. 2009)
<b>Enfermedad de Parkinson</b>	Disfunción de la BHE por eficacia reducida de la glicoproteína P.	(Kortekaas et al. 2005; Desai et al. 2007; Bartels et al. 2008)
<b>Epilepsia</b>	Apertura transitoria de BHE en focos epileptogénicos y expresión regulada al alza de glicoproteína P y otros transportadores de salida de fármacos en astrocitos y endotelio.	(Abbott et al. 2002; Marroni et al. 2005; Lazarowski et al. 2007)
<b>Dolor</b>	El dolor de tipo inflamatorio altera la expresión de las proteínas de unión estrecha y la permeabilidad BHE.	(Huber et al. 2001; Willis and Davis 2008)

**Tabla 2:** *Patologías del SNC que implican disfunción de la BHE. Tomado de: Abbott, 2010. (Abbott et al. 2010). Tabla modificada por: Vargas-Correa, 2023.*

## 2.6. *Enfermedad del Alzheimer*

Según la organización mundial de la salud: “Una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores alrededor del mundo entero es la demencia. La demencia es un síndrome de naturaleza crónica/progresiva, que se caracteriza por el deterioro de la función cognitiva, de una forma mayor a la que es causada por el envejecimiento normal. La demencia afecta directamente la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio, pero la conciencia no se ve afectada. La función cognitiva se ve deteriorada y es precedida por la pérdida del control emocional y pérdida del comportamiento social y/o la motivación”(OMS 2008).

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia, esta es considerada una enfermedad neurodegenerativa, lo que significa que causa pérdida/deterioro de las neuronas en el cerebro, sobre todo en la corteza y en el hipocampo. La EA es una de las enfermedades más costosas y letales del siglo XXI (Alzheimer’s Association 2018, 2019, 2021, 2022).

### 2.6.1. *Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer*

Actualmente, alrededor del mundo existen 50 millones de personas con diagnóstico de demencia de tipo Alzheimer, dentro de las cuales, el 60% son de pacientes que residen en países de ingresos bajos y medios. Se pronostica que para el 2030, el número total de personas con diagnóstico de demencia alcance los 82 millones y para el 2050 los 152 millones aproximadamente, aumentando exponencialmente (OMS 2008; Alzheimer’s Association 2022).

Solo en los Estados Unidos entre 2000 y 2017, las muertes por accidentes cerebrovasculares, enfermedad cardíaca y el cáncer de próstata disminuyeron considerablemente, mientras que las muertes reportadas por EA aumentaron drásticamente 145% (Gaugler et al. 2016; Alzheimer’s Association 2018, 2019).

Por otra parte, en México el World Alzheimer Report concluyó que, en la población de 60 años se encontró que el 61% corresponde a la incidencia estimada de 27.3 millones para el diagnóstico de EA y de estos 64% eran mujeres. También se encontró que la prevalencia de EA disminuye cuando las personas tiene mayor nivel educativo y que las enfermedades como, la hipertensión, la diabetes y la depresión son factores de riesgo para la demencia y la EA, entre otros (Sochocka et al. 2017; Lane et al. 2018). Con respecto a más factores de riesgo de la EA, se encontró que México tiene particularmente tasas altas de obesidad; entre los años 2000/2012: el sobrepeso y la obesidad aumentó de 62.3% a 71.3% de los adultos, y uno de cada tres niños se encontró con sobrepeso/obeso, siendo significativo para el aumento de la demencia. También, la diabetes está aumentando rápidamente, afectando 15.9% de los adultos actualmente, según la OCDE para el 2016, se presentó un porcentaje del 6,9%, en los países pertenecientes a esta organización (Gaur and Agnihotri 2015; Prince et al. 2016).

En Colombia en la base de datos del Sistema Integrado de Información de la Protección Social (SISPRO), entre 2009 y 2015 se atendieron un total de 252.577 casos de personas con algún tipo de diagnóstico de demencia, de los cuales, las mujeres fueron 64,1% y los hombres fueron 35,9%. La demencia no especificada (CIE10: F03X) fue el registro más frecuente, se reportaron 86,610 personas atendidas con este diagnóstico, sexo femenino con 63,1% y el sexo masculino con 36,9%, con un promedio de 12.373 personas atendidas al año (Ministerio de Salud y Protección Social MINSALUD 2017).

### *2.6.2. Signos y síntomas de la Enfermedad del Alzheimer*

Según la organización mundial de la salud: “La demencia se presenta en cada persona de forma diferente, dependiendo la enfermedad en sí misma y la presencia de factores de riesgo que tenga el paciente y de la personalidad del sujeto antes de empezar a padecerla. Los signos y síntomas se pueden entender en tres etapas para la demencia, al igual que con la enfermedad de Alzheimer” (OMS 2008).

- *Etapa temprana:* El inicio es lento y paulatino, los síntomas más frecuentes son: tendencia al olvido, pérdida de la noción del tiempo, desubicación espacial, incluso en lugares conocidos, como sus propias casas.
- *Etapa intermedia:* Los signos y síntomas se vuelven más evidentes y aparecen más limitaciones. En esta etapa las personas empiezan a olvidar acontecimientos recientes, así como los nombres de las personas. Se encuentran desubicadas en su propio hogar, tienen cada vez más dificultades para comunicarse, empiezan a necesitar ayuda con el aseo y cuidado personal, sufren cambios de comportamiento, por ejemplo, dan vueltas por la casa o repiten las mismas preguntas.
- *Etapa tardía:* Esta es la última etapa de la enfermedad, donde la dependencia y la inactividad son casi totales en la mayoría de los casos. La memoria presenta alteraciones graves y los síntomas y signos físicos en esta etapa se hacen muy notorios.

Estos síntomas incluyen: una desubicación en el tiempo y en el espacio cada vez mayor, dificultades para reconocer ya hasta tus familiares y amigos, los pacientes cada vez más necesitan ayuda para el cuidado personal, dificultad para caminar y desplazarse, alteraciones del comportamiento que pueden agravarse y finalizar en agresiones, hasta propias.

### 2.6.3. Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

La causa de la enfermedad de Alzheimer sigue siendo objeto de controversia pues no es muy específica en la mayoría de los casos, pero existen dos protagonistas muy importantes que a menudo se nombran en su desarrollo y la progresión de la enfermedad, y estos son: los ovillos neurofibrilares y las placas amiloideas o también conocidas como placas seniles.

En una neurona específicamente en la membrana celular, encontramos una molécula llamada proteína precursora amiloidea o por sus siglas APP. Un dominio de esta proteína se encuentra al interior de la célula y así mismo otro dominio está afuera de esta. La APP es muy

importante, ya que ayuda a que la neurona crezca y se regenere a sí misma, tras una lesión o daño. Pero esta proteína se desgasta y poco a poco con el pasar del tiempo se va descomponiendo y finalmente se recicla. En un individuo sano esta proteína la fragmentan unas enzimas llamadas alfa-secretasa y gamma-secretasa, enzimas importantes en la EA. Cuando esta proteína se fragmenta en normalidad, se convierte en un péptido que es soluble y posteriormente se elimina sin dejar ningún residuo o generar alguna alteración.

Pero, si es una enzima diferente la que la fragmenta o la escinde, entonces se genera una disfunción o desregulación, causando una posible vía para que se genere la enfermedad, esta enzima es la beta-secretasa, que en compañía de la gamma-secretasa, generan que el fragmento irregular y anormal no sea soluble y que no sea fácil de eliminar, por tal motivo se crea un monómero llamado péptido A $\beta$ . Estos monómeros por lo general son químicamente pegajosos, es decir que se atraen entre ellos de forma aumentada, y se unen unos con otros de manera extracelular o fuera de las neuronas y crean las llamadas placas A $\beta$ ; estas placas son acumulaciones o agregaciones de muchos e innumerables de estos monómeros (Nalivaeva and Turner 2013; Rius-Pérez et al. 2018; Sadrameli et al. 2020).

Una de las hipótesis de mayor relevancia es que estas placas pueden interponerse entre las neuronas, generando que la señalización entre ellas se entorpezca, y si las neuronas no pueden enviar señales entre ellas, ni transmitir información, y se afectarían las funciones cerebrales como la memoria, pues no se generaría sinapsis al final de todos los procesos. Estas placas pueden poner en marcha una respuesta inmunológica innata al inicio de la enfermedad y causar inflamación dañando a neuronas vecinas. Las placas A $\beta$  se pueden agregar alrededor de los vasos sanguíneos del cerebro, causando una inflamación llamada angiopatía amiloide, que debilitaría el endotelio vascular y aumentar el riesgo de ruptura y hemorragia.

El otro actor importante de la enfermedad del Alzheimer son los ovillos neurofibrilares, estos se presentarían dentro de las células (neuronas), al contrario de las placas beta-amiloide. Las neuronas están unidas por su citoesqueleto, compuesto parcialmente por microtúbulos,

estos son estructuras parecidas a vías que actúan como tal, transportando nutrientes y moléculas a lo largo de las neuronas sanas. La proteína Tau se asegura de que estos microtúbulos no se separen (Binder et al. 2005) Se cree que la acumulación de las placas de péptido beta-amiloide abre vías dentro de la neurona, lo que conlleva a la activación de la enzima cinasa, enzima que transfiere grupos de fosfato a la proteína Tau.

Posteriormente, la proteína Tau cambia su morfología y deja de formar parte del soporte de los microtúbulos, y se agrega con otras proteínas iguales y esto nos lleva al otro hallazgo característico de la enfermedad de Alzheimer que son los Ovillos neurofibrilares. Finalmente, después de esta cascada de sucesos las neuronas con ovillos neurofibrilares (interior) y placas A $\beta$  (exterior) no pueden realizar sus funciones de forma correcta y en ocasiones se genera apoptosis (Iqbal et al. 2010).

#### *2.6.4. Péptidos A $\beta$*

El componente principal de las placas seniles es el péptido A $\beta$ , producto del procesamiento proteolítico de una proteína transmembrana denominada proteína precursora del amiloide (Ishida et al. 2017; Pritchard et al. 2017). Este péptido tiene un peso molecular de 4 kDA y una secuencia proteica primaria de 42-43 aminoácidos (Rius-Pérez et al. 2018).

Las isoformas más comunes son los péptidos, son: A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, la isoforma más corta se produce debido a una alteración que ocurre en el retículo endoplasmático, mientras que la isoforma larga se altera en el área aparato de Golgi. La isoforma A $\beta$ 40 es la más común. La A $\beta$ 42 es más fibrogénica y agresiva/patógena y está asociada con el desarrollo de ciertas enfermedades, como la EA (Hartmann 1997; Sun et al. 2017).

#### *2.7. Disfunción de la BHE por la enfermedad de Alzheimer*

Mediante diferentes métodos y técnicas incluidas la tinción de tejido cerebral post mortem se ha observado aumento de la albúmina y las inmunoglobulinas en las áreas con gran carga

de placas A $\beta$ , así como un aumento de los niveles de fibrinógeno (Binder et al. 2005; Profaci et al. 2020). Se ha evidenciado que BHE con fugas o fenestraciones es un biomarcador temprano de EA (Starr et al. 2009; Montagne and Al. 2014; Van De Haar et al. 2016; Nation et al. 2019) También se reportó que la BHE con fenestraciones pequeñas relacionadas con lesiones, infecciones o envejecimiento aumentan el depósito de fibrina, dando como resultado una cascada inflamatoria, que desempeña un papel importante en la patología de la EA (Paul et al. 2007; Cortes-Canteli et al. 2010; Kumar et al. 2017; Kinney et al. 2018; Petersen et al. 2019).

Las fenestraciones inespecíficas, la disfunción del transporte de péptido A $\beta$  por la BHE puede impulsar la patología de la EA (Erickson and Banks 2013). El receptor de superficie celular LRP1 expresado en las CE, regula la eliminación de A $\beta$  del parénquima, la inactivación de este receptor aumenta los niveles de A $\beta$  soluble en el cerebro y también aumenta el déficit de aprendizaje y pérdida de memoria en un modelo de ratón de EA (Storck et al. 2016).

Un mecanismo dependiente de la proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol/glucoproteína P (PICALM/PGP) también contribuye a la eliminación de A $\beta$  a través de la BHE. PICALM regula la internalización de A $\beta$  en función de clatrina, dirigiendo la transcitosis mediada por receptores y el aclaramiento (apoptosis) de A $\beta$ , presentando potencialmente A $\beta$  a los transportadores de flujo (Zhao et al. 2016b). Por otro lado la deficiencia de PGP en un modelo de ratón con EA reduce la tasa de aclaramiento de A $\beta$  a la mitad y aumenta la deposición de A $\beta$  en el SNC, y A $\beta$ 40 desencadena la ubiquitinación y la internalización de PGP (Hartz et al. 2016), lo que sugiere un peligroso ciclo de feedback (conjunto de mecanismos de control que participan en la homeostasis).

Otro factor que podría contribuir a la disfunción de la BHE en la EA es el genotipo de la apolipoproteína  $\epsilon$  (APOE). Se observó que en los ratones transgénicos que expresan APOE4 humano, el alelo de riesgo de EA, muestran una vasculatura cerebral con una membrana basal (BM) más delgada y una disfunción BHE debido a la señalización de ciclofilina/MMP9 (metaloproteinasas de la matriz -9) en los pericitos (Bell et al. 2012; Alata et al. 2015).

La disfunción de la BHE es un marcador temprano de deterioro cognitivo independiente de la acumulación de péptido A $\beta$  y de proteína Tau (Nation et al. 2019), también se encontró que varios factores moleculares regulan la disfunción de la BHE en múltiples enfermedades, incluido el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Argaw et al. 2009, 2012), las citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (FNT-  $\alpha$ ) (Nishioku et al. 2010), las IL- 1 y 6 (Wang et al. 2014; Paré et al. 2018), especies reactivas de oxígeno (ROS) y metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs).

También hay evidencia de que la disfunción de la barrera se debe no solo a "señales de ruptura", sino también a señales de mantenimiento interrumpidas. La interrupción de la vía de señalización Wnt puede provocar permeabilidad vascular y peores resultados de la EA (Wang et al. 2012; Chang et al. 2017); esto nos puede llevar a pensar que el aumento de la señalización Wnt en las células endoteliales del SNC podría tener un potencial terapéutico.

## *2.8. Enfermedad Periodontal*

La periodontitis severa se consideran la 6<sup>a</sup> condición crónica más prevalente en el mundo. Los datos de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES) durante los años 2009/2010 y 2011/2012 mostraron que el 46 % de los adultos tenían periodontitis, y el 8,9 % padecía periodontitis crónica, y esto solo en Estado Unidos (Kassebaum et al. 2014; James et al. 2018). A nivel mundial, la periodontitis severa tiene una prevalencia del 11% y para la población mayor de 65 años, hay un riesgo de 7 veces mayor de padecer periodontitis en comparación con los adultos entre 30 y 34 años (Demmer et al. 2012; Eke et al. 2015).

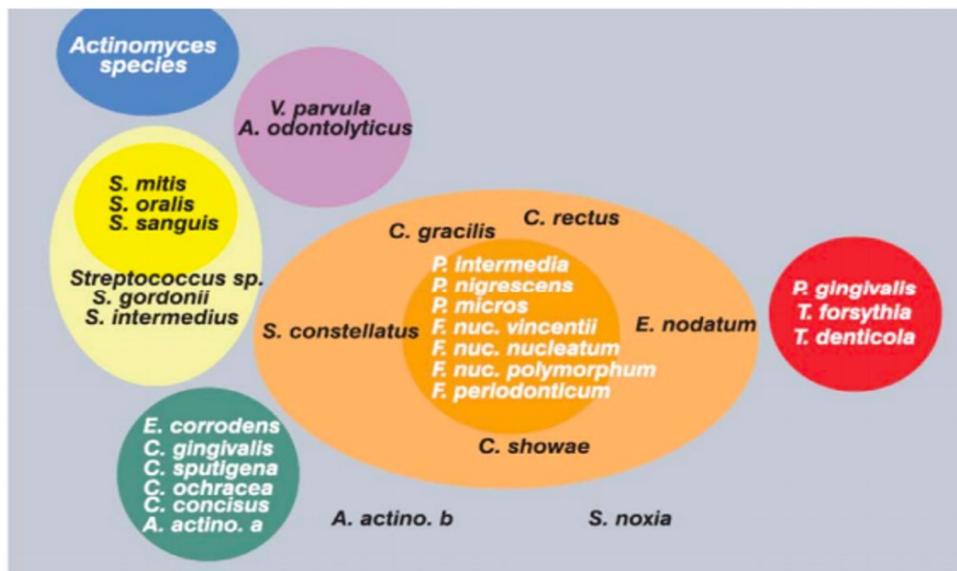
En Colombia, los datos publicados en el estudio nacional de salud bucal durante los años 2013/2014, mostraron que la mayor parte de la población Colombiana (61.8%) evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, basados en los criterios del Sistema internacional de Clasificación de la Enfermedad Periodontal y Condiciones Asociadas (Armitage 1999, 2004; Armitage GC 2000). Siendo la más frecuente la periodontitis

moderada (43.46%), seguida por con periodontitis avanzada (10.62%), en comparación con los sujetos que se clasifican como sin periodontitis (38,20%). Con respecto a la distribución por sexo, las mujeres presentan un porcentaje mayor (42.59%) en comparación con los hombres (33.59%) (ENSAB-IV 2014).

Por otro lado, en la nueva clasificación de la enfermedad periodontal según el World Workshop on Periodontal and Periimplant Diseases and Conditions del año 2017, en donde se define la enfermedad periodontal como: “Enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, asociada a biofilms de placa bacteriana disbiótica, caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte de los dientes”. Sus principales signos, son: pérdida de soporte de tejido periodontal que se manifiesta a través de la pérdida de inserción clínica (CAL) y la pérdida de hueso alveolar (evaluación radiográfica) y también con la presencia clínica de sangrado gingival, bolsas periodontales y movilidad dental, para llegar finalmente a la pérdida de las piezas dentales (Caton et al. 2018; Papapanou et al. 2018; Sanz and Tonetti 2019; Meghil and Cutler 2020).

Su alta prevalencia ha hecho que la periodontitis sea un importante problema de salud pública, porque puede provocar la pérdida de los tejidos de soporte y finalmente los dientes, afectando negativamente la función masticatoria y a la estética, siendo un marcador de desigualdad social y disminuyendo notoriamente la calidad de vida (Paraskevas et al. 2008; Herrera et al. 2018; Papapanou et al. 2018).

Las bolsas periodontales están presentes clínicamente, y en ellas se presentan más de 15 linajes bacterianos y en cada linaje habitan más de 100 géneros y 600 especies. En 1998, Socransky et, al, describieron los diferentes complejos bacterianos, en el cual, al complejo rojo pertenecen los microorganismos anaerobios más frecuentes, que están asociados a la periodontitis, entre ellos uno de los más importantes *Porphyromonas gingivalis* (Figura 8)(Ss et al. 1998).



**Figura 8:** Esquema de los complejos Bacterianos por Socransky y cols, 1998. Tomado de: Ss, 1998 (Ss et al. 1998).

### 2.8.1. *Porphyromonas gingivalis*

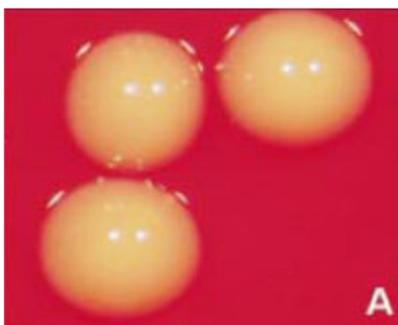
*Porphyromonas gingivalis* es un anaerobio gramnegativo asacarolítica, que mide 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  x 1 - 3.5  $\mu\text{m}$  (Figura 9). Esta especie posee una serie de factores de virulencia potenciales, como cisteína proteinasas (gingipaínas), LPS, cápsula y fimbrias, vesículas de membrana externas, hemaglutininas e inductores de metaloproteinasa de la matriz. Debido a estas características *P.gingivalis* se considera un 'patógeno oportunista', de acuerdo con los postulados de Koch modificados para infecciones orales, como las enfermedades periodontales (Bostanci and Belibasakis 2012; Mysak et al. 2014).

*Porphyromonas gingivalis* posee diferentes cepas, siendo la cepa más virulenta: la W83, por sus factores de virulencia y la respuesta que genera en el sistema de complemento del huésped. También, ataca la primera línea de defensa del organismo (inmunidad innata), invade las células epiteliales para colonizar los tejidos y seguir causando destrucción en el medio donde se desarrolla (Nie et al. 2019). Esta cepa es la más virulenta al contener más del 80% del genoma central de la bacteria pura, y por tener el 95% de actividad proteolítica en

sus proteasas se convierte en el principal patógeno periodontal para el inicio, progresión y mantenimiento de la enfermedad periodontal (Dominy et al. 2019).

Las gingipaínas, son cisteína proteasas, las cuales presentan tres genes diferentes: la lisina-gingipaína (Kgp), la arginina-gingipaína A (RgpA) y la arginina-gingipaína B (RgpB). Estas son importantes en la nutrición de *Porphyromonas gingivalis* y generan varios efectos en los sistemas del huésped, como: el descontrol y desorden de las vías de coagulación y las vías fibrinolíticas, también a la vía de calicreína/cinina la activa y altera y finalmente la modulación y desregulación de las citocinas del huésped. También estas pueden activar metaloproteinasas de matriz (MMP) y pueden romper numerosas proteínas de la superficie celular, como precursores de citocinas, factores de crecimiento, receptores de citocinas y moléculas de adhesión y unión celular, incluidas las cadherinas, lo que provoca a su vez un desprendimiento de la superficie celular (Nie et al. 2019; Singhrao and Olsen 2019).

El LPS componente importante de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, es un factor de virulencia que activa la proinflamación de forma importante y también activa los macrófagos y los neutrófilos. Por otro lado, el LPS induce la producción de péptido A $\beta$  y aumenta significativamente la producción de citocinas proinflamatorias, que a su vez activa los astrocitos/microglía en modelos de ratones (Wu et al. 2017; Kim et al. 2021).



**Figura 9:** Microfotografía de la bacteria gramnegativa: *Porphyromonas gingivalis*, observada en un microscopio estereoscópico con un objetivo de 4,5 de aumento. Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología oral, instituto UIBO, Universidad El Bosque. Tomada de: Mayorga-Fayad, 2007 (Mayorga-Fayad et al. 2007).

*Porphyromonas gingivalis* se encuentra generalmente durante infecciones gingivales y periodontales; sin embargo, también se ha descrito que se puede encontrar en niveles bajos en el 25% de los individuos sanos, es decir sin enfermedad (Hajishengallis 2011). Entonces la enfermedad periodontal, específicamente la infección por *Porphyromonas gingivalis* se identifican como factores de riesgo importantes para el desarrollo de placas A $\beta$  y la EA (Singhrao et al. 2015; Singhrao and Olsen 2019; Olsen and Singhrao 2020).

Finalmente, no es un factor de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*, pero es utilizado como un control positivo en la literatura, el lisado celular contiene principalmente la pared celular fraccionada de las bacterias que contienen fimbrias, lipopolisacáridos, cápsulas, proteasas (gingipaínas), hemaglutininas y las principales proteínas de la membrana externa, entre otras compuestos (Shimizu et al. 2017).

## 2.9. Mecanismos utilizados por las bacterias gramnegativas para atravesar la BHE

Existen muchas hipótesis asociadas a la neuroinfección por microorganismos emergentes, como *Porphyromonas gingivalis* (potente periodontopatógeno), algunos estudios han confirmado que sorprendentemente las bacterias gramnegativas que se encuentran en el sistema nervioso periférico también se han observado que pueden penetrar la BHE e infiltrarse en el SNC en pacientes con EA (MacIntyre et al. 2003; Poole et al. 2013; Emery et al. 2017; Siddiqui et al. 2019).

Existe la hipótesis de cuatro mecanismos potenciales, por los cuales las bacterias gramnegativas ingresan al cerebro penetrando y/o atravesando la BHE (Figura 10):

1. La primera hipótesis, ocurre cuando las bacterias gramnegativas interrumpen o rompen las uniones intercelulares (JAM y TJP) e inducen el desprendimiento de células endoteliales utilizando sus factores de virulencia, como sus adhesinas (proteína), sus pilis/fimbrias, lo cual les permite ingresar en la BHE a través de la vía paracelular (Figura 10).

Un ejemplo claro de esta hipótesis es cuando, la bacteria gramnegativa de *Escherichia coli* (*E. coli*) con sus factores de virulencia específicamente sus fimbrias o pilis, promueven alteraciones en la organización de las uniones estrechas, pues esta bacteria se une a los receptores de las células endoteliales de microvasculatura cerebral para desencadenar la liberación de interleuquina IL-6 e IL-8, también generar la producción de óxido nítrico (iNOS) y simultáneamente rompe las uniones estrechas entre las células endoteliales para aumentar la alteración de la BHE (Al-Obaidi and Desa 2018).

2. Esta hipótesis, se trata de la necrosis en células endoteliales, en el cual las bacterias penetran en la BHE y entran al cerebro por sus exotoxinas (hemolisina y proteasa) que generan finalmente necrosis celular (Figura 10)(Kim et al. 2021).

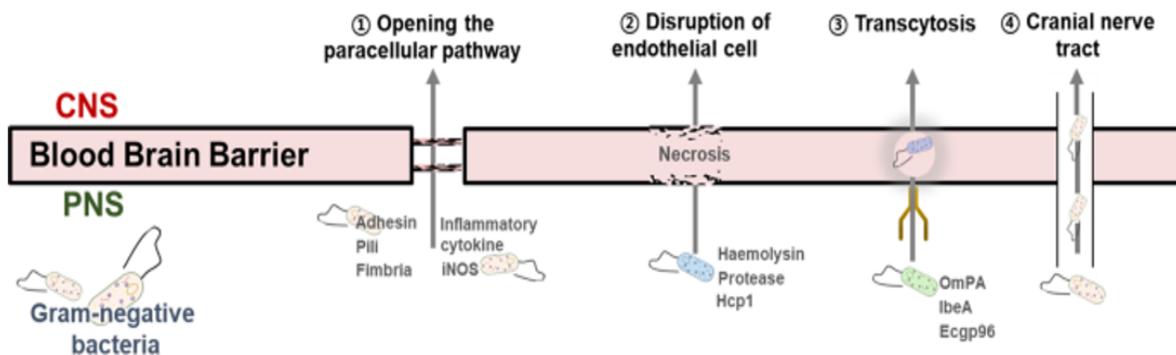
En un estudio previo, en donde se inoculo el citoplasma de células endoteliales de cerebro humano con HCP-1 (Haem carrier protein 1), componente del sistema de secreción Tipo VI de la bacteria *E.coli* (*Escherichia coli*) cepa *K1*, y sus resultados fueron que HCP-1 de *E.coli*, induce reordenamiento del citoesqueleto, necrosis/apoptosis en estas células (Sanchez Reina 2020).

3. El proceso de la transcitosis, es la siguiente hipótesis, donde las bacterias gramnegativas se infiltran en la BHE a través de interacciones entre las proteínas de la membrana externa bacteriana y las células endoteliales (Figura 10)(Kim et al. 2021).

Por ejemplo, la bacteria *E.coli* cepa *K1* promueve el proceso de transcitosis bacteriano a través del endotelio, mediante la proteína A de la membrana externa (OmpA), la proteína de invasión del endotelio cerebral (IbeA), la forma beta de los receptores endoteliales de la gp96 de choque térmico (Ecgp96) y la proteína 1 asociada a la contactina (CNTNAP1), en conclusión las bacterias gramnegativas que entran en el cerebro por transcitosis pueden sobrevivir y proliferar reduciendo y/o escapando de la respuesta inmunitaria del huésped (Mittal and Prasadarao 2010; Zhou et al. 2012).

4. Finalmente, la última hipótesis se trata del ingreso bacteriano a través de los nervios craneales al SNC (Figura 10). Las vías principales para que las bacterias orales ingresen al cerebro, son los Nervios Trigéminos y el Nervio Olfatorio, capaces de afectar el SNC a través de estos tractos neurales (Kristensson 2011).

Algunos estudios demostraron que las bacterias orales, en ratones de tipo BALB/c con EA, migran al cerebro a una frecuencia muy alta a través del nervio craneal, encontrando ADN de *Porphyromonas gingivalis* en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (Poole et al. 2017; Dominy et al. 2019). Otro estudio encontró que *H.pylori* (bacteria gramnegativa) puede ingresar al SNC a través de la vía oral-nasal-olfatoria o la vía neural del tracto gastrointestinal-cerebro (Doulberis et al. 2018).



**Figura 10:** Esquema de los posibles mecanismos de penetración/entrada de bacterias gramnegativas al sistema nervioso central. Tomado de: Kim, 2021 (Kim et al. 2021).

### 2.10. Disfunción de la BHE por microorganismos como *Porphyromonas gingivalis*

El vínculo causal potencial entre la periodontitis y el deterioro cognitivo en pacientes con EA aumenta aún más con los recientes estudios experimentales en animales que establecen mecanismos biológicamente plausibles y clínicamente consistentes por los cuales la periodontitis podría agravar la EA (Ide et al. 2016; Holmer et al. 2018).

Estudios con animales (larvas de pez cebra) a los cuales se les infecto con *P. gingivalis* (gingipaínas), este periodontopatógeno indujo edema al aumentar la permeabilidad vascular, lo que se atribuyó a la degradación de la molécula de adhesión PECAM1 y la VE-cadherina que alteran la BHE. También en relación con este resultado se observó que las células endoteliales humanas infectadas por *P. gingivalis* mostraron una expresión reducida en la superficie celular de PECAM1 y VE-cadherina, uniones intercelulares interrumpidas y una permeabilidad elevada de las células endoteliales (Farrugia et al. 2021).

Se ha observado que *P. gingivalis* y/o sus factores de virulencia, incluidos LPS y gingipaínas, pueden acceder al cerebro de paciente con EA a través de la BHE, lo que lleva a la inducción de daño neurológico a través de sus efectos neurotóxicos y/o inducción de neuroinflamación (Dominy et al. 2019).

### 2.11. Neuroinflamación de la BHE

La neuroinflamación generalmente se acompaña con el deterioro de la función de BHE y de BSLCR, y esto incluye alteraciones en sus complejos proteicos de unión y adhesión. Ejemplo, en la displasia vascular o malformación cavernosa cerebral (CCM), las mutaciones de pérdida de función en CCM-1, CCM-2 o CCM-3, que se localizan en AJ, afectan principalmente a los vasos cerebrales. Los CCM forman un complejo tripartito que se asocia con  $\beta$ -catenina y afadin (AFDN: proteína que regula la adhesión de célula-célula después de la activación de Ras) en AJ. Al regular la pequeña GTPasa Rap-1 (CCM-1) y la vía Rho GTPasa (CCM-2), contribuyen a la estabilización de la unión y la polaridad de las células endoteliales (Weiss et al. 2009; Dejana and Orsenigo 2013).

Las mutaciones en las proteínas CCM conducen a la transición endotelial-mesenquimatosa, que se caracteriza por la pérdida de las proteínas de cadherina VE, la expresión regulada al alza de proteínas cadherina N y la consiguiente pérdida de la polaridad de las células endoteliales (Maddaluno et al. 2013). Es decir, aunque los genes CCM están mutados en las células endoteliales de todas las barreras en todo el cuerpo, la función de barrera de las

células endoteliales del cerebro parece depender de manera más crítica de las propiedades adhesivas de la cadherina VE para estabilizar la polaridad celular.

La interrupción de la función BHE y BSLCR también contribuye a trastornos neurológicos como el accidente cerebrovascular o la esclerosis múltiple (EM) y su modelo animal de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EM es una enfermedad desmielinizante en la que las células inmunitarias cruzan la BHE y BSLCR causan inflamación del SNC, formación de edema y disfunción de la barrera cerebral; de hecho, la formación temprana de lesiones en la EM se asocia con una disfunción local de la BHE. Mediante la técnica de inmunofluorescencia en cerebro post mortem de pacientes con EM se ha demostrado la distribución anormal de las proteínas TJP ocludina, JAM-A y ZO-1, a excepción de la proteína JAM  $\beta$ -catenina se correlaciona con el escape perivascular de proteínas séricas en lesiones activas de EM (Furuse et al. 1993). Por lo tanto, se confirma que la interrupción de las TJP contribuyen en la disfunción de BHE en pacientes con EM.

Por otro lado, la EAE es un trastorno que se caracteriza por la formación de lesiones en el SNC, el deterioro motor y esta enfermedad es impulsada por las reacciones autoinmunes e inflamatorias que se generan. Algunos estudios han demostrado que la infiltración de células inmunitarias en el SNC durante la EAE podría adicionarse a la patología de la TJP de la BHE, ya que en el modelo de EAE se evidencia pérdida selectiva de la proteína claudina-3/claudina-5 en microvasos cerebrales y microvasos de la médula espinal, que se han encontrado rodeados de infiltrados inflamatorios (Wolburg et al. 2003; Paul et al. 2013). Entonces esto sugieren que la pérdida de proteínas de unión estrechas es un factor obligatorio para el deterioro de la función de la BHE en los trastornos neurológicos de EM y EAE.

En células endoteliales cerebrales (*in vitro*) han confirmado que la capacidad del ácido retinoico (AR) puede aumentar las características de la barrera, incluyendo el aumento de la expresión de las proteínas JAM y TJP (Mizee et al. 2013, 2014). Finalmente, la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  se regula positivamente en el SNC durante la neuroinflamación y

contribuye a la disfunción de la barrera cerebral (Beard et al. 2014; Tietz and Engelhardt 2015).

Así mismo las células endoteliales de la BHE responden a estímulos inflamatorios como las citocinas, el LPS, el péptido A $\beta$  y fragmentos de la proteína Tau, mediante la activación de las vías de señalización dando como resultado la regulación positiva de los segundos mensajeros proinflamatorios y las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, lo que en última instancia provoca la interrupción de la BHE y la activación paracrina de las células circundantes que responden a dichos estímulos, como los astrocitos y los pericitos de la UNV (Verma et al. 2006, 2023; Gonzalez-Velasquez et al. 2008; Pan et al. 2011; Eikelenboom et al. 2012).

La inflamación dificulta la eliminación sistémica de péptidos A $\beta$  por el hígado y los riñones, así como el flujo masivo de líquido cefalorraquídeo. Además, se producen cambios en el transporte de la BHE en respuesta a la inflamación y al estrés oxidativo que pueden generar y promover la acumulación de péptido A $\beta$  de forma local, es decir en el cerebro (Sagare et al. 2007, 2012; Owen et al. 2010; Erickson et al. 2012; Erickson and Banks 2013).

En la EA se ha observado un mayor daño oxidativo de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP-1) en el SNC y en la circulación. En el modelo de EA con ratones que carece del antioxidante de vitamina E, el eflujo cerebral (se trata de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, a esto se le denomina de eflujo o bombas de expulsión activa) dependiente de LRP-1 y la eliminación sistémica de péptidos A $\beta$  están alterados (Jaeger et al. 2009; Nishida et al. 2009; Erickson et al. 2012). Tanto la LRP-1 como la glucoproteína P (Pgp) están funcionalmente reguladas a la baja en la BHE en ratones con inflamación sistémica inducida por el LPS, lo que se corresponde con una alteración del flujo de péptidos A $\beta$  (Erickson et al. 2012).

Las influencias patológicas de la inflamación y el estrés oxidativo en la EA pueden no estar limitadas al compartimento del SNC, sino que también pueden surgir de interacciones de factores circulantes con la BHE. Aunque en la actualidad es un tema relativamente nuevo

y por ende es inexplorado, es probable que estas interacciones sean muy relevantes en una variedad de condiciones que pueden predisponer a un individuo a la EA (Tabla 3.)

Disfunción de BHE		Causas iniciales	Consecuencias
Ruptura		Oligómeros A $\beta$ , Tau truncado, inflamación, estrés oxidativo, diabetes, alelo ApoE4, TBI, enfermedad vascular.	Evasión/fuga de componentes séricos al SNC, neurotoxicidad, activación inflamatoria
Transporte alterado	de A $\beta$	↓LRP-1	Oligómeros A $\beta$ , inflamación, estrés oxidativo, diabetes. Acumulación de A $\beta$ en el SNC.
		↓Pgp	Oligómeros A $\beta$ , inflamación, TBI. Acumulación de A $\beta$ en el SNC, transporte xenobiótico alterado.
		↑RAGE	Oligómeros A $\beta$ , diabetes, inflamación, estrés oxidativo. Acumulación de A $\beta$ en el SNC, inflamación vascular.
Secreción alterada	de glucosa	↓GLUT-1	Oligómeros A $\beta$ , alelo ApoE4. Privación de energía, disfunción neuronal.
	de trombina		Estrés oxidativo, isquemia. Neurotoxicidad, interrupción de BHE.
	de VEGF		Estrés oxidativo, isquemia. Neurotoxicidad, alteración de la BHE, angiogénesis.

**Tabla 3:** Posibles causas y consecuencias de la disfunción BHE en la EA. Tomado de: Erickson y Banks, 2023 (Erickson and Banks 2013). Tabla modificada por: Ana María Vargas Correa.

## 2.12. Neurodegeneración de la BHE y patologías asociadas

Actualmente existen muchas hipótesis donde se indica que la disfunción cerebrovascular en la EA no puede atribuirse solamente a la demencia vascular (daño cerebral ocasionado por múltiples derrames cerebrales, que provoca la pérdida de la memoria en los adultos de edad avanzada). En un estudio de la asociación entre enfermedad cerebrovascular y las enfermedades neurodegenerativas, en el cual se utilizó la base de datos del Centro Nacional de Coordinación de Alzheimer (CENNA) de USA para identificar 5715 pacientes con diagnóstico por autopsia de por lo menos una sola enfermedad neurodegenerativa, como: EA, degeneración del lóbulo frontotemporal,  $\alpha$ -sinucleinopatía, esclerosis del hipocampo, enfermedad priónica y enfermedad cerebrovascular.

Dentro de este grupo de pacientes, se dividió en grupos más pequeños con interés y relevancia, por ejemplo: el subgrupo de 4.629 pacientes diagnosticados de EA sin demencia mixta, el subgrupo del 80 % que tenía patología vascular que incluía enfermedad cerebrovascular, lagunas y múltiples microinfartos indicativos de enfermedad de vasos pequeños, hemorragias, aterosclerosis, arteriosclerosis y angiopatía amiloide cerebral (AAC). Los subgrupos de pacientes con diagnóstico de EA y de enfermedad cerebrovascular se observó una prevalencia similar de factores de riesgo vascular, como: la enfermedad coronaria, la hipercolesterolemia y la diabetes (Toledo et al. 2013).

La AAC que es una causa importante de la interrupción de la BHE y una de las tres características patológicas de la EA. Además, en la EA los cambios en los biomarcadores vasculares se presentan antes del deterioro cognitivo y de los aumentos detectables de biomarcadores, como: el depósito de péptido amiloide, los niveles de tau y tau fosforilada en el LCR (Iturria-Medina et al. 2016). La enfermedad de vasos pequeños del cerebro es destacada en los pacientes con EA, contribuye al 50 % de todas las demencias en todo el mundo (Iadecola 2013; Wardlaw et al. 2013).

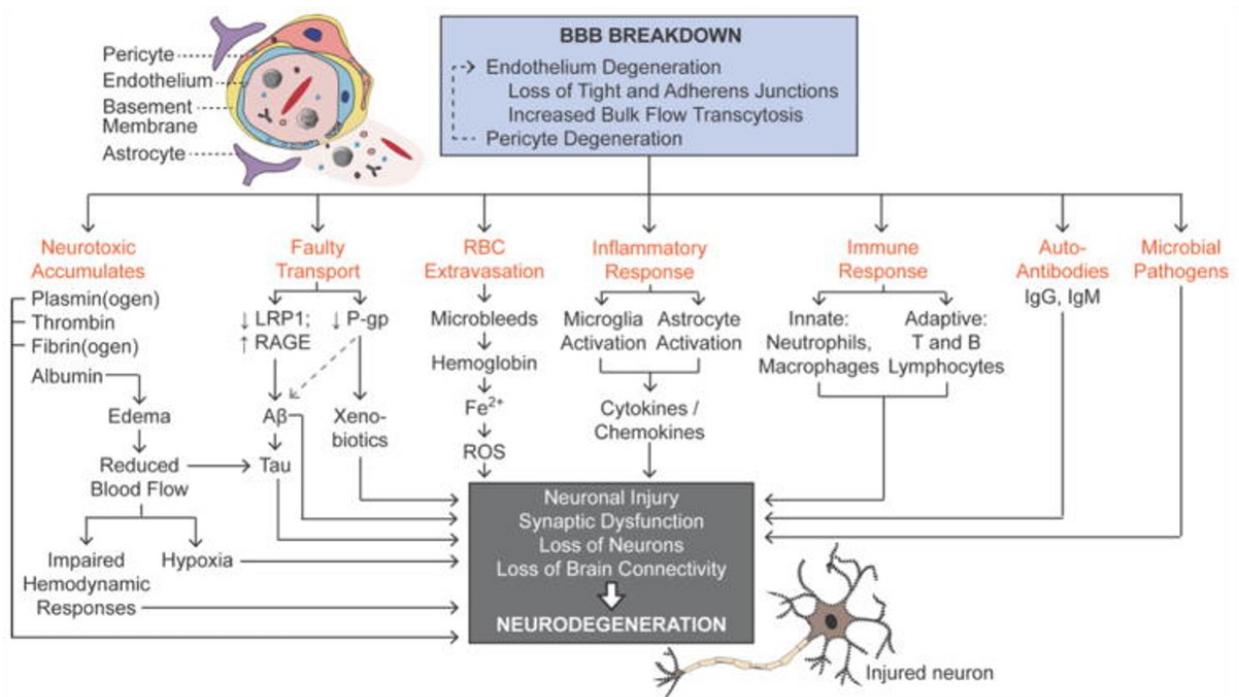
Un referente importante es la hipótesis de los dos golpes de la EA, el daño de los vasos sanguíneos es el paso inicial, lo que provoca daño de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro y a su vez disfunción de la BHE, disminuyendo así la perfusión cerebral que, a su vez, conduce a la lesión neuronal, apoptosis de las neuronas y a la producción y la acumulación de péptido A $\beta$  y la hiperfosforilación de la proteína Tau en el cerebro (Moh et al. 2011; Zlokovic 2014; Sweeney et al. 2015; Zhao et al. 2016a; Nelson et al. 2017).

Las alteraciones cerebrovasculares están influenciadas por el estilo de vida, este podría actuar de forma independiente y/o sinérgica con la producción de péptido A $\beta$  para promover la EA, que aumenta por más factores de riesgo genéticos, como portar el alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (APOE\* $\epsilon 4$ ), factores de riesgo vascular (como como hipertensión, diabetes y dislipemia) y factores de riesgo ambientales (como la contaminación y posiblemente el cigarrillo). Entonces la enfermedad vascular y los factores de riesgo vasculares empeoran y aumentan la disfunción motora y el deterioro cognitivo en la EA (Sweeney et al. 2015; Nelson et al. 2017).

Se ha observado reducciones significativas en la longitud de los capilares y esto sugiere degeneración endotelial, disminución en la expresión proteínas de unión estrecha y proteínas adherentes, cambios en la membrana basal de los capilares en el tejido cerebral de pacientes con EA (Salloway et al. 2002; Sengillo et al. 2013; Zlokovic 2014; Halliday et al. 2016). Los cambios anteriores podrían reflejar una angiogénesis cerebral aberrante (ciclo repetitivo), causada por la baja o disminuida expresión de la proteína MEOX2 en las células endoteliales del cerebro (un regulador de la diferenciación vascular en la EA). Con respecto a los pericitos, estos mantienen un endotelio saludable pero también pueden faltar en el cerebro con EA, lo que podría contribuir potencialmente a la degeneración endotelial (Bell et al. 2011).

La degradación de BHE se caracteriza por la degeneración de pericitos y de las células endoteliales, con la pérdida de uniones estrechas y uniones adherentes y aumento de la

transcitosis de flujo masivo. La descomposición de BHE conduce a la entrada de patógenos microbianos, acumulación de material neurotóxico, transporte defectuoso de BHE, extravasación de glóbulos rojos y liberación de hierro libre neurotóxico ( $Fe^{2+}$ ), que genera especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo. Las respuestas inflamatorias e inmunitarias conducen a la generación de autoanticuerpos (Figura 11)(Sweeney et al. 2015; Custodia et al. 2022).



**Figura 11:** La disfunción de la BHE promueve la Neurodegeneración. Tomado de: Sweeney, 2015 (Sweeney et al. 2015).

### 3. Planteamiento del problema

La esperanza de vida ha aumentado de forma significativa en las últimas décadas y esto también ha hecho que aumente de forma exponencial el número de personas con diagnóstico de demencia en especial el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (Norton et al. 2014).

Actualmente las proyecciones epidemiológicas nos indican que el número de personas con diagnóstico de EA llegara a los 152 millones aproximadamente para el año 2050 alrededor del mundo. Por lo anterior y pese a los esfuerzos que actualmente están haciendo los investigadores y clínicos para encontrar o crear un fármaco que ayude en el tratamiento de la EA, siendo infructuoso hasta el momento, por esta razón existe gran interés científico en identificar los factores de riesgo que puedan ser modificables e influyan directamente en la EA, todo esto para poder de desarrollar tratamientos preventivos o paulatinos que puedan limitar la prevalencia, disminuir la morbilidad y mejorar la calidad de vida de las personas con EA (OMS 2008; Barnes and Yaffe 2011; Teixeira et al. 2017; Pazos et al. 2018; Alzheimer's Association 2022; Rajan et al. 2022).

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo con características clínicas típicas crónicas que incluyen principalmente el deterioro de la memoria de tipo amnésico, el deterioro del lenguaje y el déficit visoespaciales. Las características neuropatológicas principales e importantes de la EA son la degeneración neuronal, la pérdida de sinapsis, los ovillos neurofibrilares, la gliosis y la acumulación de A $\beta$  en las placas.

Dentro de los factores de riesgo representativos y principales de la EA tenemos la relación directa con la enfermedad periodontal, vinculo que hoy en día está siendo muy estudiado. Los pacientes con diagnóstico de EA presentan un mayor riesgo de perder dientes y de tener edentulismo en comparación con pacientes sanos (Dioguardi et al. 2019). Igualmente, esta población con diagnóstico de demencia, específicamente enfermedad de Alzheimer tiene más probabilidad de ser diagnosticados con periodontitis crónica/severa pero lastimosamente de forma tardía (Choi et al. 2019). Algunas hipótesis sobre la infección e inflamación periférica

han determinado que estas pueden no solo contribuir a la fisiopatogenia de la EA, sino también, ser un determinante clave en la progresión y cronicidad (Cunningham and Hennessy 2015). En muy pocos estudios se ha observado a ratones infectados con bacterias gramnegativas asociada a la enfermedad periodontal, como *Porphyromonas gingivalis* potente periodontopatógeno, y se ha confirmado la aparición de este patógeno en sus cerebros (Poole et al. 2017).

*Porphyromonas gingivalis* puede permanecer en el cerebro en pequeñas proporciones durante muchos años y contribuir a la permanencia de la inflamación cerebral, esto con el fin de garantizar su supervivencia (Singhrao et al. 2015). Por otro lado, este periodontopatógeno parece ser protagonista en la disbiosis del microambiente subgingival y permitir el sobrecrecimiento de otros patógenos orales como los Treponemas, que también están siendo asociados con la EA y que pueden llegar al cerebro a través de diferentes mecanismos como las ramas del nervio trigémino, pues se han encontrado en cerebros de pacientes con diagnóstico de EA (Riviere et al. 2002; Poole et al. 2017; Ilievski et al. 2018).

Por otra parte, varios estudios han indicado que la disfunción neurovascular contribuye a la aparición y progresión de la EA y proponen un vínculo entre los cambios cerebrovasculares y la neurodegeneración. Datos recientes confirman que el deterioro dependiente de la edad de la BHE se da durante el envejecimiento normal en el hipocampo humano, una región que está involucrada en el aprendizaje y la memoria, pero se ha encontrado de forma significativa una degradación más acelerada en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) en comparación con la edad, y esto siendo más representativo y visible en los pacientes con diagnóstico de EA (Kalaria 1992, 2000; Farkas and Luiten 2001; De La Torre 2004; Viswanathan and Greenberg 2008; Bell et al. 2011; Sagare et al. 2012; Montagne and Al. 2014).

Cabe resaltar que los protagonistas de la EA, tanto la proteína Tau como el péptido A $\beta$  pueden promover la pérdida de la integridad de la BHE, lo que exacerba el proceso neurodegenerativo y las respuestas inflamatorias asociadas en el cerebro. Otro estudio,

reporto que los neutrófilos circulantes, que migran en el cerebro y se acumulan en el SNC de ratones transgénicos con EA, también pueden contribuir a la disfunción vascular al adherirse y diseminarse en el endotelio cerebral y liberar mediadores inflamatorios y trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)(Zenaro et al. 2015).

La neuroinflamación y la EA están asociados fuertemente, la neuroinflamación puede complicarse o exacerbarse con la inflamación sistémica (Fu et al. 2014). El microambiente homeostático de la BHE se cree que puede estar alterado por las citocinas proinflamatoria y otros marcadores sistémicos de inflamación derivados de la Periodontitis, alterando específicamente las células endoteliales de microvasculatura del cerebro (Kamer et al. 2008; Straka and Trapezanlidis 2013). Uno de los factores de virulencia más importante de *Porphyromonas gingivalis* es el LPS, se cree que este puede desencadenar una respuesta inflamatoria tardía en algunos casos, porque genera tolerancia y esto podría aumentar la expresión de las citocinas que causan lesiones graves e irreversibles en el SNC (McManus and Heneka 2017), el LPS también inducen una sobre expresión de los niveles de IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 en la microvasculatura, que genera una disminución de expresión en las proteínas estrechas de unión y de adhesión en la BHE. La respuesta hiperinflamatoria es un factor común que se presenta en la enfermedad periodontal y en el EA, qué nos da como resultado la producción de péptidos beta amiloides que favorecen la formación de placas beta-amiloides lo que puede modificar o alterar la fisiopatología de la EA (Olsen et al. 2016).

El principal objetivo de los procesos de infección y neurodegeneración por los microorganismos y sus endotoxinas, son las células endoteliales de microvasculatura, pues ellas contribuyen a la formación de la BHE, el mantenimiento y la homeostasis del microambiente cerebral.

Los periodontopatógenos como en este caso *Porphyromonas gingivalis*, han sido estudiados por sus efectos significativos sobre la respuesta inflamatoria en células endoteliales de otras partes del cuerpo como, en: células de arteria coronaria humana y también células de cordón umbilical, en las cuales se ha observado que generan una activación endotelial por la

producción de citoquinas (IL-8) , quimiocinas (MCP-1), la sobre expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) y la activación de receptores tipo TLR-2 (Nakamura et al. 2008; Renvert et al. 2010; Ho et al. 2016).

Como antecedente fundamental e influyente fueron los resultados del trabajo de grado que lleva por título: Efecto de *Porphyromonas gingivalis* sobre la regulación de ciclo neuronal y producción de péptidos A $\beta$  en células neuronales SHSY5Y, en la cual se observaron efectos biológica y estadísticamente significativos de *P. gingivalis* cepa W83 sobre el ciclo neuronal y producción de péptidos A $\beta$  en células neuronales (SHSY5Y)(Vargas 2022).

Finalmente, es clara la necesidad que existe sobre el interés de la respuesta inflamatoria y funcional de las células MBEC y también la producción y acumulación de A $\beta$  frente a la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS, que nos permita aportar o identificar los mecanismos que este microorganismo induce sobre la progresión, cronicidad y el establecimiento de la EA, a su vez abriendo una ventana de posibilidades terapéuticas en una patología que no tiene cura y que hoy por hoy aumenta exponencialmente, con el fin de mejorar la calidad de vida de las personas que tienen estos diagnósticos.

Por tal motivo, surge la pregunta de investigación: ¿La bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* y el LPS produce cambios sobre la respuesta proinflamatoria y la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón?

#### 4. Justificación

La periodontitis es una enfermedad infecciosa disbiótica que conduce a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes y es más prevalente en adultos mayores (Richards 2020; Hao et al. 2022). Para el año 2010, se informó que 3900 millones de personas alrededor del mundo tenían enfermedad periodontal, con una prevalencia de periodontitis leve del 35 % y periodontitis de moderada a severa del 11 % (Bui et al. 2019; Richards 2020).

Por otro lado, las infecciones del SNC y sistema nervioso periférico (SNP) en la actualidad son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Kim KS 2015). Este grupo de enfermedades se les denominan trastornos neurológicos, es decir enfermedades que afectan el cerebro, la medula espinal, los nervios craneales y periféricos, las raíces nerviosas, el sistema nervioso autónomo y la placa neuromuscular, dentro de ellos se encuentran las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (siendo la más prevalente), Parkinson, enfermedades cerebrovasculares, traumatismos craneoencefálicos e infecciones neurológicas, la epilepsia y otros tipos de demencias (Buitrago Ramírez et al. 2018). Aunque algunas de estas enfermedades neuroinfecciosas se han erradicado por completo en el transcurso de la historia, a su vez han aparecido por lo menos 30 nuevas enfermedades infecciosas que han sido reconocidas científicamente a nivel mundial en los últimos años y que están siendo de alto interés a nivel mundial (OMS 2008; Tohidpour et al. 2017; Huang 2021; Scheltens et al. 2022).

Según la organización mundial de la salud y la organización de internacional del Alzheimer: “La demencia afecta a nivel mundial a unos 50 millones de personas actualmente, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos bajos y medios. También se ha reportado que las infecciones neurológicas son consideradas la sexta causa de atención primaria y la cuarta causa en prevalencia a nivel mundial” (OMS 2008). Según otros estudios, en el 2019, la enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencias se clasificaron como la séptima causa principal de muerte en todo el mundo y afectaron de manera desproporcionada más a las mujeres (65% muertes) y a pacientes de edad avanzada

(Abbaya et al. 2015). Se estima que 6,2 millones de estadounidenses mayores de 65 años tuvieron un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer para el 2021 y se espera que esta tendencia aumente aún más en las próximas décadas, hasta aproximadamente 13,85 millones de estadounidenses con este diagnóstico para 2060 (Alzheimer's Association 2021; Rajan et al. 2022).

Existen muchas hipótesis asociadas a la neuroinfección por microorganismos emergentes, como: *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Citomegalovirus* y *Porphyromonas gingivalis*, este último patógeno altamente asociado a la enfermedad periodontal. Todos estos microorganismos están siendo evaluados con un gran interés por tener un efecto significativo en el desarrollo patológico de enfermedades a nivel del sistema nervioso central, y estas enfermedades pueden conllevar a una morbimortalidad mayor en la población actualmente (Tohidpour et al. 2017). Dentro de estas asociaciones emergentes que se han visto relacionadas a daño endotelial, BHE y neuroinflamación encontrando el enlace entre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad periodontal, siendo unos de los protagonistas más importantes, la bacteria gramnegativa: *Porphyromonas gingivalis*, que ha sido estudiada específicamente con sus factores de virulencia el lipopolisacárido (LPS) y las gingipainas (Straka and Trapezanlidis 2013; Kim et al. 2021).

Durante la inflamación, la regulación positiva de las citoquinas proinflamatorias puede conducir al reclutamiento de leucocitos que amplifican la respuesta inflamatoria. Además, la pérdida ósea y la destrucción del tejido en cavidad oral resultarán de la regulación positiva de RANKL y la producción exacerbada de MMP, respectivamente. *Porphyromonas gingivalis* y los mediadores inflamatorios, pueden translocarse fácilmente al cerebro, por medio del epitelio surcular que está ulcerado y pasar rápidamente a la circulación periférica (Wang et al. 2019). De esta translocación se tiene las siguientes hipótesis: Invasión de las células endoteliales de microvasculatura y de monocitos permitiendo el paso de la barrera hematoencefálica; a través de moléculas (citoquinas) solubles en sangre que pueden pasar fácilmente la barrera; liberación de endotoxinas localmente, que aumenta la proinflamación. Finalmente, el resultado es la liberación exacerbada de citoquinas proinflamatorias que

promueven la posterior invasión de las células inmunes periféricas al estimular la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, y esto conduce a un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, que genera daños irreversibles (Huang and Mucke 2012; Hauser et al. 2017; Kinney et al. 2018; Sadrameli et al. 2020; Farrugia et al. 2021).

Esta barrera hematoencefálica, es la barrera más selectiva y estrictamente controlada de todas las barreras que existen en el cuerpo humano, la BHE tiene 4 funciones principales: separar y proteger al cerebro de compuestos circulantes potencialmente dañinos o tóxicos, transportar en forma selectiva y ordenada compuestos o sustancias necesarias para el cerebro, detecta o ubica alteraciones en la sangre y comunica estos al cerebro y metabolizar sustancias presentes en el cerebro y en la sangre (Erickson and Banks 2013; Zhao et al. 2016).

Para que esta barrera esté de forma sólida sin cambios estructurales o físicos, juegan un papel importante las células endoteliales del SNC, estas tienen propiedades distintas de las células endoteliales en otros tejidos del cuerpo, como: la presencia de proteínas especializadas transportadoras y receptoras específicas que controlan la entrada y salida de metabolitos a través de las células y también de uniones estrechas de alta resistencia dentro de ellas, estas proteínas son: proteínas de unión: VE-Cadherina y  $\beta$ -Catenina, proteínas de unión estrechas: ZO-1, ZO-3, Claudina, Ocludina y Proteínas de adhesión: VECAM, PECAM, ICAM y E-Selectina. También esta barrera es la única que presenta ausencia de fenestras (pequeños poros que permiten el paso rápido de moléculas) (Wolburg et al. 2003; Padden et al. 2007; Dejana and Orsenigo 2013).

Por otro lado, sabemos que estos microorganismos gramnegativos, en este caso *Porphyromonas gingivalis* pueden desencadenar una respuesta proinflamatoria que aumenta de manera progresiva la producción de algunas citoquinas y la expresión de IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 en la microvasculatura endotelial produciendo alteraciones en las proteínas de unión y adhesión de la barrera hematoencefálica. Así mismo esta hiperneuroinflamación puede

generar la activación de la microglía y del inflamasoma, la activación del sistema de complemento y alterar el ciclo celular (viabilidad y metabolismo), produciendo una apoptosis o muerte neuronal, y esta muerte aumenta la producción de placas beta amiloides y ovillos neurofibrilares que son característicos de la enfermedad de Alzheimer (Mawanda and Wallace 2013; Abbayya et al. 2015; McManus and Heneka 2017; Teixeira et al. 2017; Dominy et al. 2019; Haditsch et al. 2020).

Finalmente, es importante resaltar que a la fecha existen muy pocos estudios de modelos *in vitro* que permitan demostrar que la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, el LPS y el LC produce disfunción endotelial alterando las células de microvasculatura de cerebro (MBEC) y que se debe a que se desencadena una cascada de respuestas y procesos en el huésped, dentro de las que se encuentran procesos de neuroinflamación, de neurodegeneración y finalmente disfunción cognitiva, que tienen como resultado final la progresión y el establecimiento de la enfermedad de Alzheimer (Custodia et al. 2022; Nonaka et al. 2022; Pritchard et al. 2022).

El antecedente de mayor importancia a considerar son los resultados de la investigación que lleva por título: Efecto de *Porphyromonas gingivalis* sobre la regulación de ciclo neuronal y producción de péptidos A $\beta$  en células neuronales SHSY5Y, en la cual se observó los efectos de bacteria completa de *P. gingivalis* cepa W83 sobre la viabilidad/metabolismo celular, el porcentaje de muerte celular, la alteración del ciclo celular neuronal, la apoptosis temprana o tardía y la producción de péptidos A $\beta$  en células neuronales (SHSY5Y)(Vargas 2022), generando un mayor interés y por lo cual, este trabajo tiene como objetivo general evaluar el efecto de la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS sobre la respuesta proinflamatoria y la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón.

## 5. Situación actual

Las alteraciones o procesos patológicos que tienen como resultados pérdida de sinapsis, la pérdida neuronal, atrofia cerebral y la gliosis en la EA y su relación con la enfermedad vascular y los cambios inmunológicos aún no se han explorado por completo. La agregación de péptidos A $\beta$ , el daño vascular y la hiper respuesta inmune interactúan en la BHE, afectando el endotelio cerebral y llevando al paciente a daños irreversibles o a la neurodegeneración (Farrall and Wardlaw 2009; Merino-Zamorano et al. 2016; Zhao et al. 2016a; Nelson et al. 2017; Sharabi et al. 2019; Li et al. 2022).

El depósito de péptidos A $\beta$  en agregados o placas extracelulares y el plegamiento anormales e hiperfosforilación de la proteína de Tau en fibrillas intracelulares son protagonistas patológicos claves de la EA. Esos cambios están asociados con pérdida sináptica y neuronal, atrofia cerebral, gliosis y degeneración de la materia o sustancia blanca (Tiwari et al. 2019). Existe hipótesis en que estos eventos conducen al deterioro cognitivo y la demencia, pero los mecanismos exactos aún no se han aclarado, siguen siendo objeto de investigación. El concepto patogénico más influyente de la EA es la hipótesis amiloidea, en la cual se postula que existe un desequilibrio entre la producción y la eliminación de monómeros A $\beta$  provocando una acumulación de agregados de péptidos A $\beta$  extracelulares insolubles (Breijyeh and Karaman 2020; Yu and Wu 2021).

La BHE juega un papel muy importante en la eliminación de proteínas como A $\beta$  a través del sistema cerebrovascular, esta barrera no es una sola entidad física sino la función combinada de una serie de propiedades fisiológicas que poseen las células endoteliales de microvasculatura de cerebro que limitan la permeabilidad de los vasos. Esta barrera también participa de forma estrictamente el movimiento y paso de iones, de moléculas y de células, entre la sangre y el parénquima cerebral, por lo tanto, es fundamental para la función y protección neuronal. Las propiedades únicas que definen a la BHE a menudo se alteran en estados patológicos, y la disfunción de la BHE se ha identificado como un componente crítico

en varias afecciones neurológicas, que están siendo estudiadas en la actualidad de manera masiva (Breijyeh and Karaman 2020; Profaci et al. 2020; Gosselet et al. 2021; Yu and Wu 2021).

Los péptidos A $\beta$ , se generan a partir de la proteína precursora de amiloide o APP, por la acción de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas. Además del depósito de péptidos A $\beta$  a nivel del parénquima cerebral, también se observa depósito de péptidos A $\beta$  en las paredes de los vasos cerebrales, lo que se denomina angiopatía amiloide cerebral (AAC), en más del 80% de los pacientes con EA. La AAC, es un tipo de enfermedad de los vasos pequeños (SVD) que afecta a las arterias pequeñas, arteriolas, vénulas y capilares de los vasos sanguíneos en el cerebro. Durante la formación de CAA, los péptidos A $\beta$  se agrega en la túnica media y la adventicia, luego los péptidos A $\beta$  infiltra todas las capas del vaso reemplazando las células del músculo liso en la túnica media. En los capilares, los péptidos A $\beta$  se concentra en la membrana basal perivascular y como depósitos globulares en las paredes capilares (Kitazume et al. 2010). Y finalmente en la BHE los péptidos A $\beta$  muestran procesos de alteración como oxidación, señalización proinflamatoria desregulada y daño endotelial (Brothers et al. 2018; Spampinato et al. 2019).

Por otro lado, a pesar de una clara correlación entre los patógenos de la enfermedad periodontal en el cerebro y el deterioro cognitivo en la EA, el mecanismo preciso que subyace a las bacterias que cruzan la BHE sigue sin estar 100% claro. Actualmente muchos estudios están dándole la relevancia a estos patógenos periodontal como *Porphyromonas gingivalis*. Unos de sus factores de virulencia más evaluados son las gingipaínas y las OMV, que exacerban la EA. Las gingipaínas y las OMV están involucradas en el aumento de la permeabilidad de las endoteliales de microvasculatura cerebral, esto lo hacen a través de la degradación de las proteínas de unión estrecha, como: ZO-1 y Claudina, disminuyendo el nivel de estas proteínas después del periodo de infección. Por lo tanto, la entrada de gingipainas en las células endoteliales microvasculares cerebrales, probablemente a través de OMV, puede ser responsable del daño BHE a través de la degradación intracelular de las proteínas ZO-1 y ocludina (Nonaka et al. 2022).

La disfunción endotelial de la BHE puede variar desde una leve y transitoria en la apertura de las TJP a una alteración crónica y permanente a nivel de la barrera, en donde también pueden suceder cambios en los sistemas de transporte. También se conocen que algunos agentes infecciosos como virus y bacterias, pueden entrar al SNC produciendo enfermedades crónicas y esto influye en la disfunción BHE (Rodrigues et al. 2012; Velandia-Romero et al. 2016).

Otro factor de virulencia importante de *Porphyromonas gingivalis*, es el LPS, no solo se ha relacionado con la periodontitis sino también con la disfunción endotelial, se ha visto relacionado directamente con la alteración de las células endoteliales de otros endotelios, como las células endoteliales de las arterias coronarias (Viafara-García et al. 2019). El LPS induce la respuesta inflamatoria crónica a nivel del endotelio, donde se establece la participación de receptores de tipo TLR2 en la señalización durante la respuesta inflamatoria. Así pues, estas respuestas a estímulos producen moléculas proinflamatorias como IL-8, MCP-1 y las moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 en las células endoteliales de microvasculatura cerebral, lo cual determina la activación endotelial, favoreciendo el reclutamiento, la adhesión y trans migración al sub-endotelio de monocitos (Kebuschull et al. 2010; Oishi et al. 2019; Hu et al. 2020).

Se ha demostrado también la presencia del LPS de *Porphyromonas gingivalis* en cerebros de paciente con diagnóstico de EA, y este puede activar el sistema de complemento C3b, C3d produciendo una opsonización de las neuronas en el hipocampo como consecuencia de la entrada de este patógeno al microambiente del cerebro, también a nivel de la BHE se ha reportado que puede inducir un aumento significativo de la apolipoproteína  $\epsilon_3$ , que induce daño en las uniones de las células endoteliales. Sin embargo no es claro el mecanismo por el cual pasa todo esto y se requiere de estudios que apoyen estas hipótesis (Cerajewska et al. 2015; Singhrao et al. 2017; Singhrao and Olsen 2019; Nonaka et al. 2022; Verma et al. 2023).

Estudios epidemiológicos de pacientes de edades avanzadas han demostrado que existe una asociación entre la enfermedad periodontal y la edad de estos, en donde se encontraron niveles altos de la proteína C reactiva (PCR) (Winning et al. 2015; Sansores-España et al. 2021; Scheltens et al. 2022). Estos hallazgos se correlacionan con otros estudios donde se encontró un aumento significativo de los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , en pacientes con enfermedad de Alzheimer y periodontitis crónica, en comparación con pacientes que tenían sólo enfermedad de Alzheimer (Bachtiar et al. 2021). Otros datos importantes sobre la presencia de niveles elevados de PPA en pacientes con periodontitis crónica, siendo esta proteína clave para la formación de péptidos A $\beta$  y la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Con todas estas evidencias se ha propuesto que el tratamiento y la prevención adecuada de la enfermedad periodontal pueden ser representativa como una estrategia para prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, es importante tener en cuenta la respuesta proinflamatoria de cada individuo (Teixeira et al. 2017).

En relación con los factores genéticos se ha demostrado que la apolipoproteína E4 (APOE4) es uno de los principales factores de riesgo genético para la enfermedad de Alzheimer, se estima que va desde un 60 a 80% de los pacientes que tienen al menos un alelo APOE. Estudios en modelo de ratones APOE infectados con *Porphyromonas gingivalis*, observaron que este periodontopatógeno pueden iniciar la actividad de células microgliales y promover la síntesis de proteínas inflamatorias innatas de la cascada del complemento, lo que conlleva a que se presente implicaciones sobre la supervivencia de la neurona (Jellinger 2002; Ransohoff 2016; Singhrao et al. 2017; Ilievski et al. 2018).

Por lo tanto, un aumento en la actividad de los microorganismos y sus factores de virulencia da como resultado una mayor carga inflamatoria, la susceptibilidad genética e infecciones recurrentes y la entrada directa de bacterias gramnegativas, como: *Porphyromonas gingivalis* al cerebro da como resultado final una progresión de la enfermedad más crónica, la cual proporciona un catalizador capaz de desencadenar una lesión cerebral y un aumento de la permeabilidad de la BHE por presencia de componentes tóxicos (Poole et al. 2017; Singhrao et al. 2017; Brothers et al. 2018; Yu and Wu 2021; Verma et al. 2023).

Por otro lo anterior, a pesar de que actualmente existen estudios que demuestran que la enfermedad periodontal, por medio de sus periodontopatógenos como: *Porphyromonas gingivalis*, induce algún tipo de daño o de alteración en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro, no son claros todos los mecanismos que conlleva a esto, y una hipótesis que toma fuerza cada vez más es que la prevención de la enfermedad vascular, del daño de las células MBEC podría representar un enfoque para mitigar la disfunción de la BHE y desacelerar los procesos neuroinflamatorios, neurodegenerativos y deterioro cognitivo en paciente con EA.

## 6. Objetivos

### 6.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* y el LPS sobre la respuesta proinflamatoria y la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón.

### 6.2. *Objetivos específicos*

1. Evaluar el efecto de la bacteria completa viva de *P.gingivalis* y el LPS sobre la viabilidad y metabolismo en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón.
2. Evaluar la expresión de marcadores de proteínas de adhesión y de unión estrecha en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* y el LPS.
3. Evaluar la respuesta proinflamatoria en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* y el LPS.
4. Evaluar la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* y el LPS.

## 7. Metodología experimental

### 7.1. Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*

### 7.2. Población y muestra

- Bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 (ATCC® BAA-308/W83).
- LPS de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 (ATCC® BAA-308/W83).
- Células endoteliales de microvasculatura de ratón: MBEC (cultivo primario).

### 7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información

A continuación, se describe la metodología planteada para cumplir con los objetivos del estudio:

- *Cultivo de células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón*

Se utilizaron células de MBEC (cultivo primario) del banco de células del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque, se usó el protocolo estandarizado previamente (Perrière et al. 2005; Velandia-Romero et al. 2016). En donde, utilizaron ratones de 1 día postnatal de la cepa Balb/C, los cuales sacrificaron con una sobredosis de la mezcla de ketamina (90 mg/Kg) y xilazina (15 mg/Kg)(anestésicos). Posteriormente, los investigadores le extrajeron el cerebro (sin cerebelo) a los ratos, y le disecaron la corteza cerebral y obtuvieron trozos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, en donde se encontraban células endoteliales, astrocitos, microglía y neuronas, que pasaron luego al proceso de agitación/disociación. Luego, detuvieron la digestión enzimática con la solución de parada y centrifugaron a 1.000 rpm por 8 minutos. El pellet que obtuvieron lo resuspendieron (3 veces) en una solución de BSA (albúmina sérica bovina), la cual la centrifugaron a 1.000 rpm por 5 minutos, luego el pellet lo recolectaron y lo incubaron a 37°C por 50 minutos.

A continuación, el pellet que recolectaron se resuspendió en la solución de parada y lo sembraron sobre el gradiente de percoll, centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego, sembraron las células en placas de 12 pozos pretratados con matriz extracelular endotelial y mantenidos durante 3 días en medio de cultivo Pre-Definido (MP-D) que contenía puromicina (antibiótico: inhibidor de la síntesis de proteínas)(Perrière et al. 2005). Al 4 día de cultivo, retiraron la puromicina y las células las mantuvieron por 20 o 30 días en medio definido (MD) con cambios de medio cada 24 h. Luego los investigadores esperaron que alcanzara una confluencia del 60% al 80% de las células y fueron disociadas, centrifugadas, resuspendidas en medio MD y re-sembradas en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Velandia-Romero et al. 2016).

Las células se mantuvieron en cajas T75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM (UltraCruz®, Biotechnology) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Biowest) al 10%, antibiótico (penicilina/estreptomina) al 1% y bajo condiciones apirogénicas, en una atmosfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 80% se disociaron en una solución de tripsina al 0.25% y EDTA 0.5 mM en PBS. Posteriormente se sembraron una concentración específica de células por pozo, placas o transwells de acuerdo con el ensayo a realizar, después de 20h de estabilizado el cultivo y con una confluencia del 90%, se infectaron con la bacteria completa viva de *P. gingivalis* W83. También una parte de las células fue congelada en una solución de criopreservación (SC) y almacenadas a -80°C o en nitrógeno líquido, para reducir el número de animales y cultivos.

- *Cultivo bacteriano e inóculo de Porphyromonas gingivalis cepa W83*

Se utilizó *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, que se obtuvo descongelando del cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO, en donde está en caldo BHI (Brain Heart Infusion) con 10% de glicerol. Las bacterias se cultivaron por agotamiento en agar Brucella suplementado (5% de sangre de cordero, 0.2% de sangre hemolizada, 0.0005% de hemina y 0.00005% menadiona) y se incubaron a 37 °C durante 8 días en condiciones

anaeróbicas. (Anaerógeno, Oxoid, Hampshire, Reino Unido), pasado el tiempo de incubación fueron observadas macroscópicamente las características de las colonias con el fin de confirmar la pureza del cultivo (Rodrigues et al. 2012).

Para la obtención del inóculo bacteriano, con un hisopo estéril en 5 mL de medio DMEM sin antibiótico se concentró la suspensión de bacterias, a una longitud de onda de 620 por lectura espectrofotométrica, estandarizados previamente en el laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque, a una densidad óptica específica de 0,970 - 0,972 para esta bacteria. La suspensión obtenida se dividió en dos tubos, uno para verificar el recuento bacteriano de unidades formadoras de colonia (UFC) y el otro para realizar los procesos de infección en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón. De cada uno de los inóculos obtenidos se realizó resiembra en agar Brucella suplementado, para confirmar el crecimiento de colonias.

- *Extracción y Purificación de LPS*

A partir de 1.1 gr de bacteria completa de *P. gingivalis* cepa W83, se realizó el proceso de extracción del LPS mediante el método fenol-agua, seguido del tratamiento enzimático de nucleasas y proteasas y de caracterización mediante SDS-PAGE, ensayo purpald y ensayo LAL cromogénico descrito por Gualtero et al. (Gualtero Escobar et al. 2014). El LPS se encuentra almacenado a -20°C en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto UIBO y se descongela en el momento de realizar el proceso de estimulación.

- *Obtención de LC*

Para la obtención del Lisado Celular, cada resaltar que este proceso no se llevó a cabo en este estudio, pues ya estaba previamente estandarizado por laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque, y se utilizó como uno de los controles positivos a una concentración de 20 µg/ml.

- *Estimulación de células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón con Porphyromonas gingivalis cepa W83*

Las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón se descongelaron y se sembraron en frascos T75 en medio DMEM (UltraCruz®, Biotechnology) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowest) y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1%, en condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO<sub>2</sub> y 37°C) respectivamente, posteriormente se disociaron con una solución de tripsina. -EDTA (0.25%-0,5 mM) en PBS, luego se sembraron dependiente del experimento a realizar en placas con diferentes número de pozos y se estabilizaron hasta que se alcanzó una confluencia del 80% durante un periodo de 20 horas (Velandia-Romero et al. 2016).

Pasado este periodo las células se infectaron con: bacteria completa (Bc) viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a concentraciones de MOI: 5.0, 1.0, 50, 100 y 200 siendo nuestro tratamiento o estímulos, lipopolisacárido (LPS) a 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml y el lisado celular (LC) a 20 µg/ml siendo los controles positivos, durante un periodo de incubación de 24 horas. Se utilizó como control negativo células sin estimular (SE). El número de células y tiempos fueron dependientes de los experimentos a realizar y se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado.

- *Evaluación de la viabilidad en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón*

Con el fin de evaluar la viabilidad celular se utilizó la técnica de resazurina: técnica colorimétrica, que es usada frecuentemente para determinar la capacidad de proliferación de células eucariotas. En este ensayo, las células que son metabólicamente activas transforman la forma oxidada de la resazurina que es de color azul y no fluorescente, a su forma reducida resorufina que es de color rosa y fluorescente. Los cambios de color pueden ser cuantificados por un espectrofluorómetro y analizados en función de la actividad metabólica, y de manera indirecta la viabilidad celular (Saenz-Muñoz 2021).

Se sembraron 35.000 células/pozo en 2 placas de 60 pozos, pasado el tiempo de 20 horas de estabilización, estas células se infectaron con *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, LPS y LC de acuerdo con lo descrito previamente, después de pasada las 24 horas del periodo de estimulación, se retiró el medio de cultivo y se adiciono 200 µL de PBS para realizar el lavado con el fin de retirar los residuos celulares y bacterianos, luego se adicionó 200 µL de solución de resazurina a 44 µM en DMEM sin suplementar en cada pozo, las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C, después de este tiempo, la fluorescencia emitida por las células viables y/o metabólicamente activas se cuantificó mediante una longitud de onda de excitación de 535 nm y una de emisión de 595 nm con el espectrofotómetro TECAN (Infinite® 200 PRO, Switzerland). Los valores de fluorescencia se llevaron a porcentajes de supervivencia celular y se graficaron en función del logaritmo de la concentración de tratamiento, empleando el paquete estadístico GraphPad Prisma 6 (Viafara-García et al. 2019; Saenz-Muñoz 2021).

Se utilizó como control de muerte celular a Tritón-X al 1%; como control de viabilidad celular se utilizó células SE; se usó como controles positivos al LPS 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml y LC 20 µg/ml de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, y los estímulos utilizados fueron bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las concentraciones de MOI 5.0, 1.0, 50, 100 y 200. Tiempos que se evaluaron para este ensayo, fueron: 6 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas.

- *Evaluación del ciclo celular en MBEC estimuladas con Porphyromonas gingivalis*

Para el análisis del ciclo celular se utilizó el método 7AAD (7-Amino Actinomicina D) donde se incorpora al ADN de doble cadena entre pares de bases en regiones ricas en G-C (Guanina y Citocina) y permite determinar por citometría de flujo el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases, esto con el fin de establecer si la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, el LPS y el LC tienen efecto sobre el ciclo celular comparado con SE, en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón (Alehaideb et al. 2020).

Se sembraron 35.000 células/pozo en 2 placas de 48 pozos y se realizó el protocolo de estimulación descrito previamente, pasado el tiempo de 24 y 48 horas de estimulación e incubación, se retiró el medio y los pozos se lavaron con 300 µL de PBS, las células se disociaron con una solución de tripsina -EDTA (0.25%-0,5 mM), 200 µL de tripsina en cada pozo, posteriormente se lavaron dos veces con PBS, en cada lavado se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1.800 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se tiñe con 5 µL de 7-AAD (concentración final 25 mg/mL) en 200 µL de solución de PBS por 15 minutos a temperatura ambiente, luego del tiempo de incubación (15 minutos), se realizó el análisis mediante citometría de flujo en el equipo BD CSampler BD Accuri C6, utilizando el láser de 488-647 nm. Finalmente, los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Modfit LT® y se graficaron en el programa GraphPad Prisma 6 (Scientific 2022).

Se utilizó como control negativo células SE; como controles positivos LPS a 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml y LC a 20 µg/ml, y los estímulos utilizados fueron bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las concentraciones MOI 5.0, 1.0, 50, 100 y 200 de *P. gingivalis* cepa W83. Tiempos que se evaluaron para este ensayo, fueron: 24 horas y 48 horas.

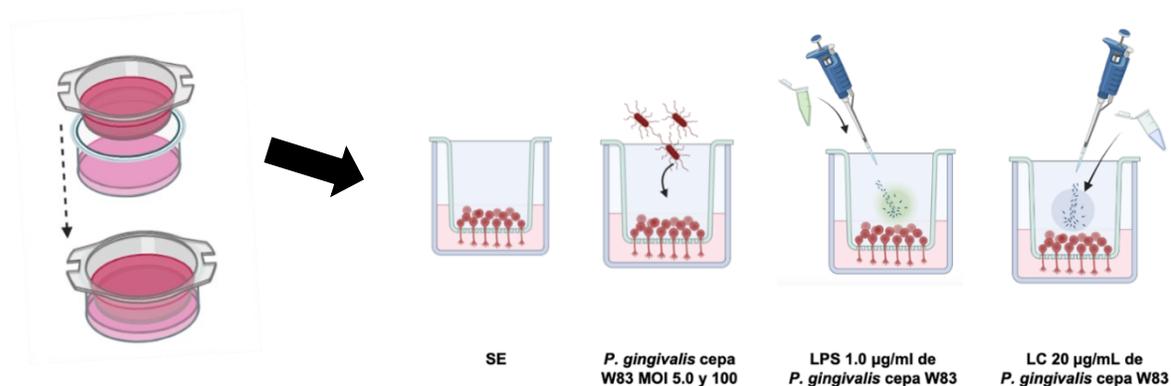
Cabe resaltar que tanto este ensayo de 7AAD para ciclo celular, como el ensayo de resazurina para viabilidad celular, fueron ensayos importante para determinar con que concentraciones de los controles positivos, concentraciones de los estímulos y tiempos, se debían ejecutar en su momento los demás experimentos.

- *Análisis inmunocitoquímico sobre la integridad de las células MBEC infectadas con Porphyromonas gingivalis*

Las células que se utilizaron para este ensayo se descongelaron y se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, con factores de crecimiento, con antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1% y bajo condiciones apirogénicas. Cuando se alcanzó una confluencia del 90% se disociaron con una solución de tripsina al 0.25% y EDTA

0.5 mM en PBS. Posteriormente se sembró 35.000 células en insertos transwell® pre-tratadas con colágeno tipo I (100 µg/ml) y fibronectina (10µg/ml), se esperó hasta que tuvieron la confluencia adecuada y que la membrana del transwells estuviera integra (sin perforaciones), se añadieron los estímulos y controles respectivos para este experimento (Figura 12) (Calderón-Peláez 2013).

Se utilizó como control negativo células SE ; como controles positivos LPS a 1.0 µg/ml y LC a 20 µg/ml, y los estímulos utilizados fueron bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las concentraciones MOI 5.0 y 100. Tiempo que se evaluó para este ensayo, fue: 24 horas.

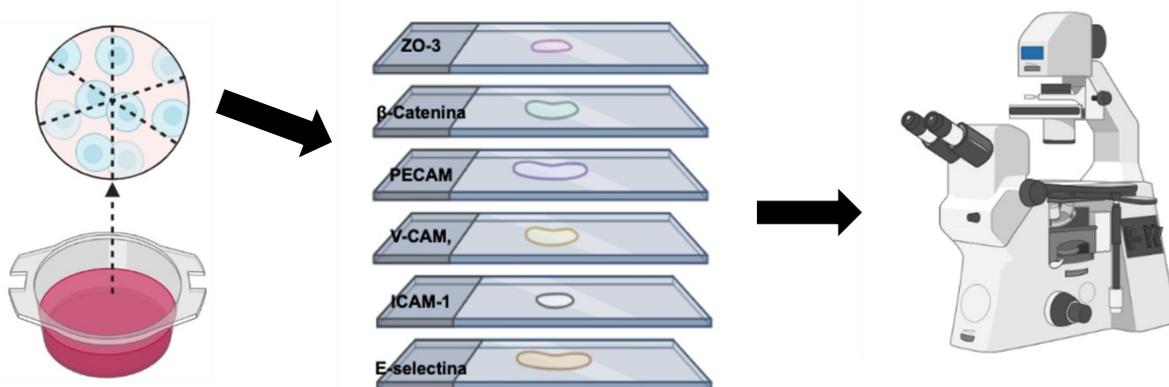


**Figura 12:** Esquema de los insertos transwell® y los diferentes estímulos/tratamientos y controles utilizados. En el inserto transwell se divide el pozo en dos compartimientos denominados cámara superior y cámara inferior, separados por una membrana. Figura realizada por: Vargas-Correa, 2023.

Para la identificación de estas proteínas se utilizó la técnica de inmunofluorescencia (IF); las células fueron lavadas con cloruro de amonio 50mM (30 minutos) y con PBS 1X de 2 a 3 veces durante 3 a 5 minutos, posteriormente se permeabilizaron y bloquearon en un solo paso utilizando una solución con 500 µL de suero de cabra (SC) al 10% + 3 µL de Tritón X-100 al 0.3% + 9,5 ml PBS 1x. Se incubaron con los anticuerpos primarios (Anexo 1.) diluidos en SC al 5% a 4º C y con los anticuerpos secundarios respectivos acoplados a diferentes

fluorocromos. También se tiñeron los núcleos de las células con Dapi 100  $\mu$ L (Velandia-Romero et al. 2016).

Para el montaje, se utilizó laminillas cubre objetos, estas se marcaron con el nombre de cada control negativo/positivo o con cada estímulo/tratamiento, y con cada anticuerpo a evaluar. Posteriormente, en cada laminilla se puso una gota de medio montaje para fluorescencia, se colocó la membrana y encima se pone otra laminilla (se usaron 2 laminillas), esto con el fin de poder observar por ambos lados, pues no se tiene la certeza del lado derecho o el revés de la membrana, cada aclarar que la membrana previamente fue cortada en pedazos más pequeños. Finalmente, se analizaron bajo microscopio (Zeiss Imager.M2) utilizando un sistema de fluorescencia X Cite serie 120Q y el software ZEN 2.6 (blue edition) y ZEN 3.7 y Fiji (Figura 13)(Calderón-Peláez 2013).



**Figura 13:** Esquema del montaje realizado para las fluorescencias, Microfotografías tomadas en el microscopio Zeiss Imager.M2. Figura realizada por: Vargas-Correa, 2023.

- *Evaluación de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias mediante RT-PCR*

La expresión de los genes de las citocinas IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  y la quimiocina MCP-1, se evaluaron utilizando el método PCR en tiempo real, se usó la proteína  $\beta$ -actina como gen de referencia (housekeeping). Después de estabilizado el cultivo, se infectaron las células MBEC (20.000 Cell/pozo), teniendo en cuenta el protocolo de infección descrito anteriormente.

Después del periodo de incubación (24 horas) se extrajo el RNA total, utilizando el método de Trizol® (Invitrogen), luego se cuantificó el RNA usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Se utilizó 100 ng de ARN libre de ADN utilizando el sistema de One-Step SYBR Green. La amplificación de los fragmentos se hizo en el equipo de Bio-Rad CFX96 (Real-Time System) (Calderón-Peláez 2013; Thermo Fisher Scientific 2016; Mendoza 2018).

Todos los primers fueron diseñados previamente usando el software Beacon Designer 8, PREMIER Biosoft International y estandarizados previamente en el Laboratorio de Virología (Anexo. 2). Los cambios en la expresión génica fueron calculados empleando el método de cuantificación relativa de doble delta de Ct (Método:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

Se utilizó como control negativo células SE; como controles positivos a LPS 1.0  $\mu\text{g/ml}$  y LC a 20  $\mu\text{g/ml}$ , y los estímulos utilizados fueron bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las concentraciones de MOI 5.0 y 100 de *P. gingivalis* cepa W83. Tiempo que se evaluó para este ensayo, fue: 24 horas.

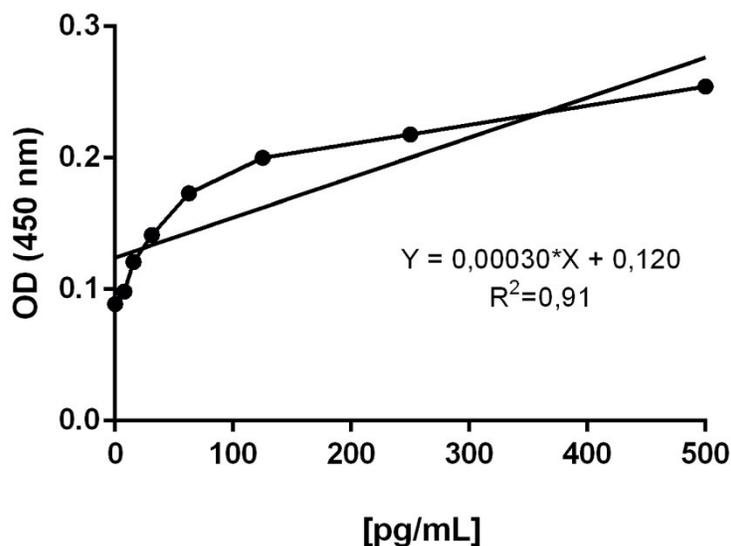
- *Cuantificación de A $\beta$ 42 amiloide en MBEC estimuladas con Porphyromonas gingivalis*

Mediante el kit amiloide A $\beta$ 42 humano ELISA (KHB3544, Invitrogen) se determinó la producción de péptido A $\beta$ 42 amiloide en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, pues este kit a pesar de que es humano presenta reactividad en ratones o ratas, por la cercanía de los anticuerpos entre estas dos especies.

Se sembraron 20.000 células/pozo en placas de 24 pozos, se estimularon con *P. gingivalis* cepa W83, LPS y LC, como se describió anteriormente, después del periodo de incubación de 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS, luego les adicionamos 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis y se dejó incubando durante 5 minutos a 4C°.

Finalmente, se realizó el protocolo de ELISA sándwich descrito por el fabricante y se utilizaron los estándares de calibración (500-0 pg/mL), tiempo de incubación de 4 horas. Se tuvo cuenta que la intensidad de esta señal es directamente proporcional con la concentración del péptido presente en la muestra y usando un espectrofotómetro TECAN (Infinite® 200 PRO, Switzerland) se cuantificó a una longitud de onda de 450 nm, por otro lado, los niveles de A $\beta$  para cada muestra se calcularon usando la curva estándar (Figura 14) (Thermo Fisher 2012, 2019).

Se utilizó como control negativo células SE; como controles positivos LPS a 1.0  $\mu$ g/ml y LC a 20  $\mu$ g/ml, y los estímulos utilizados fueron bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las concentraciones de MOI 5.0 y 100 de *P. gingivalis* cepa W83. Tiempo total del ensayo realizado fue de 4 horas.



**Figura 14:** Curva estándar de calibración kit amiloide A $\beta$ 42 ELISA (KHB3544, Invitrogen) (Thermo Fisher 2019). Figura realizada por: Buitrago y Vargas-Correa, 2023.

#### 7.4. Hipótesis de estudio

##### **Ho:**

- No se presenta efecto citotóxico en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- No se altera la viabilidad de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- No se presenta alteración en el ciclo celular células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- No se presenta la expresión de marcadores de proteínas de adhesión y de unión estrecha endotelial en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- No se presenta una respuesta proinflamatoria en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- No se presenta producción y acumulación de péptido Beta-amiloide en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.

##### **Ha:**

- Se presenta efecto citotóxico en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- Se altera la viabilidad de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.

- Se presenta alteración en el ciclo celular células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- Se presenta la expresión de marcadores de proteínas de adhesión y de unión estrecha endotelial en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- Se presenta una respuesta proinflamatoria en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.
- Se presenta producción y acumulación de péptido Beta-amiloide en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con bacteria completa *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 y el LPS.

#### 7.5. *Plan de análisis estadístico*

Los resultados se presentan como la media más o menos la desviación estándar. Los datos se analizaron por la prueba de ANOVA para comparar pares de grupos seleccionados, se realizó pruebas de comparación múltiple. Si los datos no presentaron una distribución normal fueron analizados por el análisis estadístico no paramétrico de Dunnet y múltiples comparaciones de Tukey. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prisma 6. La probabilidad tenida en cuenta fue de  $P < 0.05$ .

## 8. Consideraciones éticas

La presente investigación es un estudio experimental *in vitro*, en donde se manejó células de cultivo primario del cepario del grupo de Virología obtenidos previamente de ratones, y el microorganismo *Porphyromonas gingivalis* fue obtenido de manera comercial, por lo anterior es considerada de acuerdo con la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (Ministerio de Salud 1993) como un estudio sin riesgo.

A su vez nos regiremos de acuerdo a los lineamientos de esta resolución en relación a la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos; título IV, capítulo I, teniendo en cuenta que los microorganismos manipulados en este estudio se consideran dentro del grupo III de riesgo, se manejaron en laboratorios de seguridad tipo 2, y se siguieron los protocolos de manejo y bioseguridad establecidos en los manuales de investigación del laboratorio de Investigaciones del Instituto UIBO.

Este trabajo de investigación hace parte del proyecto: Evaluación de la respuesta inflamatoria y funcional de células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón (MBEC) frente al estímulo de *Porphyromonas gingivalis* y su asociación con enfermedad de Alzheimer, aprobado por la convocatoria interna de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque 2019, y tiene aval ético acta No 003-2020.

### 8.1. *Impacto ambiental*

Las actividades experimentales que se realizaron en este estudio tuvieron un riesgo mínimo para el ambiente, según el estatuto de la seguridad industrial (Ministerio de Trabajo Y Seguridad Social 1979), la ley de servicios públicos domiciliarios (Congreso de la República de Colombia 1994), la ley que rige el manejo de los desechos peligrosos (Congreso de la República de Colombia 1998), el decreto que reglamenta la gestión integral de los residuos hospitalarios y similares (Ministerio de Salud y Protección Social 2000), la resolución por la cual se reglamenta el manual de procedimientos para la gestión Integral de los residuos hospitalarios y similares del Ministerio del Medio Ambiente y el Ministerio de Salud (Ministerio del Medio Ambiente 2002), el decreto por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos y desechos peligrosos en el marco de la gestión integral (Ministerio de Vivienda Ciudad y Territorio de Colombia 2005), la resolución por la cual se establecen los requisitos y el procedimiento para el registro de generadores de residuos o desechos peligrosos, a que hacen referencia los artículos 27 y 28 del Decreto 4741 del 30 de diciembre de 2005 (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial 2007).

## 9. Resultados

### 9.1. Citotoxicidad inducida por *Porphyromonas gingivalis* en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón

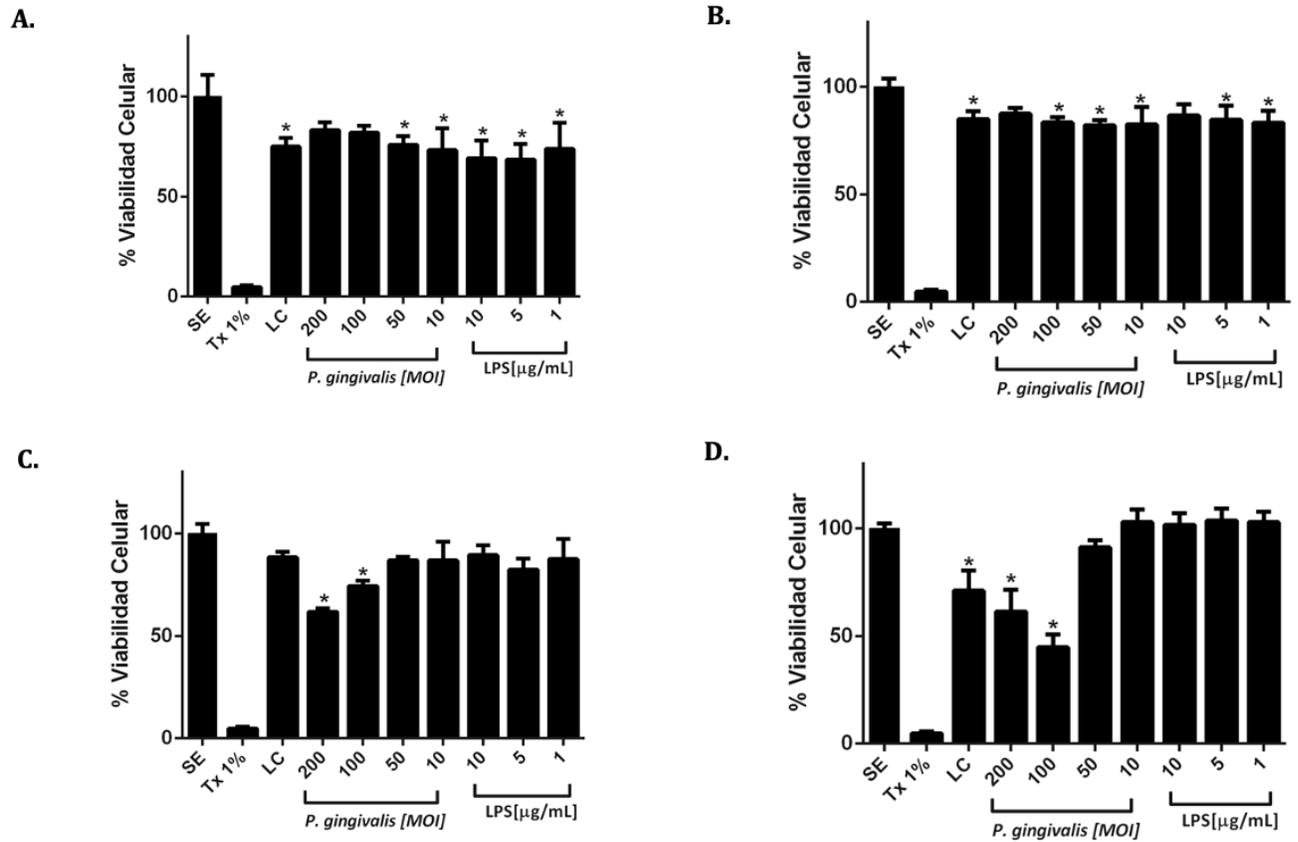
Se evaluó la viabilidad de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón inducida por el efecto de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, implementando el método de resazurina (técnica colorimétrica- metabolismo celular). Nuestros resultados nos permiten demostrar que con la bacteria completa viva a las concentraciones de MOI 50 (75.84%) y MOI 10 (73.17%), a las tres concentraciones evaluadas del LPS, a 10 µg/ml (69.12%), a 5 µg/ml (68.56%) y a 1 µg/ml (73.88%) y a la concentración del LC a 20 µg/ml (74.94%) de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 se produce citotoxicidad y disminución de la viabilidad celular con respecto al grupo control negativo o SE (100% viables) en las 6 primeras horas ( $p < 0.05$ ) (Figura 15 A). Además, también pudimos observar que con la bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las concentraciones de MOI 100 (81.93%) y MOI 200 (83.26%) se presentó disminución de la viabilidad celular, a pesar de que no fue estadísticamente significativo.

A las 12 horas, pudimos observar que con la bacteria completa viva a las concentraciones de MOI 100 (74.37%), 50 (86.97%) y 10 (86.87%), con el LC a la concentración de 20 µg/ml (88.37%) y también con a las concentraciones de LPS 5 µg/ml (82.40%) y 1.0 µg/ml (87.43%) de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, se presentó disminución de la viabilidad celular en comparación con el grupo control SE (100% viables) ( $p < 0.05$ ) (Figura 15 B).

Por otro lado, a las 24 horas en las concentraciones de bacteria completa viva de de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, MOI 200 (87.43%) y 100 (83.40%) se presentó disminución de la viabilidad celular con respecto al grupo SE (100% viables) ( $p < 0.05$ ) (Figura 15 C). Y a las 48 horas, observamos que con la concentración de 20 µg/ml de LC (70.97%) y a las concentraciones de bacteria completa viva MOI 200 (61.42%) y 100 (44.75%) de

*Porphyromonas gingivalis* cepa W83, se disminuye la supervivencia de las células en comparación con el grupo control SE (100% viables) ( $p < 0.05$ )(Figura 15 D).

Es preciso denotar que, a las 48 horas en las tres concentraciones de LPS (1.0  $\mu\text{g/ml}$ , 5.0  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, pareciera que se genera tolerancia pues los cambios en la viabilidad no son estadísticamente significativos. Por otro lado, también se destaca que con bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 en las mayores concentraciones de MOI 200 y 100 fue donde se demostró mayor efecto en la disminución de la supervivencia celular, inclusive mayor porcentaje que el que se presenta con el LC (20  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con el grupo control negativo (100% viables) ( $p < 0.05$ ). Los resultados no son dosis dependientes, porque observamos que se presentan efectos a altas y bajas concentraciones de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83.



**Figura 15:** Citotoxicidad en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón expuesta a diferentes concentraciones MOI (5.0, 1.0, 50, 100 y 200) de bacteria completa viva, LPS (1.0 μg/ml, 5.0 μg/ml, 10 μg/ml) y LC (20 μg/ml) de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 por un periodo de 6h (A), 12h (B), 24h (C) y 48h (D) horas. Cada barra representa la media ± e.s.m. de tres experimentos independientes, con tres replicas para cada tratamiento (n=3). \*Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control negativo (células sin estimular) (p < 0.05). Figura realizada por: Vargas-Correa y Buitrago, 2023.

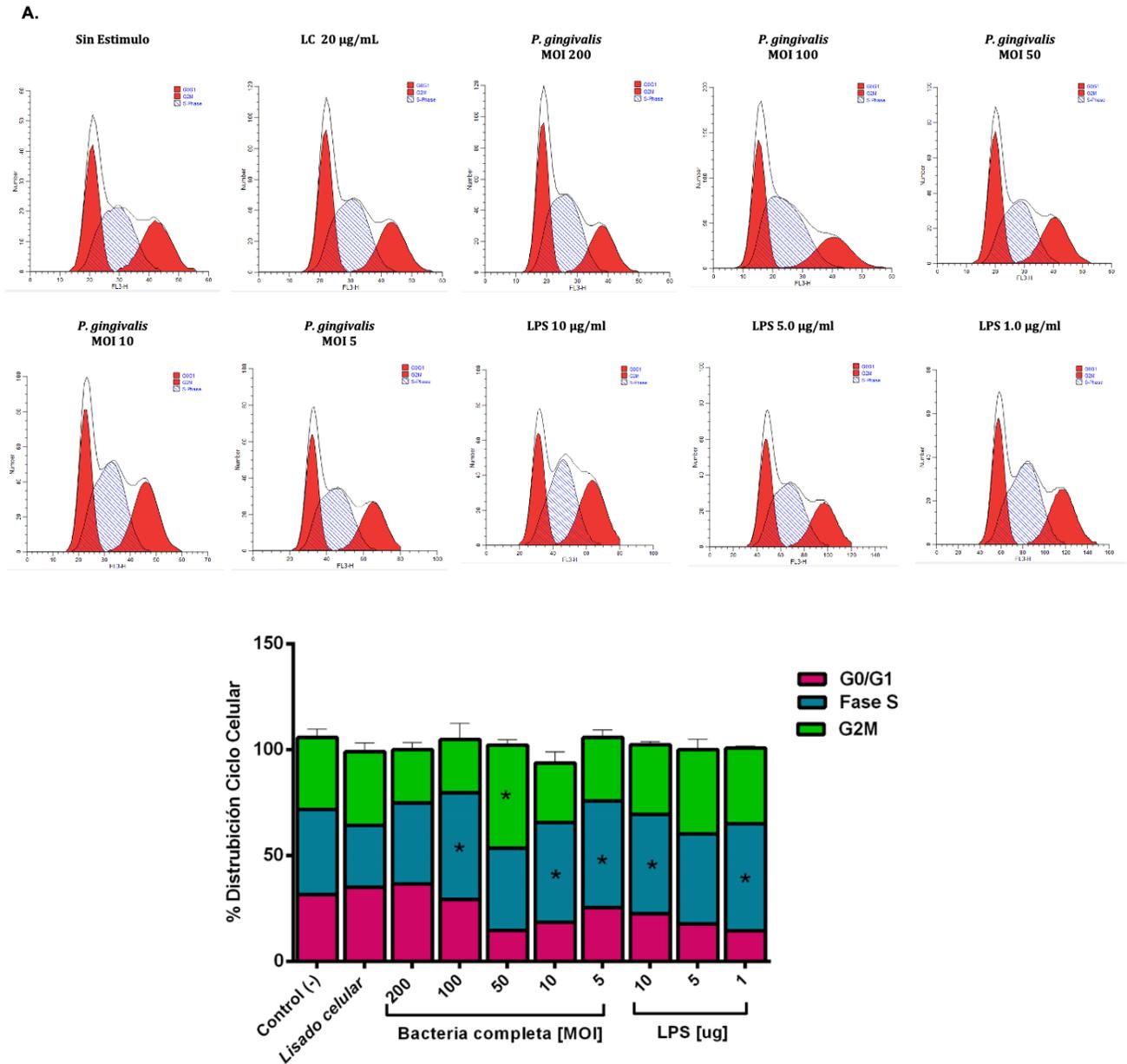
## 9.2. Modificaciones en las fases del ciclo de las células MBEC estimuladas con *Porphyromonas gingivalis*

Se determinó el efecto de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 sobre el ciclo de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, se utilizó el método 7AAD. Para esto, las células BMEC fueron tratadas a diferentes MOI de concentración de bacteria completa viva, MOI: 5.0, 10, 50, 100 y 200, con LC a 20 µg/ml y con LPS a 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml y 10 µg/ml de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 durante los tiempos de 24 y 48 horas; y posteriormente se realizaron los análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se representan como histogramas de frecuencia en las diferentes fases del ciclo celular (Figura 16 A y 17 A) y como porcentajes promedio de eventos encontrados para cada fase.

Nuestros resultados demostraron cambios sobre el ciclo celular inducido por *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 en la distribución de las fases celulares. A las 24 horas después del periodo de estimulación en las concentraciones de bacteria completa viva a MOI 100 (50.49%), 10 (47.04%) y 5 (50.25%) y LPS a las concentraciones de 10 µg/ml (46.83%) y 1 µg/ml (50.57%) inducen un efecto sobre el ciclo celular, generando un arresto en la fase S, disminuyendo la distribución celular en fase G0/G1, en comparación con el grupo control (células sin estimular 40.14% en la fase S) ( $p < 0.05$ ) (Figura 16 B).

Por otro lado, pudimos observar para la concentración de bacteria completa viva MOI 50 (48.69%) el arresto significativo está en fase G2M, generando una disminución en la distribución celular del ciclo celular en fase G0/G1, en comparación con el grupo de control (células sin estimular 34.01% en la fase G2M) ( $p < 0.05$ ) (Figura 16 B). Es importante resaltar

que estos resultados del efecto de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 sobre el ciclo celular de BMEC, no han sido reportados previamente por literatura.

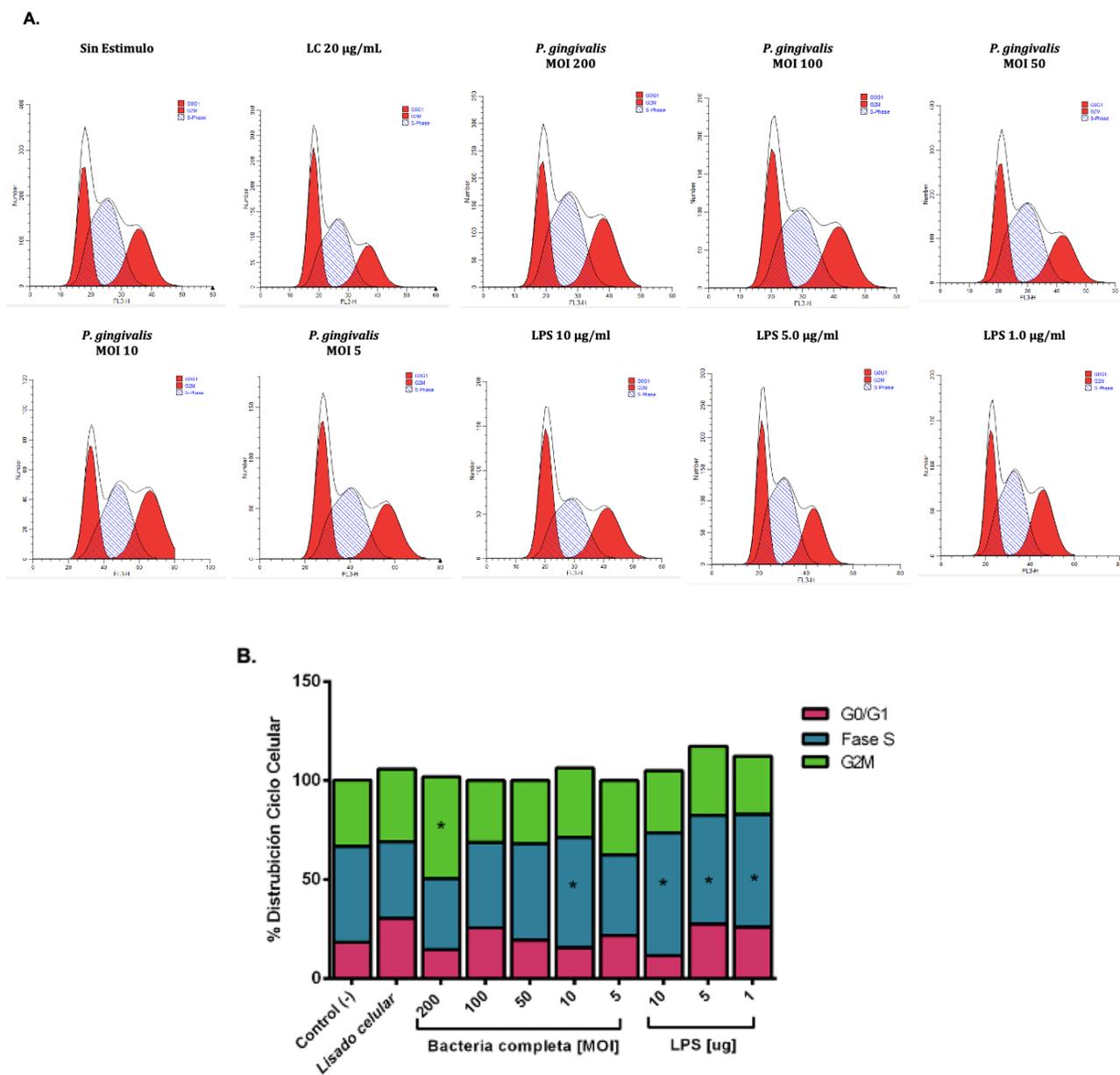


**Figura 16:** Efecto sobre el ciclo de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, tratadas durante 24 horas, a diferentes concentraciones MOI (5.0, 1.0, 50, 100 y 200), LPS (1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml) y LC (20 µg/ml) de bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. **A).** Histogramas del ciclo celular de MBEC, **B)** Cuantificación en porcentaje

*de las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2M). Los resultados se expresan como la media de tres ensayos independientes por triplicado ( $n = 3$ )  $\pm$  error estándar de la media (EMS). \*Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control negativo (células sin estimular) ( $p < 0.05$ ). Figura realizada por: Vargas-Correa y Buitrago, 2023.*

A las 48 horas, pudimos determinar que con bacteria completa viva a las concentraciones de MOI 10 (55.58%) y LPS en las tres concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$  (61.85%), 5.0  $\mu\text{g/ml}$  (54.77%) y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  (56.87%) inducen un efecto sobre el ciclo celular, específicamente generando un arresto en la fase S, afectando la distribución celular de la fase G0/G1 en comparación con el grupo control (células sin estimular 48.47% en la fase S)( $p < 0.05$ )(Figura 17 B); para la concentración de bacteria completa viva MOI 200 (51.53%), el arresto significativo fue en fase G2M, generando una disminución en la distribución del ciclo celular en las otras fases celulares (Fase S y G0/G1), en comparación con el grupo de control(células sin estimular 33.43% en fase G2M)(  $p < 0.05$ ) (Figura 17 B).

Es importante destacar que, aunque no es estadísticamente significativo en los resultados obtenidos para el LC a 20  $\mu\text{g/ml}$  (30.36%, en las concentraciones de bacteria completa viva MOI 100 (25.67%) y 5 (21.65%) y en el LPS en las concentraciones de 5.0  $\mu\text{g/ml}$  (27.47%) y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  (25.94%), se generó un arresto biológicamente importante en fase G0/G1 que nos indicaría posiblemente una apoptosis de tipo temprana, en comparación con el grupo de control (células sin estimular 18.26% en la fase G0/G1) ( $p < 0.05$ ) (Figura 17 B).



**Figura 17:** Efecto sobre el ciclo de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, tratadas durante 48 horas, a diferentes concentraciones MOI (5.0, 1.0, 50, 100 y 200), LPS( 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 10 µg/ml) y LC (20 µg/ml) de bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. **A).** Histogramas del ciclo celular de MBEC, **B)** Cuantificación en porcentaje de las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2M). Los resultados se expresan como la media de tres ensayos independientes por triplicado (n = 3) ± error estándar

de la media (EMS). \*Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control negativo (células sin estimular) ( $p < 0.05$ ). Figura realizada por: Vargas-Correa y Buitrago, 2023.

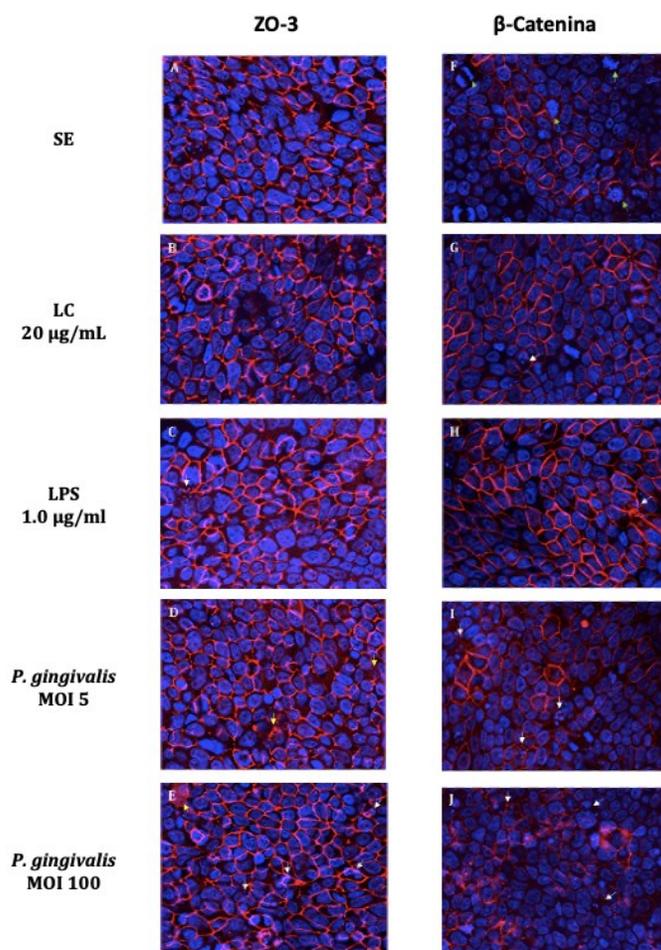
### 9.3. *Porphyromonas gingivalis* induce cambios en la expresión de moléculas de unión y adhesión en MBEC

Se realizó una caracterización de la población celular, evaluando así la expresión de marcadores de unión estrecha endotelial: ZO-3 y  $\beta$ -Catenina y de proteínas de adhesión: PECAM, V-CAM, ICAM-1 y E-Selectina en MBEC estimuladas con bacteria completa viva de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, teniendo como controles positivos a él lisado celular (20  $\mu\text{g/ml}$ ) y LPS (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ), y como control negativo células sin estimular.

Nuestros resultados nos permiten observar que la expresión de la proteína de unión estrecha ZO-3 (proteína de andamiaje), es muy similar en todos los tratamientos incluyendo los controles positivos y negativos, se localizó asociada a la membrana plasmática, de forma continua periférica en áreas de contacto célula-célula (Figura 18 **A-B-C-D-E**). Pero se observa con más frecuencia en las concentraciones de bacteria completa viva MOI 5.0 y 100 de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, hay un mayor número de células que no tienen una continuidad de su envoltura nuclear (se observa una fusión de núcleos), siendo esto indicativo de apoptosis celular. Por otro lado, también observamos en las microfotografías algunas zonas que presentan un marcaje de forma citoplasmático difuso, haciendo discontinua la membrana plasmática (Figura 18 **D-E**)(Calderón-Peláez 2013; Velandia-Romero et al. 2016).

En las microfotografías de la proteína  $\beta$ -Catenina (formación de uniones adherentes/andamiaje) se observó de forma muy similar para las células sin estimular, para el LC y para el LPS, en donde su localización fue en la membrana plasmática de forma continua (Figura 18 **F-G-H**); pero en las concentraciones de bacteria completa viva MOI 5.0 y 100 se observan una serie de zonas donde esta proteína esta deslocalizada, citoplasmática y

tenue, aumentando el daño en MOI 100, donde también pudimos observar células que no tienen una continuidad de su envoltura nuclear (se observa una fusión de núcleos), siendo esto indicativo de apoptosis celular (Figura 18 I-J)(Calderón-Peláez 2013; Velandia-Romero et al. 2016).



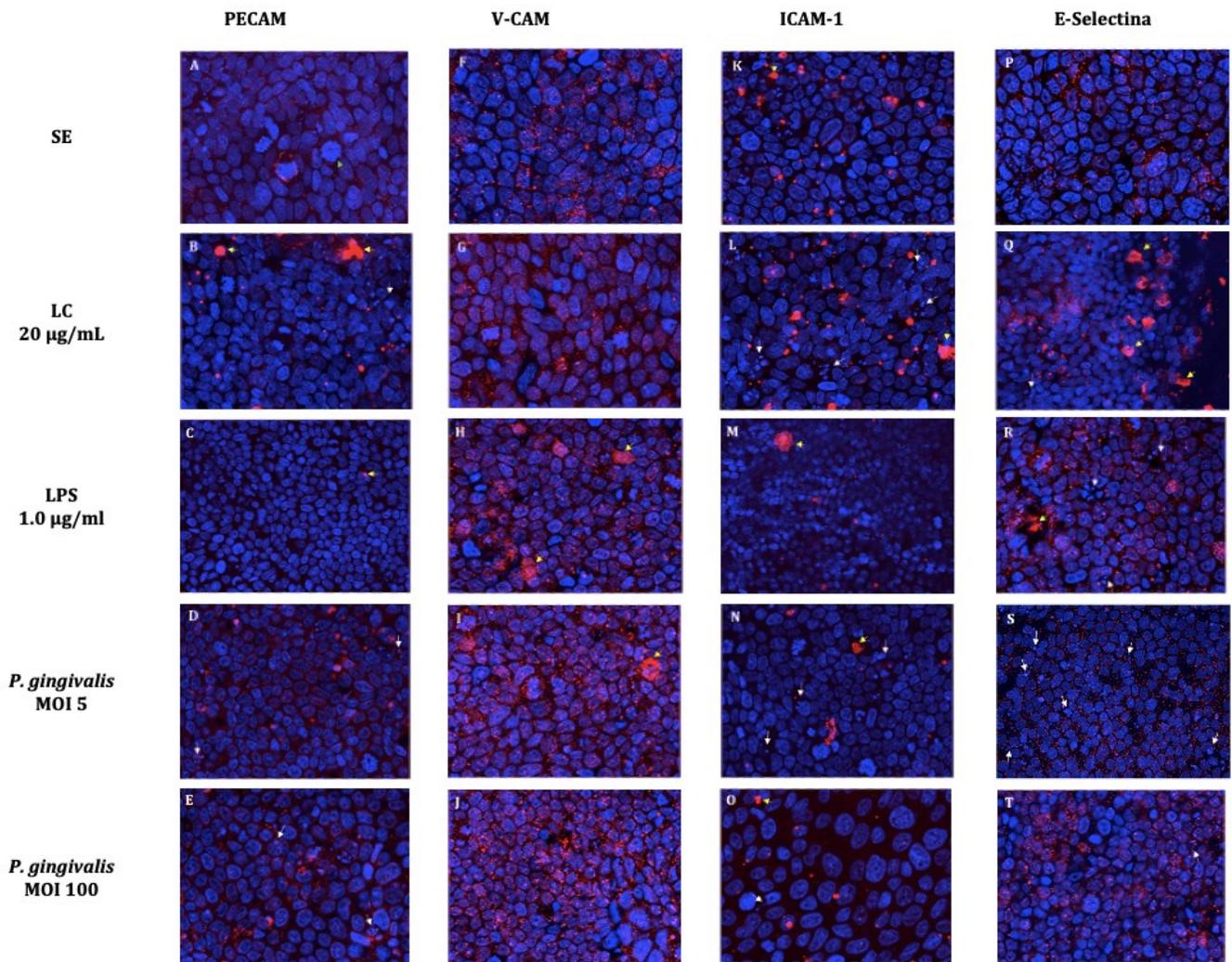
**Figura 18:** Inmunofluorescencias para la detección de las moléculas de unión estrecha (ZO-3 y  $\beta$ -Catenina) en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón de 1 día postnatal, infectadas con diferentes concentraciones de MOI (5.0 y 100), LPS (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y LC (20  $\mu\text{g/ml}$ ) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. Se muestra la localización de ZO-3 (A-B-C-D-E) y de  $\beta$ -Catenina (F-G-H-I-J). Flecha Blanca: apoptosis celular, Flecha Verde: Células en Mitosis, Flecha Amarilla: Citoplasmático (agregados). Núcleos en azul. Barra 20  $\mu\text{m}$ . Microfotografía tomada por: María Angelica Calderón y Modificada por: Vargas- Correa, 2023.

Por otro lado, con respecto a las proteínas de adhesión: La proteína PECAM (papel en la adhesión de los leucocitos/plaquetas y en la transmigración) se observó que su localización es de forma citoplasmática dispersa en las células sin estímulo e incluso se puede observar que delimita algunas células (Figura 19 A), a diferencia de las células infectadas donde pudimos ver que en el control positivo de LPS disminuye la expresión de esta proteína en las BMEC de forma significativa, lo podría significar que posiblemente se aumenta el infiltrado inflamatorio (Figura 19 C), por el contrario las células inoculadas con el control positivo del LC aumenta la expresión de esta proteína de adhesión en forma de agregados en algunas zonas citoplasmáticas (Figura 19 B). Y por último la infección con el tratamiento de bacteria completa viva MOI 100 y 5.0 también incremento la expresión de PECAM y su localización fue de forma citoplasmática dispersa (Figura 19 D-E)(Calderón-Peláez 2013; Velandia-Romero et al. 2016).

La proteína V-CAM (adhesión celular endotelial para leucocitos) su expresión en células sin estímulo se presentó de forma puntiforme difusa citoplasmática, en comparación con las células BMEC infectadas con LC, LPS y bacteria completa MOI 100 y 5.0 de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 en donde se presentó una sobreexpresión en el marcaje puntiforme y citoplasmático (Figura 19 F-G-H), siendo mayor en los tratamientos de concentraciones bacteria completa viva MOI 5 y 100 (Figura 19 I-J)(Calderón-Peláez 2013; Velandia-Romero et al. 2016).

En la proteína ICAM-1 (adhesión celular para leucocitos) su localización para las células SE y LC fue de forma citoplasmática en agregados (Figura 19 K-L) pero para el LPS y las concentraciones de bacteria completa viva MOI 5-0 y 100 disminuyó la expresión (Figura 19 M-N-O)(Calderón-Peláez 2013; Velandia-Romero et al. 2016).

Finalmente, en la proteína E-Selectina (adhesión de neutrófilos y varias líneas celulares de leucocitos), se observó una localización citoplasmática puntiforme difusa en células no infectadas (SE) (Figura 19 P) y en las células inoculadas con LC su expresión es en forma de agregados citoplasmáticos (Figura 19 Q), en LPS y bacteria completa viva MOI 100 se presentó una sobreexpresión de forma puntiforme citoplasmática (Figura 19 R-S-T) (Calderón-Peláez 2013; Velandia-Romero et al. 2016).



**Figura 19:** Inmunofluorescencias para la detección de las moléculas de adhesión (PECAM, V-CAM, ICAM-1, E-Selectina) en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón de 1 día postnatal, infectadas con diferentes concentraciones MOI (5.0 y 100), LPS( 1.0 µg/ml) y LC (20 µg/ml) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. Se muestra la localización de PECAM (A-B-C-D-E), de V-CAM (F-G-H-I-J), de ICAM-1 (K-L-M-N-O) y E-

*Selectina (P-Q-R-S-T). Flecha Blanca: apoptosis celular, Flecha Verde: Células en Mitosis, Flecha Amarilla: Citoplasmático (agregados). Núcleos en azul. Barra 20µm. Microfotografía tomada por: María Angelica Calderón y Modificada por: Vargas- Correa, 2023.*

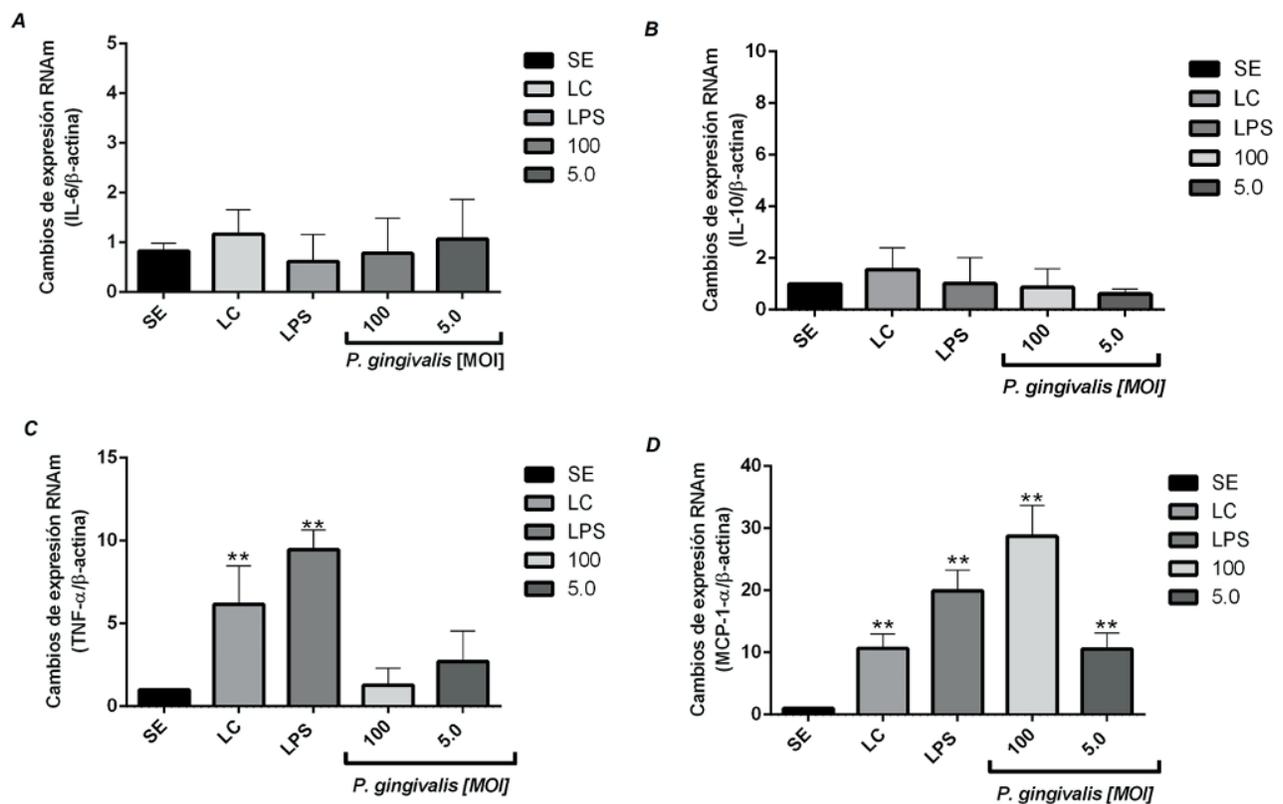
#### 9.4. Aumento de la expresión génica de TNF- $\alpha$ y MCP-1 en células MBEC estimuladas con *Porphyromonas gingivalis*

La determinación de la expresión génica de las citocinas IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  y quimiocina MCP-1, se realizó mediante el método PCR en tiempo real en MBEC estimuladas con bacteria completa viva a las concentraciones de MOI 100 y 5.0, lisado celular (20 µg/ml) y LPS (1.0 µg/ml) de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83.

Nuestros resultados obtenidos nos permitieron observar que no hubo cambios significativos en la cantidad de ARNm de células MBEC estimuladas con bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 en las concentraciones de MOI 100 (0.87 veces, 0.78 veces) y 5.0 (0.64 veces, 1.0 veces), LC (1.55 veces, 1.1 veces) y LPS (1.0 veces, 0.6 veces) para las citocinas IL-10 e IL-6 a las 24 horas, en comparación con el grupo de control respectivamente (células sin estimular, IL-10: 1.0 veces – IL-6: 0.82 veces ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 20 A-B).

Para la citocina TNF- $\alpha$ , nuestros hallazgos demostraron que se presentó aumento en su expresión a los estímulos de LC (6.15 veces) y LPS (9.45 veces) de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 a las 24 horas, en comparación con el grupo de control (células sin estimular, 1.0 veces) ( $p < 0.05$ ), siendo mayor para el LPS (Figura 20 C).

Por otra parte, la bacteria de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 indujo cambios en la expresión de la quimiocina MCP-1 a MOI 5.0 (10.5 veces) y 100 (28.7 veces), así mismo con el LC (10.65 veces) y el LPS (19.9 veces) se presentó aumento en su expresión, a las 24 horas, en comparación con el grupo de control (células sin estimular, 1.0 veces) ( $p < 0.05$ ), siendo mayor para la concentración de MOI 100 de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 (Figura 20 D).

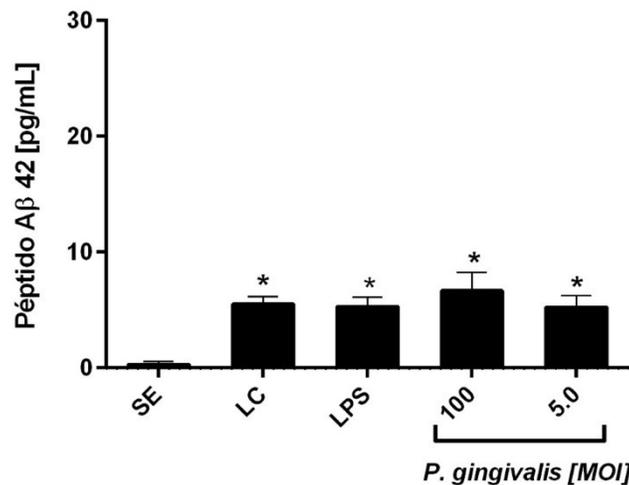


**Figura 20:** Expresión de las citoquinas proinflamatorias: IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  y quimiocina MCP-1 en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón infectadas con diferentes concentraciones MOI (5.0 y 100), LPS( 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y LC (20  $\mu\text{g/ml}$ ) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. **(A)** Expresión IL-6; **(B)** Expresión IL-10, **(C)** Expresión TNF- $\alpha$ , **(D)** Expresión MCP-1. Se usó la técnica de RT-PCR SYBR Green para la cuantificación del RNAm. Los resultados se expresan como la media de tres ensayos independientes por triplicado ( $n = 3$ )  $\pm$  error estándar de la media (EMS). \*Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control negativo (células sin estimular) ( $p < 0.05$ ). Figura realizada por: Vargas-Correa y Buitrago, 2023.

9.5. Producción de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas con *Porphyromonas gingivalis* cepa W83

El componente principal de las placas amiloides de la EA es el péptido A $\beta$ , para poder determinar la producción de este, utilizamos el Kit ELISA A $\beta$ 42 humano. Para este ensayo, las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón fueron tratadas a diferentes concentraciones de MOI 5.0 y 100, de LC (20  $\mu$ g/ml) y de LPS (1.0  $\mu$ g/ml) a 24 horas de estimulación y analizamos con espectrofotómetro.

Nuestros resultados nos permitieron demostrar que *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 genera producción de péptido A $\beta$ , siendo estadísticamente significativo para MOI 100 (6.66%), 5 (5.23%), LC (5.52%) y LPS (5.29%) en comparación con el grupo control (células sin estimular, 0.028%)( $p < 0.05$ ) (Figura 21). Estos resultados no son dosis dependientes.



**Figura 21:** Cuantificación de péptido A $\beta$ 42 en células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón infectadas con diferentes concentraciones MOI (5.0 y 100), LPS (1.0  $\mu$ g/ml) y LC (20  $\mu$ g/ml) de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. Cada barra representa el valor promedio de la concentración  $\pm$  E.S.M. \*Representa diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control (sin estímulo) ( $p < 0.05$ ). Figura realizada por: Vargas-Correa y Buitrago, 2023.

## 10. Discusión

La unidad neurovascular, la conforman las neuronas, astrocitos, células endoteliales de la BHE, miocitos, pericitos y componentes de la matriz extracelular (Abbott 2002, 2013; Abbott et al. 2006). Estas células, a través de su íntima relación anatómica y química, detectan las necesidades de suministro neuronal y desencadenan las respuestas necesarias para mantener la homeostasis del tejido nervioso (Cardoso et al. 2010). La longitud total de los capilares en el cerebro humano es de 400 millas (Muoio et al. 2014), siendo así el punto más grande de entrada, punto potencial para ingreso de patógenos al SNC.

El elemento clave que determina las propiedades de la BHE son las células endoteliales de microvasculatura de cerebro, estas contribuyen a la integridad y función de la BHE (Ballabh et al. 2004). Las células endoteliales controlan selectivamente el paso de moléculas desde los capilares hacia el parénquima cerebral y viceversa (Abbott et al. 2010). A diferencia de las células endoteliales periféricas, las células endoteliales de la BHE poseen uniones altamente selectivas asociadas con moléculas de unión adhesión y moléculas de unión estrecha, muestran baja o ausencia de actividad pinocitótica y carecen de fenestraciones (Saint-Pol et al. 2020; Gosselet et al. 2021).

La EA y la periodontitis son enfermedades multifactoriales asociadas a la inflamación. Existen vías patológicas similares en el establecimiento de estas dos enfermedades, incluidas características celulares y moleculares, marcadores de inflamación que contribuyen al deterioro cognitivo en la EA (Kanagasingam et al. 2020). La invasión de células endoteliales por parte de microorganismos como *Porphyromonas gingivalis* y/o sus factores de virulencia, se cree que estos pueden desencadenar mecanismos que podrían ser protagonistas generando disfunción endotelial y de forma permanente alterando la BHE y a su vez el SNC (Gosselet et al. 2021; Kim et al. 2021). Por tal motivo, el propósito de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto de la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 sobre la respuesta proinflamatoria y la producción y acumulación de péptidos A $\beta$  en células endoteliales de microvasculatura de cerebro.

En nuestros resultados pudimos observar y demostrar que *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 induce disminución de la supervivencia de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón, a las concentraciones de bacteria completa MOI más altas (MOI 100 y 200); en el 2013, Dietmann *et al.* informaron que las células endoteliales de cerebro humano (hCMEC/D3) son susceptibles a dosis única (500 ng/ml) de LtxA (leucotoxina) principal factor de virulencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (patógeno asociado a la enfermedad periodontal), disminuyendo la viabilidad celular; esta alteración en el porcentaje de viabilidad podrían conducir a la degeneración de la microvasculatura, a las 72 y 96 horas evaluadas (Dietmann et al. 2013).

Viafara-García *et al.* en el 2019, compararon la exposición repetida a *Porphyromonas gingivalis* W83 en las células endoteliales de las arterias coronarias humana (HCAEC) para observar la viabilidad de estas, y pudieron observar que LPS (1,0 µg/ml, 3,5 µg/ml y 7,0 µg/ml) y *Porphyromonas gingivalis* (MOI:100,50,10,1.0,0,1) no afectaron la viabilidad celular de HCAEC en las concentraciones evaluadas a las 24 horas (Viafara-García et al. 2019).

Por otro lado, en el 2012, Rodríguez *et al.* evaluaron la viabilidad de las células endoteliales de arteria coronaria humana, infectadas con *Porphyromonas gingivalis* cepas W83, A7436, 381 y 33277 (MOI: 100), no encontraron diferencia en el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad entre los cultivos celulares infectados y no infectados a las 24 y 48 horas (Rodriguez et al. 2012). Finalmente, para la viabilidad y citotoxicidad celular, en el trabajo de grado de Vargas de 2022, se demostró que *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 induce alteración en la viabilidad de las células de neuroblastoma humano (SHSY5Y) a las concentraciones de MOI más altas (MOI 100 y 200) (Vargas 2022).

Así mismo, demostramos que *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 produce alteración sobre el ciclo celular de las BMEC, a las 24 horas encontramos de forma importante acumulación en la fase S y disminución de la distribución celular en fase G0/G1 cuando las células se estimularon con bacteria completa MOI 100, 10, 5 y LPS a las concentraciones de 10 y 1

µg/ml; también se provocó arresto en la fase G2M, generando una disminución en la fase G0/G1 cuando las células se trataron con bacteria completa MOI 50; a las 48 horas se determinó que se generó un acumulo celular en la fase S del ciclo celular, afectando la distribución celular de la fase G0/G1, en los tratamiento de bacteria completa a las concentraciones de MOI 10 y LPS 10, 5 y 1, y en MOI 200 la acumulación celular fue en fase G2M, generando una disminución en las otras fases celulares (Fase S y G0/G1),

Dietmann *et al.* en sus resultados también observaron que LtxA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibe de manera importante e irreversible la proliferación celular mediante la detención del ciclo celular en la fase G2/M, disminuyendo la acumulación en la fase G1, en células endoteliales de cerebro humano (hCMEC/D3) a las 24, 72 y 96 horas evaluadas (Dietmann et al. 2013).

En relación al ciclo celular no existen reportes en la literatura actual que demuestren el efecto *in vitro* de periodontopatógenos como de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, LPS y LC sobre las células de microvasculatura de cerebro de ratón (BMEC). Solo se encuentra el trabajo de grado de Vargas, en el que se evaluaron alteraciones en la distribución de las fases del ciclo celular de SHSY5Y inducido por *Porphyromonas gingivalis*, en donde se reporta que este patógeno periodontal induce cambios en la distribución de las fases del ciclo celular de SHSY5Y, evidenciaron acumulación en la fase S y disminución de la distribución celular en fase G0/G1 cuando las células se estimularon a las concentraciones más bajas de MOI (50, 10 y 5) y con lisado celular y a las concentraciones más altas de MOI (100 y 200) evidenciaron acumulación en la fase G0/G1 con respecto al grupo de lisado celular (Vargas 2022).

Descubrimos que la infección de *Porphyromonas gingivalis* cepa W8 generó mayor alteración en la expresión de la molécula de unión estrecha β-Catenina donde se observa esta proteína deslocalizada, citoplasmática, tenue, y esto aumenta en el tratamiento con bacteria completa MOI 100, donde se observa también células que no tienen continuidad de su envoltura nuclear (apoptosis celular), lo que sugiere que este periodontopatógeno puede altear la organización de la proteína de unión estrecha y la integridad de la BHE. A su vez

*Porphyromonas gingivalis* cepa W8 también provocó sobreexpresión en el marcaje puntiforme y citoplasmático de la proteína de adhesión V-CAM, siendo mayor en los estímulos de bacteria completa MOI 5 y 100. En el 2022, Nonaka *et al.* observaron que las gingipaínas degradaron directamente las proteínas de unión estrecha y disminuyeron de forma significativa los niveles de estas proteínas ZO-1 y ocludina en las células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (Nonaka *et al.* 2022). Velandia-Romero *et al.* encontraron alteraciones en los contornos celulares y el perímetro de las células MBEC, las proteínas ZO-1 y Claudina-1 cambiaron su localización de la membrana al citoplasma después de la infección cepas de dengue (DENV). La infección por DENV induce la reorganización del citoesqueleto en las células endoteliales EA (Velandia-Romero *et al.* 2016).

En el 2016, Tran *et al.* demostraron el papel de la molécula de unión estrecha  $\beta$ -Catenina endotelial, en el mantenimiento de la integridad de la BHE adulta, la disfunción de la BHE, secundaria a la actividad defectuosa o alterada de la transcripción de la proteína  $\beta$ -Catenina es un factor clave en el mantenimiento de la integridad BHE y la homeostasis del SNC (Tran *et al.* 2016).

En nuestros resultados determinamos que la respuesta proinflamatoria de las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón estimuladas diferentes concentraciones MOI de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, LC y LPS no presentó cambios significativos en la cantidad de ARNm para las citocinas IL-10 e IL-6 a las 24 horas evaluadas. En la expresión de TNF- $\alpha$  se observó aumento con los estímulos de LC y LPS, siendo mayor para el LPS a las 24 horas. Y finalmente para la expresión de la quimiocina MCP-1 también se encontró un aumento cuando se estimuló con LC, LPS, MOI 5 y 100 de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, siendo mayor la expresión para la concentración de MOI 100 a las 24 horas.

Mendoza en el 2018, encontró aumento de los niveles IL-8 a MOI 100 y un descenso de los niveles de MCP-1 a MOI 100 y 1 de infección de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83

(gingipainas) en células HCAEC (Mendoza 2018). Kobayashi-Sakamoto *et al.* en el 2003, reportó resultados similares a los anteriores, donde los niveles de proteína IL-8 y MCP-1 disminuyeron en respuesta a la infección con *Porphyromonas gingivalis* cepa 381 sobre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Kobayashi-Sakamoto *et al.* 2003). Sin embargo, en el 2012 Rodrigues *et al.* evidenciaron en células endoteliales de arteria coronaria humana (HAEC), en diferentes cepas de *Porphyromonas gingivalis*: cepa 381 aumento de los niveles de MCP-1, IL-8, RANTES e IL-6; la cepa 33277 produjo niveles más altos de TNF- $\alpha$  y más MCP-1, IL-8, RANTES e IL-6; A7436 produjo la respuesta inflamatoria más pequeña a las 24 horas postinoculación (Rodrigues *et al.* 2012).

Velandia-Romero *et al.* demostraron que a las 24 horas postinfección MCP-1 estaba regulado al alza (casi 4000 veces) y también TNF- $\alpha$  (se reguló 340 veces) en células MBEC infectadas con D4MB-6 (variante del virus del dengue neuroadaptado)(Velandia-Romero *et al.* 2016).

Finalmente, en el 2010, Kitazume *et al.* demostró que las células endoteliales de cerebro humanos expresan proteína precursora de amiloide 770 (APP770). También demostraron que A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 se produjeron en BMEC, siendo mayor la producción de A $\beta$ 40. Por lo anterior, se genera la posibilidad de que los péptidos A $\beta$  endoteliales puedan ser la fuente de los depósitos de placas A $\beta$  en las paredes de los vasos cerebrales (Kitazume *et al.* 2010). En nuestros resultados pudimos demostrar de manera similar que el estudio de Kitazume *et al.* *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 genera producción de péptido A $\beta$ , encontrando la mayor producción en el estímulo de bacteria completa MOI 100 en células de microvasculatura de cerebro de ratón (resultados dosis no dependiente) (Figura 24).

A la fecha, este es el primer estudio donde se demuestra el efecto de la bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* W83, LPS y LC sobre la viabilidad, sobre el ciclo celular, sobre la expresión de las moléculas de unión estrecha y de adhesión, sobre la respuesta proinflamatoria y la producción de péptidos A $\beta$  en células de microvasculatura de cerebro de ratón.

## 11. Conclusiones

1. La bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* W83 indujo citotoxicidad y disminución en la viabilidad/supervivencia celular a las concentraciones de bacteria completa MOI: 100 y 200, y LC a la concentración de 20 µg/ml, en las células BMEC después de 48 horas, lo que nos demuestra el efecto tóxico y las alteraciones que puede producir este periodontopatógeno a de la BHE.
2. Es preciso resaltar que a las 48 horas en las tres concentraciones de LPS (1.0, 5.0 y 10 µg/ml) pareciera que se genera tolerancia.
3. La estimulación de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* W83 a concentraciones de MOI 100,10 y 5 y el LPS a concentraciones de 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml en las células BMEC produjo alteraciones en la distribución de las fases del ciclo celular, en la fase S a las 24 y 48 horas postinfección.
4. La estimulación con LC de *Porphyromonas gingivalis* generó un arresto biológicamente importante en fase G0/G1 aunque no fue estadísticamente significativo.
5. La infección de bacteria completa *Porphyromonas gingivalis* cepa W83 provocó alteración en la localización de las proteínas de unión estrecha principalmente β-Catenina, y también sobreexpresión en el marcaje en las proteínas de adhesión especialmente en V-CAM.
6. Se evidenció la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (TNF-α) y quimiocinas (MCP-1) en las diferentes concentraciones de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, lo que puede indicar que posiblemente se presentó un proceso de lesión o destrucción en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón.

7. La bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, el LPS y el LC generan producción de péptido A $\beta$ 42 en células BMEC, lo que conlleva a los procesos de neurotóxicos y neurodegenerativos, procesos claves en la enfermedad de Alzheimer.

## 12.Recomendaciones

1. Realizar estudios asociados con los procesos de producción del APP, fosforilación de Tau, que son mecanismos claves de la patogenia de EA, asociados a células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón con estímulos de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, el LPS y el LC.
2. Realizar estudios donde se pueda evaluar y determinar el tipo de apoptosis (temprana o tardía) como Anexina, para poder correlacionar los resultados de ciclo y viabilidad celular, asociados a células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón con estímulos de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83, el LPS y el LC
3. Utilizar una cepa de *Porphyromonas gingivalis* que no sea capsulada y con alta capacidad de inducir respuesta sobre la inflamación en las células endoteliales de microvasculatura de cerebro como *Porphyromonas gingivalis* cepa 381.
4. Ampliar el panel de citocinas proinflamatorias a evaluar, como por ejemplo: IL-8, IL-1, entre otras, y poder correlacionar los resultados.
5. Evaluar los niveles de la expresión de las citocinas y las quimiocinas para correlacionar con los resultados obtenidos en la expresión génica.

### **13. Financiación**

Este trabajo de grado para la Maestría de Ciencia Odontológicas, se encuentra asociado al proyecto titulado “Evaluación de la respuesta inflamatoria y funcional de células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón (MBEC) frente al estímulo de *Porphyromonas gingivalis* y su asociación con enfermedad de Alzheimer”, financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad el Bosque mediante la XI Convocatoria Interna para la Financiación de Proyectos de Investigación, Innovación Tecnológica e Investigación creación del 2019, modalidad general y clínica, código proyecto PCI-2019-10820.

## 14. Referencias Bibliográficas

1. Abbayya K, Puthanakar NY, Naduwinmani S, Chidambar YS. Association between periodontitis and alzheimer's disease. *N Am J Med Sci*. 2015;7(6):241–6.
2. Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CMS, Reichel A, Janigro D, Dombrowski SM, et al. Drug resistance in epilepsy: The role of the blood-brain barrier. *Novartis Found Symp*. 2002;243:38–53.
3. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010a;37(1):13–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
4. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41–53.
5. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*. 2002;200(6):629–38.
6. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis*. 2013;36(3):437–49.
7. Al-Obaidi MMJ, Desa MNM. Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial–Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2018;38(7):1349–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-018-0609-2>
8. Alata W, Ye Y, St-Amour I, Vandal M, Calon F. Human apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *jcbfm*. 2015;35(1):86–94.
9. Alehaideb Z, AlGhamdi S, Yahya WB, Al-Eidi H, Alharbi M, Alaujan M, et al. Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects of. *J Evid Based Integr Med* [Internet]. 2020;25:2515690X20978391. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33302699>
10. Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. Vol. 14(3). 2018.
11. Alzheimer's Association. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* [Internet]. 2019;15(3):321–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
12. Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*. 2021;17(3):327–406.

13. Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. Vol. 18, Alzheimer's and Dementia. 2022.
14. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(24):4969–76.
15. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2005;321(1):89–96.
16. Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Zvi AB, Bullock K, et al. Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis. *Neuron.* 2017;176(3):139–48.
17. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2012;122(7):2454–68.
18. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1977–82.
19. Armitage GC. Classifying periodontal diseases-a long-standing dilemma. *Periodontology.* 2000;30:9–23.
20. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 1999;1–6.
21. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2004;34:9–21.
22. Bachtiar EW, Putri CF, Soejoedono RD, Bachtiar BM. Expression of TNF, IL1B, and iNOS2 in the neural cell after induced by *Porphyromonas gingivalis* with and without coating antibody anti-*Porphyromonas gingivalis*. *F1000Res.* 2021;9:1–20.
23. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):1–13.
24. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 2011;10(9):819–28.

25. Bartels AL, Willemsen ATM, Kortekaas R, De Jong BM, De Vries R, De Klerk O, et al. Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA. *J Neural Transm.* 2008;115(7):1001–9.
26. Beard RS, Haines RJ, Wu KY, Reynolds JJ, Davis SM, Elliott JE, et al. Non-muscle Mlck is required for  $\beta$ -catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1 $\beta$ -mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *J Cell Sci.* 2014;127(8):1840–53.
27. Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, Larue B, Deane R, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal. *Neuron.* 2011;68(3):409–27.
28. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Bone* [Internet]. 2012;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
29. Bell RD, Zlokovic B V. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):103–13.
30. Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, et al. MSFD2A is critical for the formation and function of the blood brain barrier Ayal. *Nature.* 2014;509(7501):99–104.
31. Berzin TM, Zipser BD, Rafii MS, Kuo V, Yancopoulos GD, Glass DJ, et al. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. 2000;21:349–55.
32. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9238–42.
33. Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica.* 2005;(1):216–23.
34. Borsig L. Selectins in cancer immunity. *Glycobiology.* 2018;28(9):648–55.
35. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;333(1):1–9.
36. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer'S Disease. *Molecules.* 2020;10(7):1170.
37. Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR. The physiological roles of amyloid- $\beta$  peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(APR):1–16.
38. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* 2007;1130(1):17–30.

39. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* [Internet]. 2019;42(1):27–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
40. Buitrago Ramírez F, Ciurana Misol R, Chocrón Bentata L, Carmen Fernández Alonso M del, García Campayo J, Montón Franco C, et al. Prevención de los trastornos de la salud mental en atención primaria. Actualización PAPPs 2018. *Aten Primaria*. 2018;
41. Calderón-Peláez MA. Evaluación in vitro de la integridad de la Barrera Hematoencefálica y su alteración causada por el virus Dengue [Internet]. Vol. 123, *Journal of the American Chemical Society*. 2013. Available from: <https://shodhganga.inflibnet.ac.in/jspui/handle/10603/7385>
42. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* [Internet]. 2010;64(2):328–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.05.003>
43. Carlos T, Harlan J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84(7):2068–101.
44. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(3):S1–8.
45. Cell cycle – NIH: National Human Genome Research Institute, [Citado 24 de marzo de 2023]. Disponible en URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>. 2023. p. 2023.
46. Cerajewska TL, Davies M, West NX. Periodontitis: A potential risk factor for Alzheimer’s disease. *Br Dent J*. 2015;218(1):29–34.
47. Chang J, Mancuso MR, Maier C, Liang X, Yuki K, Yang L, et al. Gpr124 is essential for blood–brain barrier integrity in central nervous system disease. *Physiol Behav*. 2017;176(12):139–48.
48. Choi S, Kim K, Chang J, Kim SM, Kim SJ, Cho HJ, et al. Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer’s Disease or Vascular Dementia. *J Am Geriatr Soc*. 2019;67(6):1234–9.
49. Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, et al. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- $\beta$  deposition in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(11):3285–90.
50. Clark AG, Paluch E. Mechanics and Regulation of Cell Shape During the Cell Cycle [Internet]. Vol. 53, *Cell Cycle*. 2011. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-19065-0>

51. Congreso de la República de Colombia. Ley 142 de 1994 [Internet]. Julio 11 1994 p. 597. Available from: <http://www.acueducto.com.co>
52. Congreso de la República de Colombia. Ley 430 de 1998. 1998 p. 1–9.
53. Copani A, Guccione S, Giurato L, Caraci F, Calafiore M, Sortino M, et al. The Cell Cycle Molecules Behind Neurodegeneration in Alzheimers Disease: Perspectives for Drug Development. *Curr Med Chem*. 2008;15(24):2420–32.
54. Cortes-Canteli M, Paul J, Norris EH, Bronstein R, Ahn HJ, Zamolodchikov D, et al. Fibrinogen and  $\beta$ -Amyloid Association Alters Thrombosis and Fibrinolysis: A Possible Contributing Factor to Alzheimer’s Disease. *Neuron*. 2010;66(5):695–709.
55. Cunningham C, Hennessy E. Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: New experimental models adopting a broader paradigm in dementia research. *Alzheimers Res Ther*. 2015;7(1):33.
56. Custodia A, Ouro A, Romaus-Sanjurjo D, Pías-Peleteiro JM, de Vries HE, Castillo J, et al. Endothelial Progenitor Cells and Vascular Alterations in Alzheimer’s Disease. *Front Aging Neurosci*. 2022;13(1):1–11.
57. Daly BP, Eichen DM, Bailer B, Brown RT, Buchanan CL. Central Nervous System. *Encyclopedia of Human Behavior: Second Edition* [Internet]. 2nd ed. 2012;(2):454–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375000-6.00084-7>
58. Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St. John JA, Ekberg JAK, et al. Pathogens penetrating the central nervous system: Infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clin Microbiol Rev*. 2014a;27(4):691–726.
59. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012;72(5):648–72.
60. De La Torre JC. Is Alzheimer’s disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurology*. 2004;3(3):184–90.
61. Deczkowska A, Amit I, Schwartz M. Microglial immune checkpoint mechanisms. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018;21(6):779–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0145-x>
62. Dejana E, Orsenigo F. Endothelial adherens junctions at a glance. *J Cell Sci*. 2013;126(12):2545–9.

63. Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR, et al. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: Results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2235–42.
64. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: Implications for drug therapy. *Cell Transplant*. 2007;16(3):285–99.
65. Dias MC, Mapunda JA, Vladymyrov M, Engelhardt B. Structure and junctional complexes of endothelial, epithelial and glial brain barriers. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).
66. Dietmann A, Millonig A, Combes V, Couraud PO, Kachlany SC, Grau GE. Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on endothelial cells. *Microb Pathog* [Internet]. 2013;61–62:43–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2013.05.001>
67. Dioguardi M, Di Gioia G, Caloro GA, Capocasale G, Zhurakivska K, Troiano G, et al. The association between tooth loss and Alzheimer's disease: A systematic review with meta-analysis of case control studies. *Dent J (Basel)*. 2019;7(2).
68. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi 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):1–22.
69. Douberis M, Kotronis G, Thomann R, Polyzos SA, Boziki M, Gialamprinou D, et al. Impact of *Helicobacter pylori* on Alzheimer's disease: What do we know so far? *Helicobacter*. 2018;23(1):1–18.
70. Eikelenboom P, Van Exel E, Veerhuis R, Rozemuller AJM, Van Gool WA, Hoozemans JJM. Innate immunity and the etiology of late-onset Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2012;10(1–4):271–3.
71. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 – 2012. *Physiol Behav*. 2015;176(3):139–48.
72. Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL, et al. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front Aging Neurosci*. 2017;9(JUN):1–13.

73. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* 2009;31(4):497–511.
74. ENSAB-IV. IV Estudio Nacional De Salud Bucal - ENSAB IV- MINSALUD. Vol. 3, Bogotá, Colombia. 2014.
75. Erickson MA and, Banks WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *jcbfm.* 2013a;33(10):1500–13.
76. Erickson MA, Hartvigson PE, Morofuji Y, Owen JB, Butterfield DA, Banks WA. Lipopolysaccharide impairs amyloid beta efflux from brain: Altered vascular sequestration, cerebrospinal fluid reabsorption, peripheral clearance and transporter function at the blood-brain barrier. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2012;9(1):1. Available from: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-150>
77. Erickson MA, Hansen K, Banks WA. Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: Protection by the antioxidant N-acetylcysteine. *Bone.* 2012;23(1):1–7.
78. Farkas E, Luiten PGM. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. Vol. 64, *Progress in Neurobiology.* 2001.
79. Farrall AJ, Wardlaw JM. Blood-brain barrier: Ageing and microvascular disease - systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 2009;30(3):337–52.
80. Farrugia C, Stafford GP, Potempa J, Wilkinson RN, Chen Y, Murdoch C, et al. Mechanisms of vascular damage by systemic dissemination of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Journal.* 2021;288(5):1479–95.
81. Fernandez-Borja M, Van Buul JD, Hordijk PL. The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):202–10.
82. Fisher D, Gamielien K, Mafunda PS. Methamphetamine is not Toxic but Disrupts the Cell Cycle of Blood–Brain Barrier Endothelial Cells. *Neurotox Res.* 2015;28(1):8–17.
83. Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, et al. Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PLoS One.* 2014;9(8).
84. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology.* 1993;123(6 II):1777–88.

85. Gaillard PJ, De Boer AG, Breimer DD. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res.* 2003;65(1):24–31.
86. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia* [Internet]. 2016;12(4):459–509. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
87. Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: Is there an association? *Geriatr Gerontol Int.* 2015;15(4):391–404.
88. Geier E, Chen E, Webb A, Papp A, Yee S, Sadee W, et al. Profiling Solute Carrier Transporters in the Human Blood-Brain Barrier. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;43(5):909–32.
89. González-Mariscal L, Betanzos A, Ávila-Flores A. MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11(4):315–24.
90. González-Mariscal L, Quirós M, Díaz-Coránguez M. ZO proteins and redox-dependent processes. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(5):1235–53.
91. Gonzalez-Velasquez FJ, Kotarek JA, Moss\* and MA. Soluble Aggregates of the Amyloid- $\beta$  Protein Selectively Stimulate Permeability in Human Brain Microvascular Endothelial Monolayers. *Physiol Behav.* 2008;107(80):678–87.
92. Gosselet F, Loiola RA, Roig A, Rosell A, Culot M. Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochem Int* [Internet]. 2021;144(October 2020):104952. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104952>
93. Gualtero Escobar DF, Porrás Gaviria JP, Bernau Gutierrez S, Buitrago Ramírez DM, Castillo Perdomo DM, Lafaurie Villamil GI. Purificación y caracterización de lipopolisacáridos de *Eikenella corrodens* 23834 y *Porphyromonas gingivalis* W83 TT - Purification and characterization of lipopolysaccharide from *Eikenella corrodens* 23834 and *Porphyromonas gingivalis* W83. *Rev colomb biotecnol* [Internet]. 2014;16(1):34–44. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752014000100005&lng=pt&nrm=is&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752014000100005&lng=pt&nrm=is&tlng=es)
94. Gupta IR, Ryan AK. Claudins: Unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet.* 2010;77(4):314–25.

95. Haditsch U, Roth T, Rodriguez L, Hancock S, Cecere T, Nguyen M, et al. Alzheimer's Disease-Like Neurodegeneration in Porphyromonas gingivalis Infected Neurons with Persistent Expression of Active Gingipains. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2020;75(4):1301–17.
96. Hajishengallis G. Immune Evasion Strategies of Porphyromonas gingivalis. *J Oral Biosci* [Internet]. 2011;53(3):233–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1349-0079\(11\)80006-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1349-0079(11)80006-X)
97. Halliday MR, Rege S V., Ma Q, Zhao Z, Miller CA, Winkler EA, et al. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *jcbfm*. 2016;36(1):216–27.
98. Hao X, Li Z, Li W, Katz J, Michalek SM, Barnum SR, et al. Periodontal Infection Aggravates C1q-Mediated Microglial Activation and Synapse Pruning in Alzheimer's Mice. *Front Immunol*. 2022;13(2):1–15.
99. Hartmann T et al. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A $\beta$ 40/42 amyloid peptides. Group (New York) [Internet]. 1997;4:303–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585240>
100. Hartz AMS, Zhong Y, Wolf A, LeVine H, Miller D, Bauer B. A $\beta$ 40 reduces p-glycoprotein at the blood–brain barrier through the ubiquitin–proteasome pathway. *Journal of Neuroscience*. 2016;36(6):1930–41.
101. Hauser P, Wang S, Didenko V V. Apoptotic bodies: Selective detection in extracellular vesicles. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017.
102. Hawkins BT. The BBB/Neurovascular Unit in Health and Disease. . *Pharmacological Reviews* . 2005;57(2):173–85.
103. Hemonnot AL, Hua J, Ulmann L, Hirbec H. Microglia in Alzheimer disease: Well-known targets and new opportunities. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9(JUL):1–20.
104. Herrera D, Figuero E, Shapira L, Jin L, Sanz M. Clasificación de las enfermedades periodontales. *SEPA*. 2018;6(1):3–50.
105. Ho MH, Guo ZM, Chunga J, Goodwin JS, Xie H. Characterization of Innate Immune Responses of Human Endothelial Cells Induced by Porphyromonas gingivalis and Their Derived Outer Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;(10):6:139.

106. Holmer J, Eriksdotter M, Schultzberg M, Pussinen PJ, Buhlin K. Association between periodontitis and risk of Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and subjective cognitive decline: A case-control study. *J Clin Periodontol*. 2018;45(11):1287-98.
107. Hu Y, Li H, Zhang J, Zhang X, Xia X, Qiu C, et al. Periodontitis Induced by P. gingivalis-LPS Is Associated With Neuroinflammation and Learning and Memory Impairment in Sprague-Dawley Rats. *Front Neurosci* [Internet]. 2020;14. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
108. Huang J. Trastornos neurológicos - Generalidades sobre la función cerebral, Estados Unidos, MSD. [Internet]. Manual MSD Versión para profesionales. 2021. Available from: <https://www.msmanuals.com/es/professional/trastornosneurológicos/función-y-disfunción-de-los-lóbuloscerebrales/generalidades-sobre-la-función-cerebral>
109. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* [Internet]. 2012;148(6):1204-22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>
110. Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(3 49-3):1241-8.
111. Iadecola. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80(4):844-66.
112. Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, et al. Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2016;11(3):1-9.
113. Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One*. 2018;
114. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2010;7(8):656-64.
115. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, et al. Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis* [Internet]. 2017;3(1):1-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41514-017-0015-x>
116. Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, Mateos-Pérez JM, Evans AC, Weiner MW, et al. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun*. 2016;7(May).

117. Iwamoto N, Higashi T, Furuse M. Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell Struct Funct.* 2013;39(1):1–8.
118. Jaeger LB, Dohgu S, Sultana R, Lynch JL, Owen JB, Erickson MA, et al. Lipopolysaccharide alters the Blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: A mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer’s Disease. *Brain Behav Immun.* 2009;23(4):507–17.
119. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet.* 2018;392(10159):1789–858.
120. Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: An update. *J Neural Transm.* 2002;109(5–6):813–36.
121. Jungbauer G, Stähli A, Zhu X, Auber Alberi L, Sculean A, Eick S. Periodontal microorganisms and Alzheimer disease – A causative relationship? *Periodontol* 2000. 2022;89(1):59–82.
122. Kalaria RN. The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer’s disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;893:113–25.
123. Kalaria RN. The role of cerebral ischemia in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging.* 2000;21(2):321–30.
124. Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzik-Sobanska L, de Leon MJ. Inflammation and Alzheimer’s disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer’s and Dementia.* 2008;4(4):242–50.
125. Kanagasingam S, Chukkapalli SS, Welbury R, Singhrao SK. Porphyromonas gingivalis is a Strong Risk Factor for Alzheimer’s Disease. *J Alzheimers Dis Rep.* 2020;4(1):501–11.
126. Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* [Internet]. 1996;88(9):3259–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V88.9.3259.bloodjournal8893259>

127. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014;93(11):1045–53.
128. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal.* 2015;282(21):4067–79.
129. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. ‘Gum bug, leave my heart alone!’-epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res.* 2010;89(9):879–902.
130. Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P, Macmanus DG, Kendall BE, Kingsley DPE, et al. Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other mri signs of new lesions in multiple sclerosis: Pathogenetic and clinical implications. *Brain.* 1990;113(5):1477–89.
131. Kim H soo, Kim S, Shin SJ, Park YH, Nam Y, Kim C won, et al. Gram-negative bacteria and their lipopolysaccharides in Alzheimer’s disease: pathologic roles and therapeutic implications. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2021;10(1):1–23. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00273-y>
132. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s and Dementia* [Internet]. 2018;4:575–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
133. Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, et al. Brain endothelial cells produce amyloid  $\beta$  from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(51):40097–103.
134. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K. *Porphyromonas gingivalis* modulates the production of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 in human vascular endothelial cells. *Curr Microbiol.* 2003;46(2):109–14.
135. Kortekaas R, Leenders KL, Van Oostrom JCH, Vaalburg W, Bart J, Willemsen ATM, et al. Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* 2005;57(2):176–9.
136. Kristensson K. Microbes’ roadmap to neurons. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011;12(6):345–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3029>

137. KS K. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier Kwang. *Anal Chem.* 2008;25(4):368–79.
138. Kumar D, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, et al. Amyloid- $\beta$  Peptide Protects Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer’s Disease. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
139. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer’s disease. *Eur J Neurol.* 2018;25(1):59–70.
140. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports.* 2009;61(1):22–32.
141. Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, Girardi E, Vazquez S, D’Giano C. ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. *Epilepsia.* 2007;48(SUPPL. 5):140–9.
142. Li Q, Ouyang X, Lin J. The impact of periodontitis on vascular endothelial dysfunction. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12(September):1–11.
143. Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, Ni J, Hayashi Y, Takayama F, et al. Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
144. Ludwig RJ, Hardt K, Hatting M, Bistrrian R, Diehl S, Radeke HH, et al. Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *Immunology.* 2009;128(2):196–205.
145. Lue LF, Beach TG, Walker DG. Alzheimer’s Disease Research Using Human Microglia. *Cells.* 2019;8(8):1–19.
146. MacIntyre A, Abramov R, Hammond CJ, Hudson AP, Arking EJ, Little CS, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes the transmigration of monocytes through human brain endothelial cells. *J Neurosci Res.* 2003;71(5):740–50.
147. Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, Bravi L, Giampietro C, Corada M, et al. EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature.* 2013;498(7455):492–6.

148. Marroni M, Marchi N, Cucullo L, Abbott N, Signorelli K, Janigro D. Vascular and Parenchymal Mechanisms in Multiple Drug Resistance: a Lesson from Human Epilepsy. *Curr Drug Targets*. 2005;4(4):297–304.
149. Mawanda F, Wallace R. Can infections cause Alzheimer's disease? *Epidemiol Rev*. 2013;35(1):161–80.
150. Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya M del R. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogotá, Colombia: An epidemiological approach. *Biomedica*. 2007;27(1):21–33.
151. McManus RM, Heneka MT. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: New insights. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1).
152. McQuaid S, Cunnea P, McMahon J, Fitzgerald U. The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(1):329–31.
153. Meghil MM, Cutler CW. Oral microbes and mucosal dendritic cells, “spark and flame” of local and distant inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1–17.
154. Mendoza AFC. Comparación de la respuesta pro-inflamatoria de células endoteliales de arteria coronaria humana frente a *Porphyromonas gingivalis* W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional. 2018.
155. Merino-Zamorano C, Retana SF De, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, et al. Modulation of Amyloid- $\beta$ 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;53(2):677–91.
156. Minagar A, Alexander S. Blood-Brain Barrier Disruption in Multiple Sclerosis. *Multiple sclerosis*. 2003;9:540–9.
157. Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución 1362 de 2007 [Internet]. 2 De Agosto 2007 p. 1–10. Available from: <http://www.corpocaldas.gov.co/publicaciones/1524/02-28/Res1362de2007.pdf>
158. Ministerio de Salud y Protección Social MINSALUD. Boletín de salud mental Demencia [Internet]. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
159. Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 2676 de diciembre 22 de 2000. 2000 p. 1–76.
160. Ministerio de Salud. Resolución Número 8439. 4 de octubre 1993 p. 471–3.

161. Ministerio de Trabajo Y Seguridad Social. Resolución 2400 de 1979 [Internet]. 1979 p. 20. Available from: <https://minvivienda.gov.co/sites/default/files/normativa/2400 - 1979.pdf>
162. Ministerio de Vivienda Ciudad y Territorio de Colombia. Decreto 4741 de 2005. 2005 p. 1-15.
163. Ministerio del Medio Ambiente. Resolucion Numero 01164 De 2002 [Internet]. 6 de septiembre 2002 p. 1-7. Available from: <http://www.alianzaconsultoria.com/PDF/Resolucion 1164 gestion residuos.pdf>
164. Mittal R, Prasadarao N V. Nitric oxide/cGMP signalling induces Escherichia coli K1 receptor expression and modulates the permeability in human brain endothelial cell monolayers during invasion. *Bone* [Internet]. 2010;23(1):1-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
165. Mizee M, Nijland P, van der Pol S, Drexhage J, van het Hof B, Mebius R, et al. Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2014;128(5):691-703.
166. Mizee MR, Wooldrik D, Lakeman KAM, van het Hof B, Drexhage JAR, Geerts D, et al. Retinoic acid induces blood-brain barrier development. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(4):1660-71.
167. Mochida GH, Ganesh VS, Felie JM, Gleason D, Hill RS, Clapham KR, et al. A homozygous mutation in the tight-junction protein JAM3 causes hemorrhagic destruction of the brain, subependymal calcification, and congenital cataracts. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2010;87(6):882-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.10.026>
168. Moh C, Kubiak JZ, Bajic VladanP, Zhu X, Smith MA, and Hyoung-gon L. Cell Cycle Deregulation in the Neurons of Alzheimer's Disease. *Cell Cycle* [Internet]. 2011;53:31-73. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-19065-0>
169. Montagne A, Al. E. Blood-Brain Barrier Breakdown in the Aging Human Hippocampus. *Neuron*. 2014;85(2):296-302.
170. Muoio V, Persson P, Sendeski M. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol*. 2014;210(4):790-8.

171. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. Porphyromonas gingivalis: Major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014;2014.
172. Nakamura N, Yoshida M, Umeda M, Huang Y, Kitajima S, Inoue Y, et al. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from Porphyromonas gingivalis facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):59–67.
173. Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* [Internet]. 2013;587(13):2046–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010>
174. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D’Orazio LM, Pachicano M, et al. Blood–brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med*. 2019;25(2):270–6.
175. Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic and B V. Neurovascular Dysfunction and Neurodegeneration in Dementia and Alzheimer’s disease. *Physiol Behav*. 2017;176(5):139–48.
176. Nie R, Wu Z, Ni J, Zeng F, Yu W, Zhang Y, et al. Porphyromonas gingivalis Infection Induces Amyloid- $\beta$  Accumulation in Monocytes/Macrophages. *J Alzheimers Dis*. 2019;72(2):479–94.
177. Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, et al. Depletion of vitamin E increases amyloid  $\beta$  accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mousemodel of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(48):33400–8.
178. Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci*. 2010;112(2):251–4.
179. Nonaka S, Kadowaki T, Nakanishi H. Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis increase permeability in human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins. *Neurochem Int* [Internet]. 2022a;154:105282. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105282>

180. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):788–94.
181. Oishi M, Shimizu F, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Fujikawa S, et al. Difference in cytokines, chemokines and growth factors produced by blood–brain barrier- and blood–nerve barrier-composing cells. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2019;10(2):132–7.
182. Oki T, Takahashi S, Kuwabara S, Yoshiyama Y, Mori M, Hattori T, et al. Increased ability of peripheral blood lymphocytes to degrade laminin in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2004;222(1–2):7–11.
183. Olsen I, Singhrao SK. Is there a link between genetic defects in the complement cascade and *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol [Internet].* 2020;12(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1676486>
184. Olsen I, Taubman MA, Singhrao SK. *Porphyromonas gingivalis* suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis, and alzheimer's disease. *Journal of Oral Microbiology.* 2016.
185. OMS O. Trastornos neurológicos: un serio desafío para la salud pública en las Américas y en todo el mundo. Washington, D.C., 26 agosto (OPS). 2008.
186. Owen JB, Sultana R, Aluise CD, Erickson MA, Price TO, Bu G, et al. Oxidative modification to LDL receptor-related protein 1 in hippocampus from subjects with Alzheimer disease: Implications for A $\beta$  accumulation in AD brain. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1798–803.
187. Padden M, Leech S, Craig B, Kirk J, Brankin B, McQuaid S. Differences in expression of junctional adhesion molecule-A and  $\beta$ -catenin in multiple sclerosis brain tissue: Increasing evidence for the role of tight junction pathology. *Acta Neuropathol.* 2007;113(2):177–86.
188. Pan W, P. Stone K, Hsuchou H, K. Manda V, Zhang Y, J. Kastin A. Cytokine Signaling Modulates Blood-Brain Barrier Function. *Curr Pharm Des.* 2011;17(33):3729–40.
189. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89:S173–82.

190. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008;35(4):277–90.
191. Paré A, Mailhot B, Lévesque SA, Juzwik C, Doss PMIA, Lécuyer MA, et al. IL-1 $\beta$  enables CNS access to CCR2hi monocytes and the generation of pathogenic cells through GM-CSF released by CNS endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(6):E1194–203.
192. Paul D, Cowan AE, Ge S, Pachter and JS. Novel 3D analysis of Claudin-5 reveals significant endothelial heterogeneity among CNS microvessels. *Bone* [Internet]. 2013;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
193. Paul J, Strickland S, Melchor JP. Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer’s disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1999–2008.
194. Pazos P, Leira Y, Domínguez C, Pías-Peleteiro JM, Blanco J, Aldrey JM. Association between periodontal disease and dementia: A literature review. *Neurologia*. 2018;33(9):602–13.
195. Perrière N, Demeuse PH, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005;93(2):279–89.
196. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2006;1(3):223–36.
197. Petersen MA, Ryu JK, Akassoglou K. Fibrinogen in neurological diseases: Mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat Rev Neurosci*. 2019;19(5):283–301.
198. Poole S, Singhrao SK, Chukkapalli S, Rivera M, Velsko I, Kesavalu L, et al. Active invasion of porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in apoe-/- mice brains. In: *Handbook of Infection and Alzheimer’s Disease*. 2017a.
199. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean SJ. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer’s disease brain tissue. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2013;36(4):665–77.

200. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. Alzheimer's Disease International (ADI). 2016.
201. Pritchard AB, Crean SJ, Olsen I, Singhrao SK. Periodontitis, microbiomes and their role in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;9(10):1–10.
202. Pritchard AB, Fabian Z, Lawrence CL, Morton G, Crean SJ, Alder JE. An Investigation into the Effects of Outer Membrane Vesicles and Lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* on Blood-Brain Barrier Integrity, Permeability, and Disruption of Scaffolding Proteins in a Human in vitro Model. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2022;86(1):343–64.
203. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: Regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res.* 2014;355(3):607–19.
204. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *Journal of Experimental Medicine.* 2020;217(4):1–16.
205. Rajan KB, Ph D, Weuve J, Barnes LL, Ph D, Elizabeth A, et al. Cognitive Impairment in the United States ( 2020 – 2060 ). 2022;17(12):1966–75.
206. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* (1979). 2016;353(6301):777–83.
207. Renvert S, Ohlsson O, Pettersson T, Persson GR. Periodontitis: A Future Risk of Acute Coronary Syndrome? A Follow-Up Study Over 3 Years. *J Periodontol.* 2010;
208. Ricard N, Bailly S, Guignabert C, Simons M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2021;18(8):565–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-021-00517-4>
209. Richards D. Oral Diseases affect some 3.9 Billion people. *Nature.* Nature Publishing Group; 2020.
210. Rius-Pérez S, Tormos AM, Pérez S, Taléns-Visconti R. Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease? *Neurologia* [Internet]. 2018;33(2):121–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.07.010>

211. Riviere G, 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(2):113–8.
212. Roberts DJ, Goralski KB. A critical overview of the influence of inflammation and infection on P-glycoprotein expression and activity in the brain. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(10):1245–64.
213. Rodrigues PH, Reyes L, Chadda AS, Bélanger M, Wallet SM, Akin D, et al. *Porphyromonas gingivalis* Strain Specific Interactions with Human Coronary Artery Endothelial Cells: A Comparative Study. *PLoS One.* 2012;7(12).
214. Rokad F, Moseley R, Hardy RS, Chukkapalli S, Crean S, Kesavalu L, et al. Cerebral Oxidative Stress and Microvasculature Defects in TNF- $\alpha$  Expressing Transgenic and *Porphyromonas gingivalis* -Infected ApoE $^{-/-}$  Mice. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2017;60(2):359–69.
215. Sadrameli M, Bathini P, Alberi L. Linking mechanisms of periodontitis to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol.* 2020;33(2):230–8.
216. Saenz-Muñoz B. Evaluación del metabolismo de la Resazurina en función de la forma y tamaño de esferoides tumorales orales [Internet]. 2021. Available from: [https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/5956/Saenz\\_Muñoz\\_B\\_rayan\\_Alfonso\\_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/5956/Saenz_Muñoz_B_rayan_Alfonso_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
217. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, et al. Clearance of amyloid- $\beta$  by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 2007;13(9):1029–31.
218. Sagare AP, Bell RD, Zlokovic B V. Neurovascular dysfunction and faulty amyloid  $\beta$ -peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(10):1–17.
219. Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweert S, Pottiez G, Karamanos Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells.* 2020;9(4):1–13.
220. Salloway S, Gur T, Berzin T, Zipser B, Correia S, Hovanessian V, et al. Effect of APOE genotype on microvascular basement membrane in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2002;203–204:183–7.
221. Sanchez Reina A. Sistemas de secreción tipo VI (T6SS) en Rhizobiales. Estudio in silico del clúster de S. FREDII USDA257. 2020.

222. Sansores-España D, Carrillo-Avila A, Melgar-Rodriguez S, Díaz-Zuñiga J, Martínez-Aguilar V. Periodontitis and Alzheimers disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2021;26(1):e43–8.
223. Sanz M, Tonetti M. Periodontitis. *Orientación para clínicos*. EFP. 2019;2019:12.
224. Scheltens P, Strooper B De, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer ' s disease. 2022;397(10284):1577–90.
225. Scientific CTF. Membrane permeability / dead cell apoptosis kit with YO-PRO ® -1 and PI for flow cytometry. *Cell*. 2022.
226. Sengillo JD, Winkler EA, Walker CT, Sullivan JS, Johnson M, Zlokovic B V. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in alzheimer's disease. *Brain Pathology*. 2013;23(3):303–10.
227. Sharabi S, Bresler Y, Ravid O, Shemesh C, Atrakchi D, Schnaider-Beerli M, et al. Transient blood–brain barrier disruption is induced by low pulsed electrical fields in vitro: an analysis of permeability and trans-endothelial electric resistivity. *Drug Deliv [Internet]*. 2019;26(1):459–69. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1571123>
228. Shimizu Y, Iwasaki T, Tajima T, Yuba E, Kono K, Watarai S. Induction of antibody response in the oral cavity of dogs following intraocular (eye drop) immunization with *Porphyromonas gingivalis* cell lysate incorporated in pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2017;79(2):290–8.
229. Siddiqui H, Eribe ER, Singhrao SK, Olsen I. High Throughput Sequencing Detect Gingivitis And Periodontal Oral Bacteria In Alzheimer's Disease Autopsy Brains. *Neuro Research*. 2019;1(1).
230. Singhrao SK, Chukkapalli S, Poole S, Velsko I, Crean SJ, Kesavalu L. Chronic porphyromonas gingivalis infection accelerates the occurrence of age-related granules in ApoE-/- mice brains. *J Oral Microbiol*. 2017;9:1.
231. Singhrao SK, Harding A, Poole S, Kesavalu L, Crean SJ. *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. *Mediators of Inflammation*. 2015.

232. Singhrao SK, Olsen I. Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2019;11(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563405>
233. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol*. 1986;1(1):48–55.
234. Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(7):996–1009.
235. Spampinato SF, Merlo S, Fagone E, Fruciano M, Barbagallo C, Kanda T, et al. Astrocytes modify migration of pbmcs induced by  $\beta$ -amyloid in a blood-brain barrier in vitro model. *Front Cell Neurosci*. 2019;13(July):1–12.
236. Ss S, Ad H, Ma C, Kent SC. Microbial complexes in subgingival plaque - Socronsky - *J Clin Perio* 1998. 1998;
237. Starr JM, Farrall AJ, Armitage P, McGurn B, Wardlaw J. Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Res Neuroimaging* [Internet]. 2009;171(3):232–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychresns.2008.04.003>
238. Steed E, Rodrigues NTL, Balda MS, Matter K. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*. 2009;10:1–14.
239. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ 1-42 across the blood-brain barrier. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(1):123–36.
240. Straka M, Trapezanlidis M. Periodontitis and stroke. *Neuroendocrinology Letters*. 2013.
241. Sun L, Zhou R, Yang G, Shi Y. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(4):E476–85.
242. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic B V. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015;35(7):1055–68.

243. Tai LM, Loughlin AJ, Male DK, Romero IA. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid- $\beta$ . 2009;29(6):1079–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2009.42>
244. Teixeira FB, Saito MT, Matheus FC, Prediger RD, Yamada ES, Maia CSF, et al. Periodontitis and alzheimer's disease: A possible comorbidity between oral chronic inflammatory condition and neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* 2017;9(OCT):1–9.
245. Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho Signaling and Tight Junction Functions. *Physiology.* 2010;25(1):16–26.
246. Thermo Fisher S. ELISA Technical guide and protocols. Thermo Scientific [Internet]. 2012;65(815):1–14. Available from: [www.thermo.com/pierce](http://www.thermo.com/pierce)
247. Thermo Fisher S. Human A $\beta$ 42 ELISA Kit. Vol. 3441. 2019.
248. Thermo Fisher Scientific. TRIzol Reagent User Guide - Pub. no. MAN0001271 - Rev. A.0. User Guide. 2016;15596018(15596026):1–6.
249. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology.* 2015;209(4):493–506.
250. Tiwari S, Venkata A, Kaushik A, Adriana Y, Nair M. Alzheimer ' s Disease Diagnostics And Therapeutics Market. *Int J Nanomedicine .* 2019;14:5541–54.
251. Tohidpour A, Morgun A V., Boitsova EB, Malinovskaya NA, Martynova GP, Khilazheva ED, et al. Neuroinflammation and infection: Molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(JUN).
252. Toledo JB, Arnold SE, Raible K, Brettschneider J, Xie SX, Grossman M, et al. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain.* 2013;136(9):2697–706.
253. Tran KA, Zhang X, Predescu D, Huang X, Machado RF, Göthert JR, et al. Endothelial  $\beta$ -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Homeostasis. *Physiol Behav.* 2016;176(3):139–48.
254. Triet M. Bui, Hannah L. Wiesolek RS. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Physiol Behav.* 2014;63(8):1–18.

255. Troncoso MF, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, Sanhueza-Olivares F, Guerrero-Moncayo A, Chiong M, et al. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021;1867(9).
256. Uwamori H, Ono Y, Yamashita T, Arai K, Sudo R. Comparison of organ-specific endothelial cells in terms of microvascular formation and endothelial barrier functions. *Microvasc Res* [Internet]. 2019;122:60–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.11.007>
257. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO Journal.* 2012;31(12):2714–36.
258. Van De Haar HJ, Burgmans S, Jansen JFA, Van Osch MJP, Van Buchem MA, Muller M, et al. Blood-brain barrier leakage in patients with early Alzheimer disease. *Radiology.* 2016;281(2):527–35.
259. Vargas AM (2022). E de P gingivalis sobre la regulación de ciclo neuronal y producción de péptidos A amiloide en células neuronales SR de: <http://hdl.handle.net/20.500.12495/8695>. EFECTO DE Porphyromonas gingivalis SOBRE LA REGULACIÓN DE CICLO NEURONAL Y PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS AB AMILOIDE EN CÉLULAS NEURONALES SHSY5Y. 2022.
260. Velandia-Romero ML, Calderón-Peláez MA, Castellanos JE. In vitro infection with dengue virus induces changes in the structure and function of the mouse brain endothelium. *PLoS One.* 2016;
261. Veldhuis WB, Floris S, Van der Meide PH, Vos IMP, De Vries HE, Dijkstra CD, et al. Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2003;23(9):1060–9.
262. Verma A, Azhar G, Zhang X, Patyal P, Kc G, Sharma S, et al. P. gingivalis-LPS Induces Mitochondrial Dysfunction Mediated by Neuroinflammation through Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2).
263. Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, Banks WA. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun.* 2006;20(5):449–55.

264. Viafara-García SM, Morantes SJ, Chacon-Quintero Y, Castillo DM, Lafaurie GI, Buitrago DM. Repeated Porphyromonas gingivalis W83 exposure leads to release pro-inflammatory cytokines and angiotensin II in coronary artery endothelial cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
265. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral Amyloid Angiopathy in the Elderly Anand. *Bone* [Internet]. 2008;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
266. Wang RPH, Ho YS, Leung WK, Goto T, Chang RCC. Systemic inflammation linking chronic periodontitis to cognitive decline. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2019;81(January):63–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.002>
267. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces blood-brain barrier disruption by downregulating sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One*. 2014;9(10):1–8.
268. Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J, Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Bone* [Internet]. 2012;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
269. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013;12(8):822–38. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70124-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70124-8)
270. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta Biomembr* [Internet]. 2009;1788(4):842–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022>
271. Willis C, Davis T. Chronic Inflammatory Pain and the Neurovascular Unit: A Central Role for Glia in Maintaining BBB Integrity? *Curr Pharm Des*. 2008;14(16):1625–43.
272. Winning L, Patterson CC, Cullen KM, Stevenson KA, Lundy FT, Kee F, et al. The association between subgingival periodontal pathogens and systemic inflammation. *J Clin Periodontol*. 2015;
273. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, et al. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during

- experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2003;105(6):586–92.
274. Wu Z, Ni J, Liu Y, Teeling JL, Takayama F, Collcutt A, et al. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2017;65:350–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.002>
275. Yu H, Wu J. Amyloid- $\beta$ : A double agent in Alzheimer's disease? *Biomedicine and Pharmacotherapy* [Internet]. 2021;139(March):111575. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111575>
276. Zenaro E, Pietronigro E, Bianca V Della, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, et al. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med.* 2015;21(8):880–6.
277. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic B V, Angeles L. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. 2016;163(5):1064–78. Available from: <http://larepublica.pe/22-02-2005/farc-lanzan-ofensiva-de-atentados-para-sabotear-los-planes-de-uribe>
278. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, et al. Central role for PICALM in amyloid- $\beta$  blood-brain barrier transcytosis and clearance. 2016;18(7):978–87.
279. Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF- $\kappa$ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB Journal.* 2018;32(8):4070–84.
280. Zhou Y, Tao J, Yu H, Ni J, Zeng L, Teng Q, et al. Hcp family proteins secreted via the type VI secretion system coordinately regulate *Escherichia coli* K1 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* 2012;80(3):1243–51.
281. Zlokovic B V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. 2005;28(4).
282. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Bone* [Internet]. 2014;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>

## **Anexos 1.**

*Lista de las concentraciones de los anticuerpos primarios utilizados en los análisis inmunocitoquímicos.*

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Origen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Marca</b>
<b>ZO-3</b>	Conejo	1:800	Cell signaling
<b>B-Cat</b>	Conejo	1:800	Cell signaling
<b>VCAM</b>	Conejo	1:200	Santa cruz
<b>ICAM</b>	Cabra	1:200	Santa cruz
<b>PECAM</b>	Conejo	1:100	Santa cruz
<b>E-Selectina</b>	Conejo	1:200	Santa cruz

## Anexo 2.

### *Lista de las secuencias de los primers empleados en los ensayos de expresión génica.*

Proteína		Primers (5'-->3')	Amplicón (pb)	Secuencia (NCBI)	N.º de Ciclos	
Citocinas	IL-10	forward	GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT	MH644 036.1	40	
		reverse	ATG GTT CCT TCC GGT GGT			
	IL-6	forward	CCT CTT TGC TGC TTT CAC CA	120	NM_17 3923.2	40
		reverse	GAC AGC CAC TCA CCT CTT CA			
	TNF- $\alpha$	forward	TGA AGG GAA TGG GTG TTC AT	142	NM_01 3693.2	40
		reverse	GAG TTG GAC CCT GAG CCA TA			
Quimiocinas	MCP-1	forward	AGC ACC AGC CAA CTC TCA CT	136	NM_01 1333.3	40
		reverse	CGT TAA CTG CAT CTG GCT GA			
Housekeepin	$\beta$ -actina	forward	ATC CTC TTC CTC CCT GGA GA	233	NM_00 7393.3	40
		reverse	TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA			