

**EFFECTO DE *Porphyromonas gingivalis* SOBRE LA REGULACIÓN DE CICLO NEURONAL Y
PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS AB AMILOIDE EN CÉLULAS NEURONALES SHSY5Y**

Ana María Vargas Correa

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE PERIODONCIA Y MEDICINA ORAL - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC. JULIO 2022**

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Especialización en Periodoncia y Medicina Oral
Título	Efecto de <i>Porphyromonas gingivalis</i> sobre la regulación de ciclo neuronal y producción de péptidos A β amiloide en células neuronales SHSY5Y
Grupo de Investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral – UIBO
Línea de investigación	Medicina periodontal -- Biotecnología
Tipo de investigación:	Posgrado – Grupo de Investigación
Estudiantes/ residentes:	Ana María Vargas Correa
Director:	Dra. Diana Marcela Buitrago Ramírez
Codirector:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Análisis y Asesor estadístico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
NATALIA RUÍZ ROGERS	Vicerrector(a) Académico
RICARDO ENRIQUE GUTIÉRREZ MARÍN	Vicerrector Administrativo
GUSTAVO SILVA CARRERO	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MIGUEL FERNANDO VARGAS DEL CAMPO	Director Programa de Posgrado de Periodoncia y Medicina Oral
MARIA ALEJANDRA SABOGAL BASSIL	Coordinador Programa Posgrado de Periodoncia y Medicina Oral

“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 mejor amigo y mi gran amor Daniel.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Doctora Diana Marcela Buitrago, por su ayuda, su paciencia y su entrega total a este proyecto.

A mi codirectora, la Doctora Gloria Lafaurie, por creer en mí y permitirme crecer personal y profesionalmente.

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 y apoyo en la estandarización y obtención del inóculo bacteriano y lisado de *P. gingivalis* W83.

A las Dras. Myriam Velandia y María Angelica Calderón del Instituto de Virología de la Universidad El Bosque por la donación y apoyo en el mantenimiento del cultivo de las células SHSH5Y.

A la Dra. Sandra Perdomo y al estudiante de maestría Roberto Méndez de grupo INMUBO de la Universidad El Bosque por su apoyo y colaboración por sus enseñanzas en la estandarización y aprendizaje de los programas para el análisis de los resultados de ciclo celular y Anexina V.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
	Pág.
1.Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Planteamiento del problema	28
4. Justificación	31
5. Situación Actual	34
6. Objetivos	37
6.1 Objetivo general	37
6.2 Objetivos específicos	37
7. Metodología del Proyecto	38
7.1. Tipo de estudio	38
7.2. Población y muestra	38
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	38
7.4. Plan de tabulación y análisis.	44
a. Hipótesis estadísticas (alterna y nula)	44
b. Análisis estadístico	45
8. Consideraciones éticas.	46
9. Impacto ambiental	47
10. Resultados	48
11. Discusión	56
12. Conclusiones	60
13. Recomendaciones	61
14. Financiación	62
15. Referencias bibliográficas	63

LISTADO DE ABREVIATURAS

- APOE ϵ 4: Gen de susceptibilidad del alelo 4 de la apolipoproteína E.
- A β : Beta-amiloide (Placas beta-amiloides).
- BHE: Barrera hematoencefálica.
- BHI: Brain Heart Infusion.
- CAL: Pérdida clínica de inserción.
- CE: Células endoteliales.
- CIE10: Clasificación internacional de enfermedades edición 10.
- EA: Enfermedad de Alzheimer.
- ECA1: Enzima convertidora de la angiotensina I.
- ECM: Matriz extracelular.
- EDI: Enzima degradadora de insulina.
- EDTA: Acido etilendiaminotetraacético.
- EM: Esclerosis múltiple.
- EP: Enfermedad de Parkinson.
- Gen APOE: Gen de la Apolipoproteína E.
- IFN: Interferón.
- IL: Interleuquinas.
- kDa: KiloDalton.
- Kgp: Lisina-gingipaína.
- LPS: Lipopolisacáridos.
- MMP: Metaloproteinasas de matriz.
- MOI: Multiplicidad de infección.
- NFT: Ovillos neurofibrilares.
- OCDE: Organización para la cooperación y el desarrollo económico.
- OMS: Organización mundial de la salud.
- PBS: Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino o buffer fosfato salino).
- PCD: Muerte celular programada.
- PGDH: Dihidroceramidas de fosfoglicerol.

- PPA: Proteína precursora amiloide.
- RgpA: Arginina-gingipaína A.
- RgpB: Arginina-gingipaína B.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- SASP: Marcadores de fenotipo secretor asociado a la senescencia.
- SNC: Sistema nervioso central.
- TLR: Receptor tipo Toll.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
Figura 1	Fisiopatología y contribuciones de amiloide- β y tau a la enfermedad de Alzheimer.	9
Figura 2	Principales procesos celulares y moleculares que contribuyen a la neurodegeneración.	12
Figura 3	Principales características neuropatológicas de la EA.	13
Figura 4	Hipótesis de los dos golpes de la EA.	16
Figura 5	Evolución de la Enfermedad Periodontal. Figura realizada por: Ana María Vargas.	17
Figura 6	Complejos Bacterianos.	18
Figura 7	Colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> , observada con microscopio estereoscópico de 4,5 aumento. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología oral, instituto UIBO, Universidad El Bosque).	19
Figura 8	Efectos de los factores de virulencia de <i>P. gingivalis</i> en la enfermedad de Alzheimer.	21
Figura 9	Enlace entre Periodontitis y Neuroinflamación.	23
Figura 10	Factores de riesgo compartidos entre la enfermedad periodontal y la EA.	25
Figura 11	Representación del análisis por citometría de flujo con células SHSH5Y marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC. Figura realizada por: Ana María Vargas.	42
Figura 12	Curva estándar de calibración kit amiloide A β 42 humano ELISA (KHB3544, Invitrogen). Figura realizada por: Ana María Vargas.	43
Figura 13	Viabilidad de células SHSY5Y expuesta a diferentes MOI de bacteria completa de <i>P. gingivalis</i> W83 por 24 horas. Figura realizada por: Ana María Vargas.	49
Figura 14	Efecto de <i>P. gingivalis</i> sobre la distribución de la línea celular SHSH5Y en las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2M) tratadas durante 24h a diferentes concentraciones de MOI Figura realizada por: Ana María Vargas.	51
Figura 15	Efecto de <i>P. gingivalis</i> sobre la apoptosis de células SHSH5Y tratadas durante 24h a diferentes concentraciones de MOI. Figura realizada por: Ana María Vargas.	53
Figura 16	Cuantificación de péptido A β 42 en células SHSH5Y estimuladas con la bacteria completa viva <i>P. gingivalis</i> . Figura realizada por: Ana María Vargas.	55
Figura 17	Modelo de la regulación del ciclo celular y la inducción de apoptosis, en células HTR-8 infectadas con <i>P. gingivalis</i> .	58

RESUMEN

EFFECTO DE *Porphyromonas gingivalis* SOBRE LA REGULACIÓN DE CICLO NEURONAL Y PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS AB AMILOIDE EN CÉLULAS NEURONALES SHSY5Y

Antecedentes: Actualmente la periodontitis es considerada factor de riesgo en la incidencia y desarrollo del Alzheimer. Se ha demostrado la presencia de especies patógenas como *P. gingivalis* y sus factores de virulencia, influyen en la producción e inducción de acumulación de péptidos A β en sangre, siendo todo esto de gran importancia para la fisiopatología del Alzheimer. También se ha informado que pacientes con trastornos neurodegenerativos muestran una regulación positiva de proteínas implicadas en el ciclo celular neuronal.

Objetivo: Evaluar el efecto de la bacteria completa de *P. gingivalis* sobre el ciclo neuronal y producción de péptidos A β en células neuronales (SHSY5Y).

Métodos: Es un estudio Experimental *in vitro* para evaluar el efecto de bacteria completa de *P. gingivalis* W83(ATCC® BAA-308) sobre células de neuroblastoma humano SHSY5Y (ATCC - CRL - 2266™. Se realizó cultivo bacteriano y estimulación con *P. gingivalis* en células SHSY5Y y se evaluó viabilidad por el método de rezasurina, el efecto sobre el ciclo celular y la apoptosis de células SHSY5Y mediante el método de Anexina V. Así mismo, se realizó medición de la secreción de A β 42 en células SHSH5Y estimuladas con *P. gingivalis*.

Resultados: Se pudo demostrar que la bacteria completa de *P. gingivalis* cepa W83, redujo casi en un 50% la viabilidad de las SHSY5Y a las concentraciones más altas durante 24 h. También se encontró que este patógeno produjo cambios en la distribución de las fases del ciclo celular. *P. gingivalis* indujo muerte celular con apoptosis temprana en las concentraciones de MOI: 5, 10, 50, 100 y lisado celular, y apoptosis tardía en las concentraciones de MOI: 5,10,100 y 200. La producción de péptido beta-amiloide fue dosis dependiente; a mayor MOI de *P. gingivalis* mayor producción de péptido.

Conclusiones: *P. gingivalis* indujo disminución en la viabilidad celular, también cambio la distribución de las fases del ciclo celular, muerte celular (apoptosis temprana o tardía) y produjo péptido beta-amiloidea de manera dosis dependiente.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer, *Porphyromonas gingivalis*, Células de neuroblastoma humano SHSY5Y, apoptosis y neurodegeneración.

ABSTRACT

EFFECT OF *Porphyromonas gingivalis* ON THE REGULATION OF THE NEURONAL CYCLE AND PRODUCTION OF AMILOID A β PEPTIDE IN SHSY5Y NEURAL CELLS

Background: Periodontitis is currently considered a risk factor in the incidence and development of Alzheimer. It has been shown that the presence of pathogens such as *P. gingivalis* influence production and induction of A β peptides in the blood, of great importance for the physiopathology of Alzheimer. It has also been informed that patients with neurodegenerative conditions show a positive regulation of proteins in the neuronal cell cycle.

Objective: to evaluate the effect of the complete *P. gingivalis* bacteria on the neuronal cycle and A β peptide production of neuronal cells (SHSY5Y).

Methods: Experimental *in vitro* study of human SHSY5Y (ATCC - CRL - 2266™) neuroblastoma cells and the complete *P. gingivalis* W83 (ATCC® BAA-308) bacteria. A culture was inoculated with *P. gingivalis* W83, stimulated with *P. gingivalis* SHSY5Y, viability of SHSH5Y stimulated with *P. gingivalis* W83 by resazurin method, evaluation of the effect of *P. gingivalis* on the cycle of SHSY5Y, evaluation of the effect of *P. gingivalis* on the apoptosis of SHSY5Y by means of annexin V and measurement of secretion of A β 42 on SHSH5Y stimulated with *P. gingivalis*. **Results:** It was demonstrated that the complete *P. gingivalis* W83 bacteria reduced by almost 50 % the viability of SHSY5Y in the highest MOI concentrations during 24 hours. It was also found the said pathogen produced changes in the phase distribution of the cell cycle. *P. gingivalis* induced celular death, early apoptosis in 5, 10, 50, 100 and cell lysate MOI concentrations; late apoptosis in 5,10, 100 and 200 MOI concentrations. The production of A β peptides is a dependant dose proportional with the amount of MOI *P. gingivalis*. **Conclusions:** *P. gingivalis* induced cellular viability, changed the distribution of cellular cycles, cellular death (early or late apoptosis) and produced A β peptides increasing the MOI concentrations.

Key words: Alzheimer disease, *Porphyromonas gingivalis*, SHSY5Y human neuroblastoma cells, apoptosis and neurodegeneration.

1. Introducción

Se ha demostrado mediante estudios epidemiológicos que la enfermedad periodontal en estadios moderados y avanzados, puede contribuir o es un factor de riesgo y juega un papel potencial en la etiología, progresión y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA), se requieren más investigaciones y/o estudios que proporcionen un marco conceptual sobre todos estos mecanismos de asociación entre estas dos patologías que día a día aumenta su tasa de prevalencia a nivel mundial.

Actualmente, se han estudiado varios modelos experimentales que explican la patología de la EA con diferentes causas de aparición y progresión, sin embargo, se considera que la neuroinflamación juega un papel central en las hipótesis de la cascada amiloide y la proteína Tau τ , causando al final una disfunción axonal que genera una mayor acumulación de A β en los espacios sinápticos. Se plantean varias hipótesis, entre ellas que las citoquinas proinflamatorias y algunos marcadores sistémicos de inflamación derivados de la infección periodontal pueden perturbar la regulación del ciclo celular neuronal y favorecer la producción de péptidos Beta-amiloide y aumentar la proteína precursora amiloide (PPA) en sangre, alterando así al homeostasis en el cerebro, pues ya algunos estudios han demostrado la presencia de especies patógenas como *Porphyromonas gingivalis* y sus factores de virulencia, siendo todo esto de gran importancia para la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (D'Andrea *et al.*, 2001; Rius-Pérez *et al.*, 2018 & Zeng *et al.*, 2020). También existe otra hipótesis que es la degeneración sináptica, que como resultado produce la disminución cognitiva y finalmente la muerte celular, mediante apoptosis o necrosis (Gorman 2008).

Patógenos periodontales como *P. gingivalis* pueden inducir disfunción endotelial y aumentar la producción de A β , es importante determinar los cambios en el ciclo celular, la producción de citoquinas proinflamatorias y la producción y acumulación de péptidos A β en células de neuroblastoma humano SHSY5Y, dado que solo existen pocas hipótesis sobre la fisiopatología de la EA asociada a la enfermedad periodontal y a su vez poder identificar posibles dianas terapéuticas útiles para el desarrollo de fármacos que puedan ser usados como tratamiento del Alzheimer.

El propósito de este estudio fue, evaluar el efecto de la bacteria completa viva de *P. gingivalis* sobre la viabilidad, metabolismo, ciclo celular, producción y acumulación de péptidos A β en células neuronales SHSY5Y.

2. Marco Teórico o Conceptual

2.1. *Enfermedades neurodegenerativas: Enfermedad del Alzheimer:*

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto heterogéneo de trastornos cuyo desarrollo suele ser lento y progresivo, estas se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas asociadas con el depósito de proteínas que muestran propiedades fisicoquímicas alteradas en el cerebro y en los órganos periféricos. Las proteínas más frecuentemente involucradas en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas son amiloide- β , proteína priónica, tau, α -sinucleína, proteína de unión a ADN TAR y proteína de sarcoma fusionada (Kovacs 2018).

Estos trastornos se definen como afecciones relacionadas con la herencia y con la edad, suelen ser de tipo esporádicos o genético y tienen características clínicas como el deterioro cognitivo, mala memoria, dificultad para aprender, ataxias (problemas en los movimientos) y demencias; todo esto hace que la persona no funcione de forma independiente o autónoma. Los trastornos neurodegenerativos más frecuentes y problemáticos en los adultos mayores son: La enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias, cáncer cerebral, encefalitis, epilepsia, enfermedad de Parkinson (EP), accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas (Sochocka *et al.* 2017).

Según la organización mundial de la salud: “La demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores o de la tercera edad en el mundo entero. La mayoría de los casos de demencia las personas que se hacen cargo son familiares. La demencia es un síndrome de naturaleza crónica/progresiva, caracterizado por que la función cognitiva se deteriora (es decir, la capacidad para procesar el pensamiento) más allá de lo que podría considerarse una consecuencia normal del envejecimiento. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje, el juicio, pero la conciencia no se ve afectada. La pérdida de la función cognitiva suele ir acompañado, y en la mayoría de los casos es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social y la motivación” (OMS).

En el 2019, la asociación de Alzheimer define: “la demencia por enfermedad de Alzheimer se refiere a un inicio y curso particular de deterioro cognitivo y funcional asociado con la edad que finalmente resulta en la muerte” (2019 Alzheimer’s disease facts and figures, 2019 & Soria Lopez *et al.*, 2019). El primer caso de Alzheimer fue descrito por primera vez por Alois Alzheimer en 1906 cuando describió el caso de Auguste Deter, una mujer de 51 años con trastornos cognitivos, desorientación, delirios y otros cambios de comportamiento a quien vio por primera vez en 1901 (Möller and Graeber 1998).

2.2. *Epidemiología de la Enfermedad del Alzheimer:*

Según la organización mundial de la salud y la organización del Alzheimer: “La demencia afecta a nivel mundial a unos 50 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos bajos y medios. Cada año se diagnostican cerca de 10 millones de nuevos casos aproximadamente. Se calcula que entre un 5% y un 8% de la población general de 60 años o más (adultos mayores) sufren de demencia. Se prevé que el número total de personas con demencia para el 2030 llegue a los 82 millones y para el 2050 unos 152 millones de casos. Este incremento se cree que puede achacarse al hecho de que en los países de ingresos bajos y medios el número de personas con demencia tenderá a aumentar con el pasar de los años.”

Los factores de riesgo juegan un papel muy importante y cada vez más fuertes para la enfermedad de Alzheimer, estos son la edad avanzada (mayores de 65 años), tener al menos un alelo *APOE* ϵ 4 y ser mujer (especialmente después de los 80 años). Dentro de la fisiopatología de la enfermedad sabemos que las mujeres también son más propensas a tener una carga de tau más alta, a pesar de tener una carga de β amiloide similar, que los hombres. También, los factores de riesgo cardiovascular y un estilo de vida poco saludable se han asociado con un mayor riesgo de demencia (Soria Lopez *et al.* 2019).

Por otro lado, la Comisión Lancet, estimo que para la Prevención de la Demencia, existen 12 factores de riesgo modificables, que juntos representan aproximadamente el 40 % del riesgo mundial de cualquier tipo de demencia, esto incluye a la enfermedad de Alzheimer. Esto es de gran relevancia, ya que de este modo podríamos disminuir riesgo a través de un enfoque de intervención en el estilo de vida (Scheltens *et al.* 2022). Si tomamos como referencia Inglaterra y Gales, la demencia es la principal causa de muerte en general, representada con el 11.6% de las muertes registradas para el 2015 (Lane *et al.* 2018). En los Estados Unidos entre 2000 y 2017, las muertes por accidente cerebrovascular, la enfermedad cardíaca y el cáncer de próstata disminuyeron, mientras que las muertes reportadas por AD aumentaron 145% (Gaugler *et al.* 2016; Benefits 2018; 2019 Alzheimer's disease facts and figures 2019; Impairment 2022).

En México, se encontró que la demencia fue 6.1 % en la población de 60 años y más, con una tasa de incidencia estimada de 27.3 por 1.000 años-persona para demencia. Por otra parte, también se encontró que las tasas de prevalencia de demencia disminuyen con mayor nivel educativo y que la hipertensión, diabetes y la depresión fueron factores de riesgo para la demencia. El World Alzheimer Report 2015, estimó que en 2015 había poco más de 800,000 personas con demencia en México, y de estos 64% eran mujeres, con base a esto se estima que para 2030, el número de personas aumente a poco más de 1,5 millones. Con respecto a los factores de riesgo de demencia, México tiene tasas particularmente altas de obesidad: entre 2000 y 2012 las tasas de personas consideradas con sobrepeso u obesidad aumentó de 62.3% a 71.3% de los adultos población, y uno de cada tres niños tiene sobrepeso u obeso. La diabetes también está aumentando rápidamente, afectando 15.9% de los adultos, más del doble del promedio de la OCDE del 6,9% (OCDE,2016)(Gaur and Agnihotri, 2015 & Prince *et al.*, 2016).

En Colombia en la base de datos de SISPRO, se encontró que, si se agrupan todos los diagnósticos CIE10 vinculados a demencia, se encuentra que en la serie disponible (2009 a 2015), se atendieron un total de 252.577 personas con algún tipo de diagnóstico de demencia en el país, de los cuales, el 64,1% fueron mujeres y el 35,9% fueron hombres. El diagnóstico

de demencia más frecuentemente registrado en todos los servicios de salud es la demencia no especificada (CIE10: F03X), se reportaron 86,610 personas atendidas con este diagnóstico para los años del 2009 al 2015, el 63,1% corresponde al sexo femenino y el 36,9% del masculino, con un promedio de 12.373 personas atendidas cada año. La tendencia que se observo fue que en el año 2014 hubo un ascenso significativo, por lo cual se podría decir que fue un año atípico, ya que se da el mayor incremento en las atenciones de un año al otro, para el 2015 las cifras disminuyen (Boletín de Salud Mental No 3, 2017).

2.3. *Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer:*

La fisiopatología de la EA sigue siendo objeto de controversia, pero existen dos actores importantes que a menudo se nombran en su desarrollo y progresión de esta, y son las placas amiloideas y los ovillos neurofibrilares.

2.3.1. *Hipótesis de las Placas Beta-amiloide:*

Las placas seniles o placas amiloideas de la enfermedad de Alzheimer son depósitos extracelulares que están compuestas por neuronas distróficas y/o degeneradas, microglías y astrocitos, pero su componente principal es el péptido beta-amiloide, un producto derivado de la proteína precursora amiloide (APP) (Rius-Pérez *et al.* 2018). Esta es una proteína transmembrana clasificada como tipo 1, a la que se atribuye un papel importante durante el desarrollo embrionario del SNC y periférico, actúa como molécula de adhesión intercelular en la formación de sinapsis en el SNC, en la unión neuromuscular y en la migración de los precursores neuronales hacia la corteza cerebral (Nalivaeva and Turner, 2013 & Zhang and Song, 2013).

Se conocen tres tipos de placas: las placas difusas: son depósitos de péptido amiloide no fibrilar que no altera el neuropilo, ni induce una respuesta glial por lo que no genera un deterioro cognitivo. Las placas amiloideas: tienen un centro denso y las placas neuríticas: son

de naturaleza toxica en la enfermedad de Alzheimer. La naturaleza química de estas placas es el péptido beta-amiloide. Existen dos diferentes tipos de este péptido: el βA_{40} y el βA_{42} : los cuales tienen su origen como producto del catabolismo de la APP a cargo de las enzimas β y γ -secretasas. βA_{42} es más toxico y forma más agregados y placas con mayor facilidad (Kamer *et al.* 2015).

En condiciones normales se producen niveles bajos del péptido βA tanto de βA_{40} como de βA_{42} . Estos dos péptidos tienen propiedades fisicoquímicas diferentes. βA_{42} con una mayor tendencia a polimerizar, formando así oligómeros solubles que a su vez se acumulan en protofibrillas, que siguen siendo solubles. De forma fisiológica su concentración está regulada, teniendo un equilibrio entre su generación y su eliminación por parte de enzimas que son encargadas de degradar como la neprilisina, la enzima degradadora de insulina (EDI) y la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA1) (Tanzi and Bertram 2005).

Los eventos negativos se desencadenan por el desequilibrio entre la formación y la eliminación de βA y su posterior acumulación (disfunción sináptica, inflamación glial, hiperfosforilación, agregación de τ en ovillos, entre otros), lo que desemboca en la muerte neuronal (Rius-Pérez *et al.* 2018). El proceso paso a paso es el siguiente: En la membrana celular de una neurona, tenemos una molécula llamada proteína precursora amiloidea, o APP. Esta posee dos extremos, uno está al interior de la célula y el otro extremo está afuera de la célula. Se cree que esta proteína precursora amiloidea ayuda a que la neurona crezca y se repare a sí misma tras una lesión.

En normalidad: El APP como es una proteína se desgasta y con el paso del tiempo se descompone y se recicla. Generalmente, la degrada o fractura por decirlo de alguna forma, unas enzimas llamadas alfa-secretasa y gamma-secretasa. Cuando esta proteína es degradada, se convierte en un péptido que es soluble y se elimina, y todo está bien o no se presenta ningún tipo de alteración para causar enfermedad. Pero en anormalidad: Aparece otra enzima, que es la beta-secretasa, esta se asocia con la gamma-secretasa, causando un problema, porque degrada o fractura a la proteína APP en un diferente lugar, y este

fragmento sobrante no es soluble y crea un monómero llamado péptido beta-amiloide. Estos monómeros tienden a ser más pegajosos químicamente, de lo que debería ser en normalidad, estos se unen o se pegan justo fuera de las neuronas, y forman las llamadas placas beta-amiloide: que son cúmulos o acumulaciones de muchos de estos monómeros (Sadrameli *et al.* 2020).

Potencialmente, estas placas pueden interponerse entre las neuronas, lo que puede entorpecer la señalización entre neuronas. Si las neuronas no pueden señalizar ni transmitir información, esto afectaría las funciones cerebrales como la memoria. Se cree que estas placas pueden poner en marcha una respuesta inmunológica innata y causar inflamación dañando a neuronas vecinas. La placa amiloide puede depositarse alrededor de los vasos sanguíneos del cerebro, causando una afección llamada angiopatía amiloide, que debilita las paredes de los vasos sanguíneos y aumenta el riesgo de hemorragia, o ruptura y pérdida de sangra (Figura 1).

2.3.2. Hipótesis de la proteína Tau τ o los Ovillos neurofibrilares:

Otra parte importante de la enfermedad del Alzheimer son los ovillos neurofibrilares, y de hecho estos se encuentran dentro de las células (neurona), al contrario que las placas beta-amiloide. Al igual que otras células, las neuronas están unidas por su citoesqueleto, este está compuesto parcialmente por microtúbulos: estructuras parecidas a vías que en su esencia actúan como una carretera que transporta nutrientes y moléculas a lo largo de la célula o neurona. Una proteína especial llamada Tau se asegura de que estas vías o microtúbulos no se separen. Aunque no se comprende del todo, se cree que la acumulación de placa de péptido beta-amiloide afuera de la neurona abre vías dentro de la neurona, lo que lleva a la activación de la cinasa, una encima que transfiere grupos de fosfato a la proteína Tau. Después, la proteína Tau cambia de forma y deja de formar parte del soporte de los microtúbulos, y se agrupa con otras proteínas Tau, o se enreda y esto lleva a otro hallazgo característico de la enfermedad de Alzheimer que son los Ovillos neurofibrilares (Cárdenas *et al.*, 2012 & Huang and Mucke, 2012).

Las neuronas con ovillos neurofibrilares (interior) y placas beta-amiloideas (exterior) no pueden señalizar bien o realizar sus funciones bien, y a veces acaban sufriendo apoptosis o muerte celular programada. Al morir las neuronas, empiezan a haber cambios a gran escala en el cerebro: en primer lugar, el cerebro se atrofia: los pliegues se estrechan, que son las características elevaciones del cerebro. Al estrecharse estos, las hendiduras entre los pliegues se ensanchan, y con esto, los ventrículos, que son cavidades se llenan de líquido y también crecen (Figura 1.).

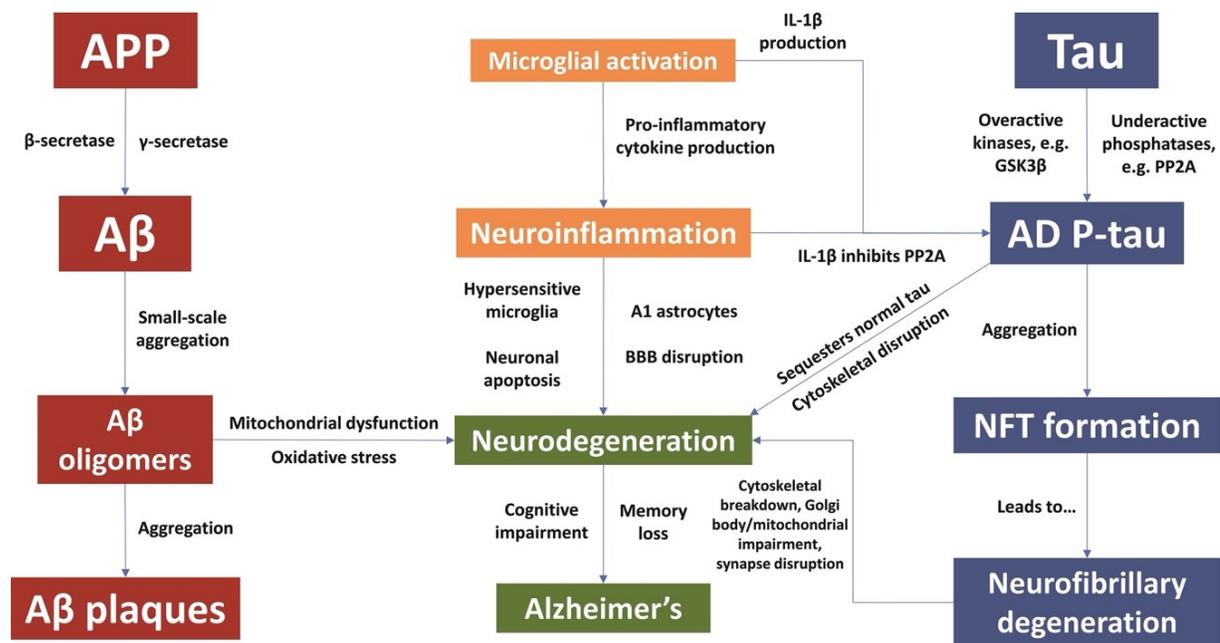


Figura 1: Fisiopatología y contribuciones de amiloide- β y tau a la enfermedad de Alzheimer. Tomado de: Seymour and Zhang 2022.

2.4. Clasificación de la enfermedad de Alzheimer:

La enfermedad de Alzheimer puede dividirse en dos grupos principalmente: 1) El tipo esporádico y 2) El tipo familiar.

2.4.1. Tipo Esporádico:

Se usa para describir la aparición tardía, donde la causa exacta no está muy bien definida y probablemente se trate de una combinación de factores genéticos y de riesgo ambiental. El esporádico representa a la amplia mayoría de casos. El riesgo aumenta considerablemente con la edad, afectando al 1% de las personas, entre 60-65 años y al 50% de más de 85 años (Sadrameli *et al.* 2020).

Un posible factor importante de riesgo para la enfermedad de Alzheimer de este tipo es el Gen de la Apolipoproteína E o Gen APOE. Los investigadores han demostrado que el riesgo de desarrollar mal de Alzheimer aumenta para los pacientes que heredan un alelo e4 (variante más agresiva). La apoproteína E ayuda a descomponer el péptido beta-amiloide, pero las variantes del gen APOE e4 parece ser menos eficaz que las otras variantes de este gen, como la variante del gen APOE-e2, lo que significa que es más probable que los pacientes desarrollen placas beta-amiloide. Pero de estas variantes del gen e2, e3 y e4 la variante más común asociada a la enfermedad de Alzheimer es la variante e3 (Bui *et al.*, 2019; Lane *et al.*, 2018 & Verghese *et al.*, 2011).

2.4.2. Tipo Familiar:

Se usa para describir casos en que se hereda algún gen dominante que acelera la progresión de la enfermedad, por lo que a veces la enfermedad de Alzheimer familiar se conoce como Alzheimer de aparición temprana. El tipo familiar comprende entre el 5% y el 10% de los casos, y pueden causar algunas mutaciones genéticas. Primero, mutaciones en los genes

PSEN-1 (cromosoma 14) o PSEN-2 (cromosoma 1), se relacionan con la aparición temprana. Estos genes se codifican para la Presenilina-1 o la Presenilina-2, ambas subunidades de proteína de la gamma-secretasa. Las mutaciones en los genes PSEN-1 o PSEN-2 pueden cambiar la ubicación en que la gamma-secretasa rompe la APP, produciendo moléculas beta-amiloide de distinta longitud, Que parecen mejores a la hora de agruparse y formar placas beta-amiloideas (Bui *et al.*, 2019 & Lane *et al.*, 2018).

Otra causa genética conocida para la enfermedad de Alzheimer es la trisomía 21 o síndrome de Down, que consiste en una copia adicional del cromosoma 21. Resulta que el gen responsable de producir APP se encuentra en el cromosoma 21, lo que significa que las personas con síndrome de Down tiene un gen APP adicional, por lo que se presume una mayor expresión de APP que potencialmente aumenta la cantidad de placa amiloide. Por ese motivo, la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar a menudo avanza a los 40 años en paciente con Síndrome de Down (Gaugler *et al.* 2016).

2.5. La Neurodegeneración:

La neurodegeneración se define como un proceso que trae consigo la degeneración progresiva y/o la muerte de las neuronas. Dicho proceso puede ser normal y natural durante el envejecimiento y tiene como consecuencia la disminución de las funciones cognitivas. Pero también este proceso puede aparecer distintas patologías neurológicas (Heneka *et al.* 2010). En este proceso de neurodegeneración neuronal no es sencillo hacer un análisis de diferencias entre lo que es el envejecimiento normal del patológico a nivel celebra. Pues en un proceso de envejecimiento normal, el cerebro tiene cambio en su morfología y funcionamiento que a su vez afectan las neuronas, la neurotransmisión, la sinapsis, la circulación y el metabolismo (Figura 2.). Todo esto resulta en que la diferencia entre los casos patológicos y los no patológicos o de envejecimiento normal sea solamente cuantitativo.

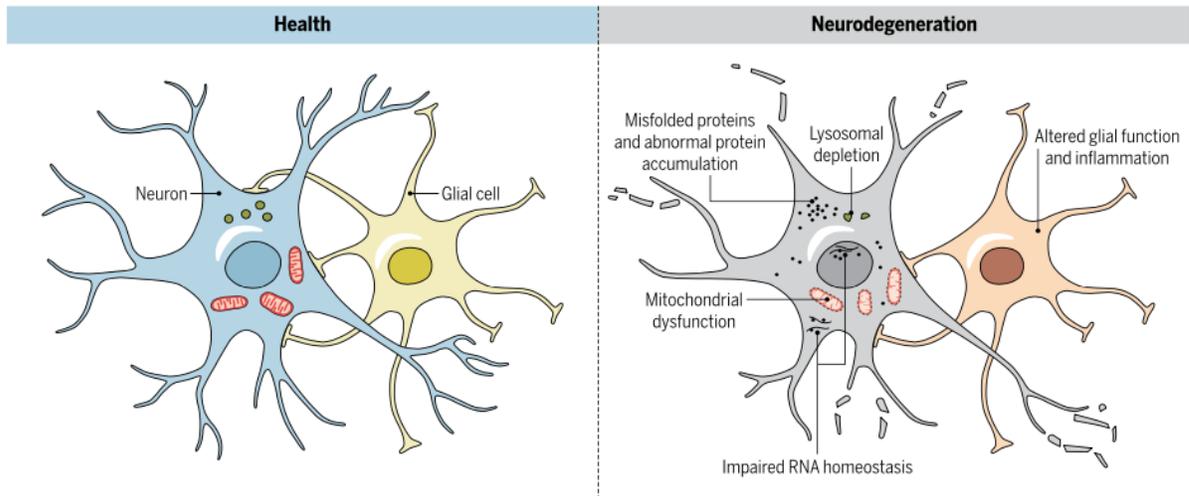


Figura 2: Principales procesos celulares y moleculares que contribuyen a la neurodegeneración. Tomado de: Katsnelson et al. 2016.

2.5.1. Neurodegeneración de la EA:

Históricamente se han establecido dos hipótesis como actores estrellas o principales para explicar la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, que son: la formación de placas beta-amiloides y los ovillos neurofibrilares. Sin embargo en la EA también ocurre una degeneración crónica neurítica que desencadena la muerte de células neuronales, es aquí donde cobra protagonismo la hipótesis de la apoptosis que establece que la muerte celular es la principal responsable del deterioro cognitivo y de la demencia en la EA (Leblanc 2005) pero existe otra hipótesis importante que es la de la degeneración sináptica, donde se cree que esta es más importante que la misma muerte celular, pues la pérdida de la sinapsis neocortical se relaciona más en primera instancia con la disminución cognitiva que con los recuentos celulares, y esta pérdida de sinapsis sabemos que ocurre antes y en mayor grado que la muerte neuronal. Sabemos que las neuronas tienen cientos de terminales axonales, esta pérdida de sinapsis puede causar un cambio clínico y fisiológico, y en casos donde está pérdida de sinapsis es muy grande conduce a una inadecuada recepción de flujo y de factores de comunicación, nutrición y mantenimiento de las neuronas y finalmente esto induce a la apoptosis o muerte neuronal (Figura 3.) (Terry 2000).

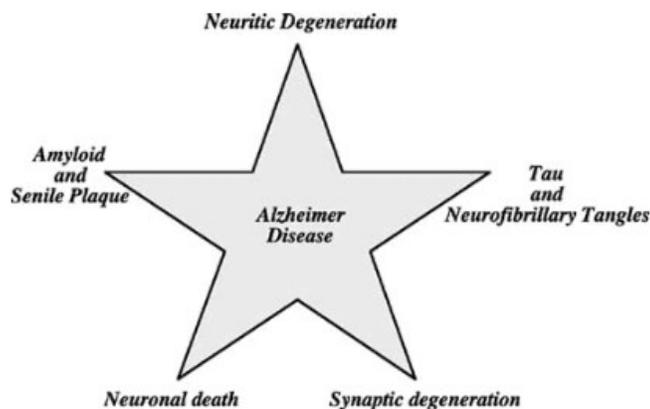


Figura 3: Principales características neuropatológicas de la EA. Tomado de: Leblanc 2005.

2.6. Tipos de muerte celular responsable de la pérdida neuronal en la EA:

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer tienen dos vías principales de muerte neuronal: la apoptosis y la necrosis (Lossi and Merighi 2003; Gorman 2008). Entre estas dos vías de muerte celular la diferencia principal es la discrepancia en la morfología celular y si el contenido celular se filtra durante este proceso (Lossi and Merighi 2003 & Chan *et al.* 2015).

2.6.1. La Apoptosis:

Se define como un tipo de muerte celular programada (PCD), estas células apoptóticas tienen como características: contracción, condensación cromosómica y finalmente la fragmentación del ADN. En este proceso, se forman los cuerpos apoptóticos y el contenido celular no se filtra generalmente, y esto da como resultado la disminución de la respuesta inmunológica. Por otro lado, el ADN fragmentado puede estar indicando una apoptosis de forma tardía (Leblanc 2005).

La apoptosis puede darse por vía extrínseca o por vía intrínseca. Entonces básicamente en la vía extrínseca los receptores de muerte se activan por la unión a ligandos extracelulares, en cambio en la vía intrínseca todos los estímulos con internos, como el daño del ADN, activan p53 y por último la regulación positiva de factores proapoptóticos (proteína Bcl-2). Cualquiera de estas dos vías altera la permeabilidad de la membrana, lo que a su vez va a activar una cascada de proteínas que conduce a la liberación de factores proapoptóticos, todos estos factores promueven posteriormente la ejecución de la apoptosis de forma independiente o dependiente de la caspasa (enzima que juega un papel importante en la homeostasis), lo que finalmente conduce a la formación del apoptosoma o la rueda de la muerte, el resultado final es la fragmentación de ADN que conduce a la muerte celular por apoptosis (Chi *et al.* 2018).

2.6.2. *La Necrosis:*

Se define como un mecanismo de muerte celular alternativo, en esta la célula se hincha, por lo tanto, pierde la integridad de la membrana y se filtran los contenidos intracelulares. La fragmentación del ADN también se presenta en este tipo de muerte celular, pero la necrosis no implica la condensación cromosómica. Por otro lado, también existe la necrosis programada (PCD activa), y se denomina necroptosis, este está relacionado con la activación de receptores de muerte específicos o tipo Toll (Leblanc 2005 & Chi *et al.* 2018).

2.7. *Ciclo celular en la EA:*

En normalidad el ciclo celular consta de cuatro fases, estas son necesarias para la división y la replicación 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. En cada fase del ciclo celular ocurre: En la fase G1, la célula se prepara para dividirse, entonces para esto, entra en la fase S, que es cuando la célula sintetiza una copia de todo su ADN, al finalizar esta fase la célula tiene una copia de su material genético, e ingresa en la fase G2, en esta fase es cuando el material genético se condensa y organiza, y luego se prepara para la división celular. Por último entre en la fase

M, en esta fase se lleva a cabo la mitosis. Es decir, la célula madre reparte las dos copias de su material genético entre sus dos células hijas y el ciclo celular empieza de nuevo para cada una de ellas.

En un cerebro en desarrollo y en el sistema nervioso, los precursores neuronales proliferan, cumplen con el ciclo y la división celular normal, pero en un cerebro adulto y sistema nervioso, este proceso cesa, salvo en las células progenitoras neuronales que nunca se replican. La mayoría de las neuronas permanecen en una fase de no división y no replicación, que es la fase G0, durante la mayor parte de sus vidas. Es decir, las neuronas inician el ciclo celular, pero no lo completan y eventualmente entran en una neurodegeneración de tipo apoptótico (Copani *et al.* 2008 & Clark and Paluch 2011).

En normalidad las neuronas pueden reingresar al ciclo celular (de G0 a G1) y esto seguido por la detención del ciclo en una etapa temprana (antes del punto de transición G1/S), en este punto es posible la rediferenciación celular, se cree que esta reentrada en un cerebro sano es transitoria y hace parte del proceso de remodelación sináptica. Pero en un paciente con EA el reingreso del ciclo celular se plantea por medio de la hipótesis de la EA de dos golpes. En el primer golpe, es la reentrada anormal en el ciclo celular, que da como resultado normalmente la apoptosis neuronal y la prevención de la EA, pero en el segundo golpe el estrés o daño oxidativo crónico previene la apoptosis y las neuronas consiguen como una “inmortalidad” que es similar a las células tumorales, esto pasa similar que en el cáncer. Es decir, en la EA fallan los puntos de control de G1/S, dejando así que el ciclo celular progrese a la última fase G2, que es la fase de condensación y organización el material genético y se preparación para la división celular, pero las neuronas no pueden dividirse, entonces el estar en esta fase favorece la formación de ovillos neurofibrilares y placa beta-amiloide (Figura 4.) (Raina *et al.* 1999; Nagy 2007; Currais *et al.* 2009 & Clark and Paluch 2011).

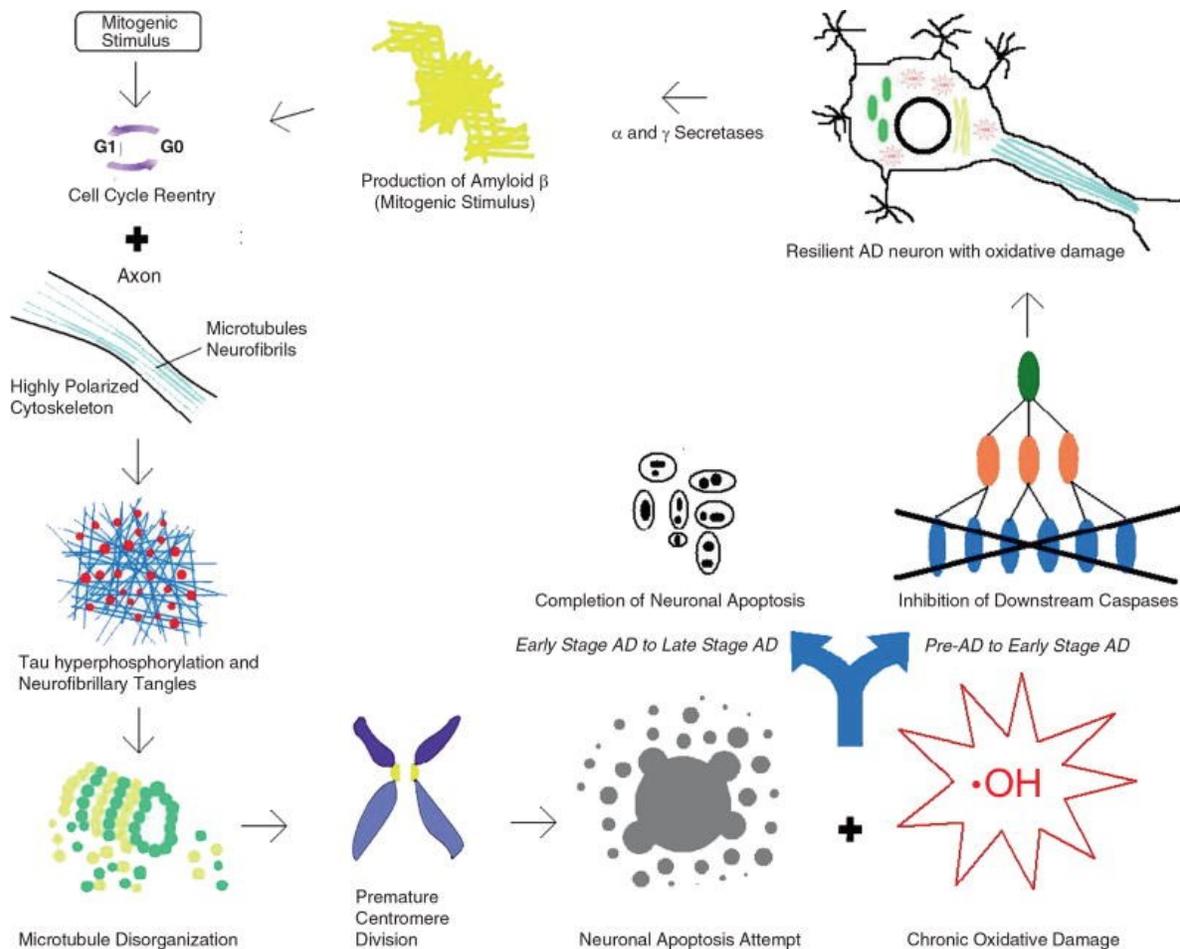


Figura 4: Hipótesis de los dos golpes de la EA. Tomado de: Clark and Paluch 2011.

2.8. Enfermedad Periodontal:

La Nueva Clasificación del 2017 World Workshop on Periodontal and Periimplant Diseases and Conditions (el World Workshop), define la enfermedad periodontal como: “una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a biofilms de placa disbiótica y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte de los dientes” (G. Caton *et al.* 2018a; Papapanou *et al.* 2018; Mariano Sanz 2019 & Meghil and Cutler 2020).

Sus principales características incluyen la pérdida de soporte de tejido periodontal, que se manifiesta a través de la pérdida de inserción clínica (CAL) y la pérdida de hueso alveolar que

se evalúa radiográficamente, y también con la presencia de sangrado gingival y bolsas periodontales.

La periodontitis es un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia, así como porque puede provocar la pérdida y la discapacidad de los dientes, afectar negativamente a la función masticatoria y a la estética, ser una fuente de desigualdad social y perjudicar la calidad de vida. La periodontitis representa una proporción sustancial del edentulismo y la disfunción masticatoria, ocasiona importantes costos de atención dental y tiene un plausible impacto negativo en la salud general (Figura 5) (Herrera David, Figuero Elena, Shapira Lior, Jin Lijian 2017; G. Caton *et al.* 2018 & Papapanou *et al.* 2018).

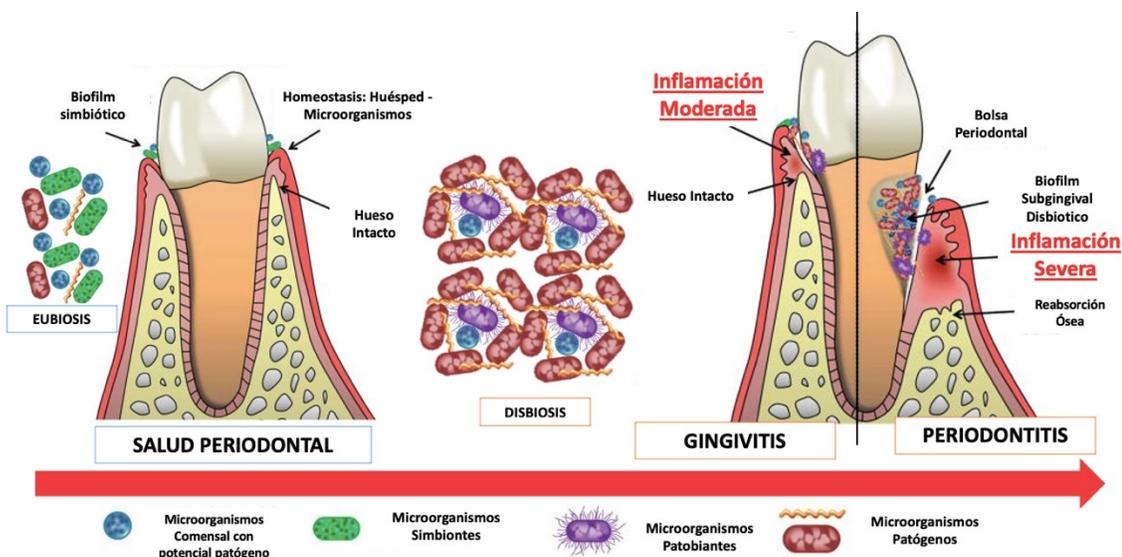


Figura 5: Evolución de la Enfermedad Periodontal. Figura realizada por: Ana María Vargas. Información tomada de: Ss *et al.* 1998; Hajishengallis and Korostoff 2017; Meghil and Cutler 2020.

En las bolsas periodontales existen más de 15 linajes bacterianos donde en cada uno de ellos contiene más de 100 géneros y 600 especies. (López *et al.*, 2003). Socransky *et al.* (1998) indujeron complejos bacterianos (grupos de microorganismos que se encuentran estrechamente relacionados entre sí) donde el complejo rojo se encuentran los anaerobios más frecuentes asociados a la periodontitis entre esos *P.gingivalis* se aísla del surco gingival especialmente cuando no existe salud periodontal, y se ha asociado especialmente con la progresión de la periodontitis (figura 6.)(Ss *et al.* 1998; Hajishengallis 2011, 2015).

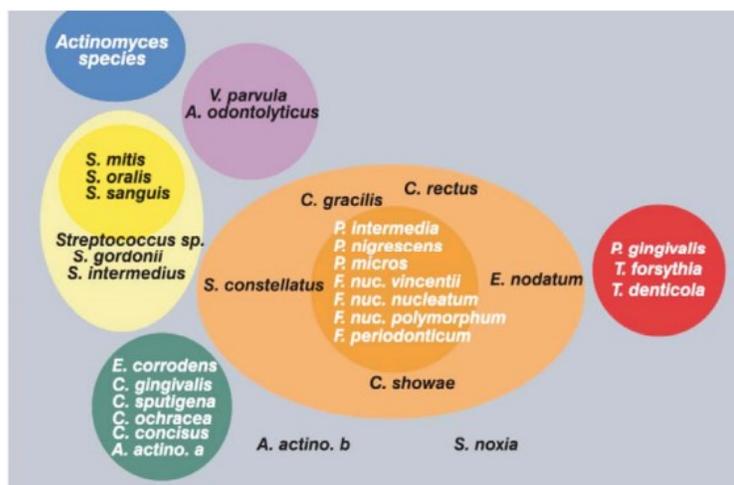


Figura 5: Complejos Bacterianos. Tomado de: Socransky y cols, 1998 & Ss et al. 1998.

2.9. *Porphyromonas gingivalis*:

Es una bacteria anaerobia gramnegativa asacarolítica, que mide $0.5 - 0.8 \mu\text{m} \times 1 - 3.5 \mu\text{m}$ y produce factores de virulencia importantes conocidos como gingipaínas (lisina-gingipaína (Kgp), arginina-gingipaína A (RgpA) y arginina-gingipaína B (RgpB)), lipopolisacáridos (LDS) y fosfoglicerol dihidroceramida (PGDH), estos factores de virulencia pueden liberarse en vesículas de la membrana externa (OMV) y llegar a áreas lejanas de la cavidad oral a través de la sangre, como el cerebro (Nie *et al.* 2019; Singhrao and Olsen 2019a; Olsen and Singhrao 2020; Seymour and Zhang 2022).

Porphyromonas gingivalis ha sido el microorganismo más asociado a la enfermedad de Alzheimer y esto está relacionado directamente con sus factores de virulencia, estos son importante para el modelo patogénico de Alzheimer, porque pueden participar en el inicio y/o progresión de la EA (Figura 7)

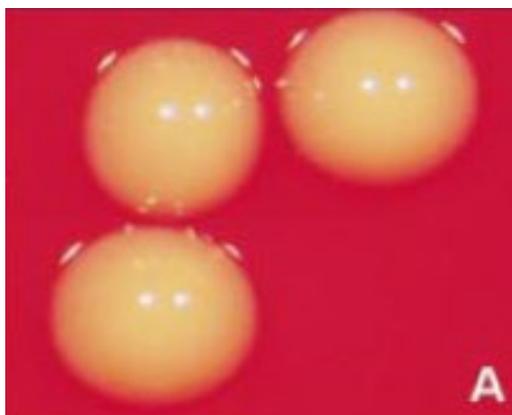


Figura 6: Colonias de *Porphyromonas gingivalis*, observada con microscopio estereoscópico de 4,5 aumento. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología oral, instituto UIBO, Universidad El Bosque). Tomada de: Mayorga-Fayad *et al.* 2007..

Gingipaínas: Las gingipaínas son importantes en la nutrición de *P. gingivalis* y además tiene muchos efectos en los sistemas del huésped, como: la desregulación de las vías de coagulación y fibrinolíticas, la activación de la vía de calicreína/cinina y la modulación de las redes de citosinas del huésped. También las gingipaínas pueden activar metaloproteinasas de matriz (MMP) y estas pueden escindir numerosas proteínas de la superficie celular, como precursores de citosinas, factores de crecimiento, receptores de citosinas y moléculas de adhesión celular, incluidas las cadherinas, lo que provoca a su vez un desprendimiento de la superficie celular de manera recular (Sheets *et al.* 2006).

Algunos estudios han reportados que las gingipaínas, podrían impulsar la activación del inflammasoma NLRP3 y la posterior formación de placa amiloide β , como también aumentar la proteólisis de la proteína tau, siendo estos dos actores son muy importantes para la EA (Figura 8) (Nie *et al.* 2019; Singhrao and Olsen 2019).

LPS: Es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas, es un activador importante de la proinflamación y también activador de macrófagos y neutrófilos. Este factor de virulencia también induce la producción de péptido A β componente principal de las placas amiloides, afecta el aprendizaje/memoria espacial y aumenta significativamente

la producción de citocinas proinflamatorias, que a su vez activa los astrocitos/microglía en modelos de ratones (Figura 8) (Wu *et al.* 2017 & Kim *et al.* 2021).

PGDH: En la actualidad este lípido no tiene tantos estudios, pero la poca evidencia indica que esta causa hiperfosforilación de la proteína tau y aumenta la producción de APP y de las placas Beta-amiloides (Seymour and Zhang 2022). También este afecta negativamente o disminuye la producción de sirtuina-1, que es un marcador para proteger a las células de la senescencia celular (Yamada *et al.* 2020). Por otro lado, puede causar apoptosis en células endoteliales, y es así como ingresa al cerebro (Zahlten *et al.* 2007).

Se ha descrito una cepa altamente virulenta, esta variedad es especial por inducir una respuesta inmune mayor que otro tipo de cepas de *Porphyromonas gingivalis* (Nie *et al.* 2019). La cepa W83 tiene una gran importancia en el genoma de la bacteria, ya que la virulencia de esta bacteria influye junto con los factores que tiene, en el sistema del complemento inflamatorio del huésped. Ataca la primera línea de defensa del organismo, invade las células epiteliales para colonizar los tejidos y seguir causando destrucción en el medio donde se desarrolla; esta cepa es la más virulenta de todas, 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 en el huésped (Figura 8.) (Dominy *et al.* 2019).

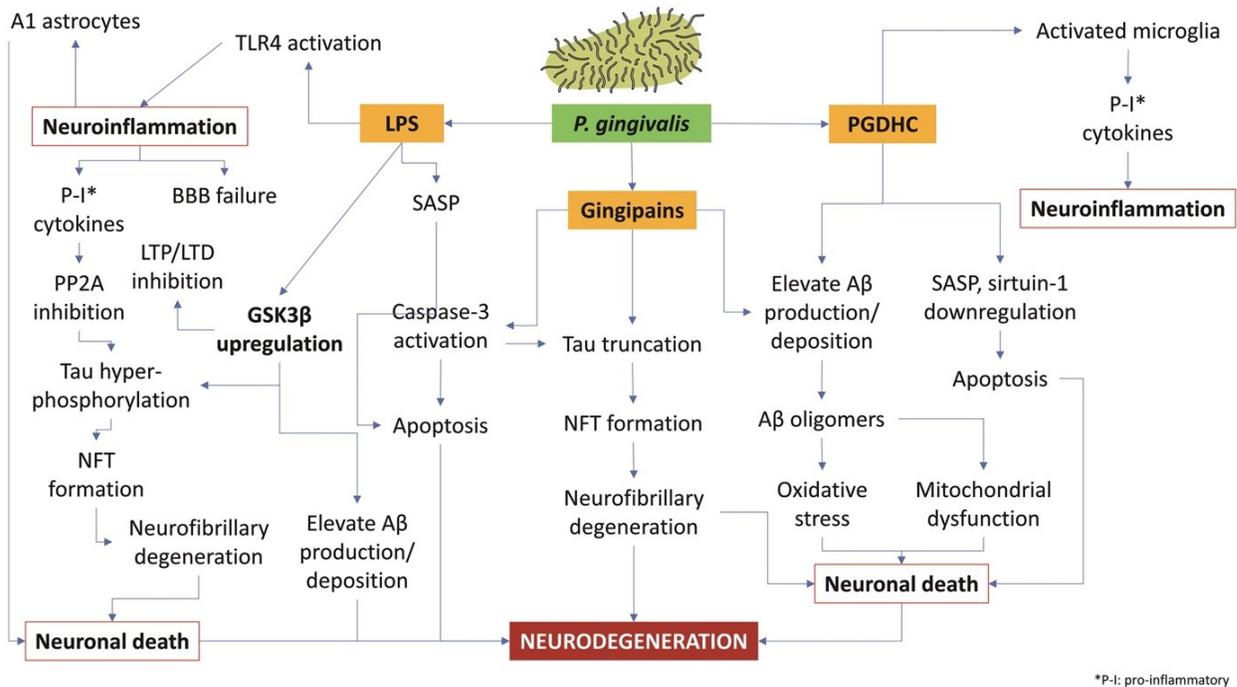


Figura 7: Efectos de los factores de virulencia de *P. gingivalis* en la enfermedad de Alzheimer. Tomado de: Seymour and Zhang 2022.

2.10. Asociación de la enfermedad periodontal y la enfermedad de Alzheimer:

Sabemos que existen vías patológicas similares en el establecimiento de EA y enfermedad periodontal, incluidas características celulares y moleculares como daño oxidativo e inflamación contribuye al deterioro cognitivo en la EA. La periodontitis puede ejercer una influencia directa al mantener la inflamación periférica y si a esto le sumamos genes defectuosos de susceptibilidad que normalmente ayudan a eliminar desechos del cerebro, pueden fomentar un fenotipo proinflamatorio de las células microgliales.

Las vías de acceso microbiano al cerebro como: Las exotoxinas provocan el desprendimiento de células endoteliales, dentro de estas, las citoquinas inducidas por bacterias gramnegativas causan la interrupción de la unión estrecha en la barrera hematoencefálica, y esto permite que las bacterias pasen al cerebro por vía paracelular. Las exotoxinas también pueden provocar necrosis endotelial. Por otro lado, las bacterias se pueden transportar al cerebro a

través del transporte vesicular de macromoléculas, como la proteína A de la membrana externa (OmPA), la invasión de la proteína A del endotelio cerebral (IbeA), los receptores endoteliales en forma beta de la gp96 de choque térmico (Ecgp96) y la proteína 1 asociada a la contactina (CaspR1) (Gaur and Agnihotri 2015; Maurer *et al.* 2018; Hashioka *et al.* 2019; Olsen and Singhrao 2020 & Kim *et al.* 2021).

La primera hipótesis se basa en el hecho de que los microorganismos ubicados en el biofilm dental pueden infiltrarse en el cerebro por el torrente sanguíneo o los nervios periféricos, principalmente por el nervio trigémino. Aproximadamente el 85% de la biopelícula subgingival está compuesta por bacterias gramnegativas que contienen LPS (Socransky and Haffajee 2002). Dichos microorganismos y sus compuestos inmunogénicos en determinadas concentraciones pueden desencadenar un proceso inflamatorio en el SNC (Abbayya *et al.* 2015). Este proceso inflamatorio es una respuesta inmune clásica similar en algunos aspectos a la observada en la EA, a través de la vía TLR-2 y TLR-4, también relacionada con interacciones de citocinas (incluyendo interleucinas, TNF- α , factor de crecimiento transformante- β) y quimiocinas (proteína quimiotáctica de monocitos, IL-8, factor inhibidor de la migración de macrófagos y monocina inducida por γ -interferón) liberada por neuronas y células gliales. Además, también se observa una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), así como la activación del sistema del complemento. La asociación de estos factores desencadena mecanismos de muerte celular y aumenta la inflamación crónica ya establecida por enfermedades residentes o contribuye al desarrollo de nuevas patologías (Ide *et al.* 2016 & Harding *et al.* 2017).

Por otro lado, las citocinas proinflamatorias: son pequeñas proteínas que son cruciales para controlar el crecimiento y la actividad de otras células del sistema inmunitario y las células sanguíneas (Liu *et al.* 2017). Cuando se liberan estas le envían una señal al sistema inmunitario para que cumpla con su función. Las citocinas afectan el crecimiento de todas las células sen especial las sanguíneas y otras también afecta a otras células que ayudan a las respuestas inmunitarias e inflamatorias del organismo. Estas citocinas proinflamatorias son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 beta (IL-1 β), la interleuquina

12 (IL-12), el interferón- γ (IFN- γ) y, finalmente, la interleuquina 6 (IL-6) (Fung *et al.* 2017 & Ding *et al.* 2018).

Según Belstrom *et al.*, en su estudio describen otro mecanismo de evasión inmunológica demostrado por *P. gingivalis*, este se adhiere a los eritrocitos a través del receptor del complemento 1 (CR1) y así evade el ataque de los fagocitos circulantes. También este periodontopatógeno con sus factores de virulencia como las gingipaínas, hace que la bacteria sea relativamente resistente a la fagocitosis en ausencia de anticuerpos específicos (Belstrøm *et al.* 2011 & Singhrao *et al.* 2015). Entonces la hipótesis que se plantean es: que las bacterias patógenas orales que activan el complemento pueden usar los glóbulos rojos como vehículo de transporte, lo que permite la propagación sistémica de las bacterias y evita que los neutrófilos y monocitos circulantes las ataquen. Tal mecanismo puede contribuir a un papel patógeno de *P. gingivalis* en el desarrollo de enfermedades sistémicas (Figura 9.) (Belstrøm *et al.* 2011).

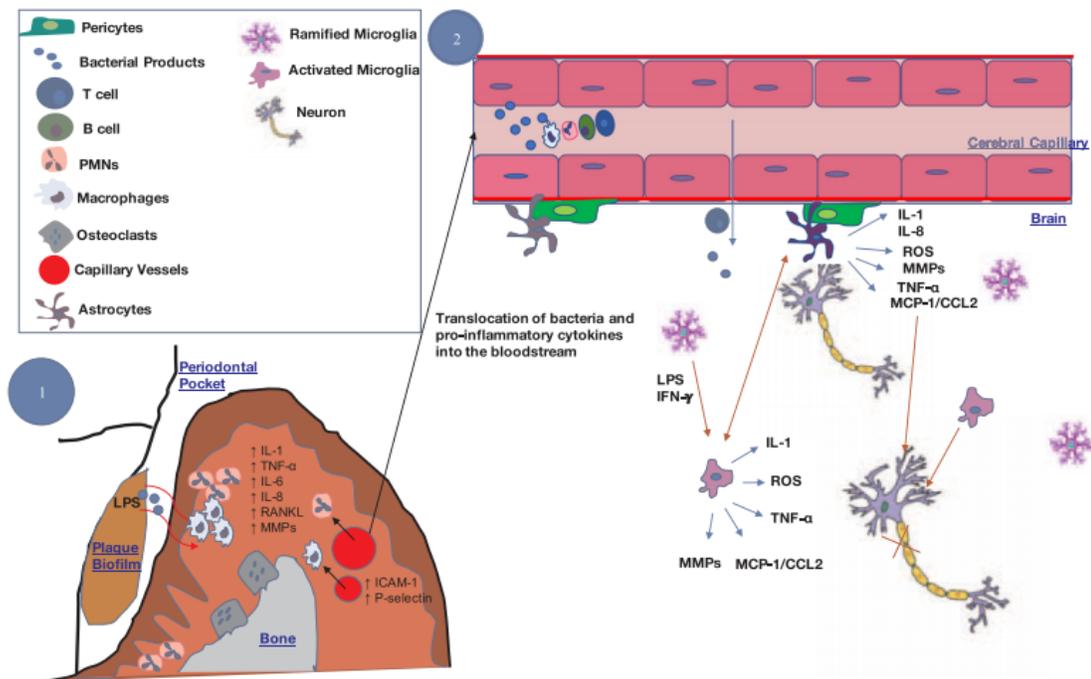


Figura 8: Enlace entre Periodontitis y Neuroinflamación. Tomado de: Wang *et al.* 2019.

Otros factores de riesgo importantes para la EA son presencia de la herencia del gen de susceptibilidad del alelo 4 de la apolipoproteína E (APOE ϵ 4). Uno de los efectos que causa está relacionado con la disminución del flujo sanguíneo cerebral a lo largo de la vida de un individuo durante el envejecimiento normal, pero este gen causa un efecto mayor en los sujetos con herencia genética de APOE ϵ 4. Y si a todo esto le sumamos otras enfermedades como hipertensión y diabetes en mediana edad, aumenta el riesgo de EA, y este riesgo puede aumentar en presencia de *P. gingivalis*, que tiene implicaciones metabólicas para la salud periférica y cerebral. Se ha demostrado que existe un 250% más de riesgo de demencia incidente en personas con herencia APOE ϵ 4 y diabetes que en las personas que no lo tiene, un 35% más de riesgo para aquellos con APOE ϵ 4 solo (Singhrao and Olsen 2019 & Sansores-España *et al.* 2021).

Los patógenos periodontales y la respuesta inmunoinflamatoria del huésped en la periodontitis pueden afectar la función cerebral, especialmente en sujetos ancianos más vulnerables, y pueden contribuir a la aparición y progresión de trastornos neurodegenerativos (Teixeira *et al.* 2017). La figura 10 expone los factores de riesgo compartidos entre la enfermedad periodontal y la EA, que incluye los componentes genéticos, las comorbilidades y los factores ambientales.

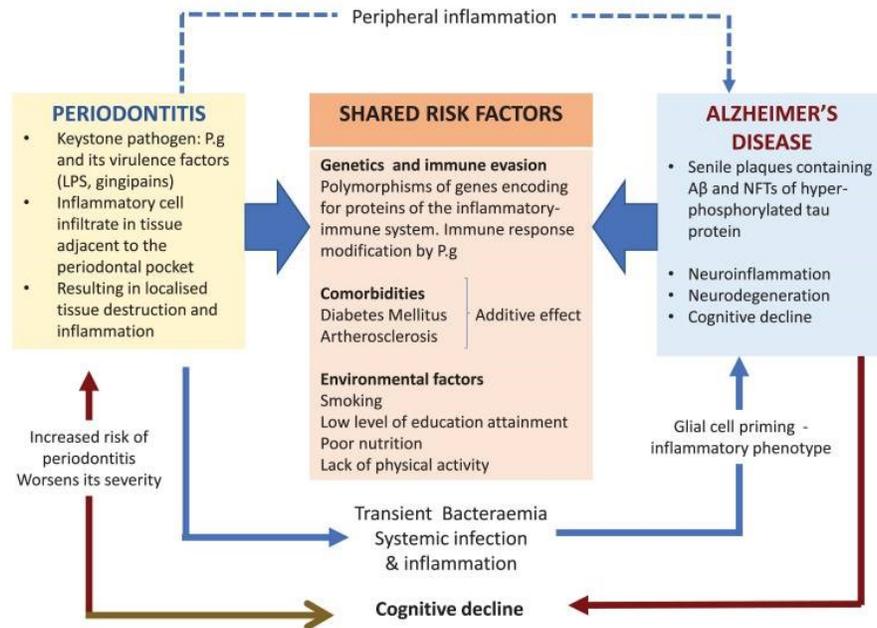


Figura 9: Factores de riesgo compartidos entre la enfermedad periodontal y la EA. Tomado de: Kanagasingam et al. 2020.

2.11. Neurodegeneración mediada por *P. gingivalis*:

La neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer es un sello patológico inducido por los péptidos beta amiloides en anormalidad, la microglía que se encuentra activa por este proceso acelera la neurodegeneración en el cerebro y por ultimo las bacterias gramnegativas en el SNC aceleran y empeoran la enfermedad de Alzheimer (Dickson and Lehmann 2019; Kinney et al. 2018; Peng et al. 2020 & Kim et al. 2021)

Gingipaínas: Las gingipaínas tiene una relación directa con la tau hiperfosforilada y la gravedad de la EA, a menudo, se colocan con las placas extracelulares de Beta-amiloide y los ovillos neurofibrilares. En algunos estudios se ha confirmado la presencia de gingipaínas en >90 % en cerebros humanos post mortem (Haditsch et al. 2020). Se demostrado en otros estudios que las gingipaínas se dirigen a tau y lo detienen, lo que aumenta el autoensamblaje de tau en NFT (Iqbal et al. 2010 & Seymour and Zhang 2022).

Por otro lado, se ha demostrado que los ratones transgénicos APP infectados con *P. gingivalis* tienen niveles de gingipaina en el cerebro, y se han encontrado en conjunto con placa Beta-amiloide y ovillos neurofibrilares, mientras que la activación de la caspasa-3, que está involucrado en la apoptosis y el truncamiento de tau, resulta en una pérdida significativa de neuronas del hipocampo (Ishida *et al.* 2017 & Ilievski *et al.* 2018). Por otro lado se encontró que los inhibidores de la gingipaina ingresan al cerebro de los ratones, reducen la carga de *P. gingivalis*, es decir que previenen la acción de la gingipaina sobre la tau y la neurodegeneración inducida por la gingipaina (Dominy *et al.* 2019a).

LPS: Se ha demostrado que este afecta la memoria y aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias significativamente, como IL-1 β e IL-6, en modelos de ratones. En este mismo estudio se observó aumento en la microglía activa, aumenta la expresión de APP y BACE1, así como los niveles de tau, lo que sugiere que Pg-LPS tiene una influencia significativa sobre patologías clave de EA. (Peng *et al.* 2020).

2.12. Células de neuroblastoma humano:

Las células similares a neuroblastos SH-SY5Y son un subclon de la línea celular de neuroblastoma parental SK-N-SH. La línea celular parental se generó en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea que contiene células similares a neuroblastos y epiteliales. Las células SH-SY5Y tienen un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas y se pueden diferenciar de un estado similar a un neuroblasto en neuronas humanas maduras a través de una variedad de mecanismos diferentes, incluido el uso de AR, ésteres de formol y neurotrofinas específicas, como las derivadas del cerebro. factor neurotrófico (BDNF). La evidencia previa sugiere que el uso de diferentes métodos puede seleccionar subtipos de neuronas específicos como las neuronas adrenérgicas, colinérgicas y dopaminérgicas. Este último aspecto hace que las células SH-SY5Y sean útiles para una multitud de experimentos de neurobiología (Shipley *et al.* 2016).

También se han observado diferencias importantes entre las células SH-SY5Y en sus estados indiferenciados y diferenciados. Cuando las células SH-SY5Y no se diferencian, proliferan rápidamente y parecen no polarizadas, con muy pocos procesos cortos. A menudo crecen en grupos y expresan marcadores indicativos de neuronas inmaduras. Cuando se diferencian, estas células extienden procesos largos y ramificados, disminuyen la proliferación y, en algunos casos, se polarizan. Se ha demostrado previamente que las células SH-SY5Y completamente diferenciadas expresan una variedad de marcadores diferentes de neuronas maduras, incluida la proteína asociada al crecimiento (GAP-43), los núcleos neuronales (NeuN), la sinaptofisina (SYN), la proteína de la vesícula sináptica II (SV2), enolasa específica de neuronas (NSE) y proteína asociada a microtúbulos (MAP), y la falta de expresión de marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). En apoyo adicional de que las células SH-SY5Y diferenciadas representan una población neuronal homogénea, la eliminación del BDNF da como resultado la apoptosis celular. Esto sugiere que la supervivencia de las células SH-SY5Y diferenciadas depende de factores tróficos, similar a las neuronas maduras (Cell Culture Protocols, 2013).

3. Planteamiento del Problema

3.1. Descripción del problema:

En las últimas tres décadas la esperanza de vida ha aumentado y el número de personas diagnosticadas con demencia asociadas a la enfermedad de Alzheimer también está en incremento exponencialmente (Norton *et al.* 2014). Las estimaciones epidemiológicas indican que el número de paciente con diagnóstico de EA se triplicaran para el año 2050 en el mundo. En la actualidad muchos científicos y farmacéuticas pese a los esfuerzos que hacen por encontrar un fármaco que se pueda utilizar en el tratamiento de la EA, siendo esto infructuosos; por este motivo existe un interés científico en identificar los factores de riesgo modificables para la EA, con el objetivo de desarrollar estrategias para tratamientos preventivos que puedan disminuir la prevalencia y la morbilidad de la EA (Barnes and Yaffe 2011; Teixeira *et al.* 2017 & Pazos *et al.* 2018).

Dentro de los factores de riesgo tenemos la asociación de la enfermedad periodontal con las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Los pacientes con EA tienen mayor riesgo de perder piezas dentarias y de tener edentulismo cuando los comparamos con pacientes sano (Dioguardi *et al.* 2019). También esta población con demencia y enfermedad de Alzheimer tiene más riesgo de ser diagnosticados con periodontitis (Choi *et al.* 2019). Se ha propuesto que la inflamación/infección periférica puede no ser solo un contribuyente, sino también un determinante clave del deterioro cognitivo asociado a la progresión de la EA (Cunningham and Hennessy 2015). En pocos estudios se ha demostrado que ratones infectados con bacterias asociada a la enfermedad periodontal como *Porphyromonas gingivalis*, son capaces de acceder y radicarse en el cerebro y por ende se requieren más investigaciones con este tema (Poole *et al.* 2017).

Este patógeno periodontal puede permanecer en el cerebro en bajas cantidades durante al menos varias décadas y contribuir a la persistencia de la inflamación localizada para su propio sustento nutricional y su supervivencia (Singhrao *et al.* 2015). También este

patógeno es clave de la disbiosis del microambiente subgingival y permitir el sobrecrecimiento de otros patógenos orales como las treponemas, que se asocian con la enfermedad de Alzheimer y que pueden trasladarse hasta el cerebro, ya que han sido identificados en tejidos cerebrales post mortem de pacientes con enfermedad de Alzheimer. En el estudio de Ilievski *et al.*, demostraron que la administración de dosis repetidas de *Porphyromonas gingivalis* en ratones induce una neurodegeneración y formación de péptido beta-amiloides extracelular (Ilievski *et al.* 2018).

La neuroinflamación está asociada fuertemente a la enfermedad de Alzheimer y ésta puede complicarse con la inflamación sistémica (Fu *et al.* 2014). Se cree que las citoquinas proinflamatorias y otros marcadores sistémicos de la inflamación derivados de la enfermedad periodontal pueden alterar el microambiente y con él alterar la barrera hematoencefálica (BHE) específicamente en el endotelio microvascular (Kamer *et al.* 2008 & Straka and Trapezanlidis 2013). Algunos estudios han sugerido que el lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* podría llegar a desencadenar una respuesta inflamatoria tardía y aumentar la expresión de algunas citoquinas que causan lesiones graves en el sistema nervioso central (McManus and Heneka 2017), también inducen una hiperexpresión de IL1- β , TNF- α e IL-12 a nivel de la microvasculatura, que da como respuesta a la disminución de proteínas estrechas de unión en la barrera hematoencefálica (BHE).

Por otro lado pocos estudios han demostrado la presencia de gingipaínas de *Porphyromonas gingivalis* en cerebros de ratones, evidenciando así que la enfermedad periodontal converge con la enfermedad de Alzheimer en un factor común que es la respuesta hiperinflamatoria, que nos da como resultado la producción de péptidos beta amiloides ($A\beta$), que favorecen la formación de placas beta-amiloides lo que puede modificar la fisiopatología de la enfermedad Alzheimer (Thery *et al.* 2006; Kamer *et al.* 2008 & Olsen *et al.* 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior es importante continuar evaluando los posibles mecanismos que inducen los periodontopatógeno en este caso *Porphyromonas gingivalis*, en la progresión, el establecimiento de la enfermedad de Alzheimer, esto a futuro puede ser útil

para la identificación de dianas terapéuticas en una patología que actualmente no tiene cura, con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

3.2. *Pregunta de Investigación:*

¿La bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis* produce cambios en el ciclo neural y en la producción y acumulación de péptidos A β en células de neuroblastoma humano (SHSY5Y)?

3.2.1. *Establezca las variables del estudio con base en los objetivos planteados:*

- *Porphyromonas gingivalis*
- Enfermedad de Alzheimer
- Neurodegeneración
- Células de neuroblastoma humano SHSY5Y
- Muerte celular
- Apoptosis.

4. Justificación

El grupo de enfermedades que afectan el sistema nervioso central son los trastornos neurológicos en los que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, enfermedades cerebrovasculares, traumatismos craneoencefálicos e infecciones neurológicas (Buitrago Ramírez *et al.* 2018).

Las infecciones neurológicas afectan a millones de personas alrededor del mundo, y son consideradas la sexta causa de atención primaria y la cuarta causa en prevalencia a nivel mundial (OMS 2008). Sin embargo, algunas de estas enfermedades neuroinfecciosas se han erradicado por completo, en el pasado. Pero según la OMS, por lo menos han aparecido 30 nuevas enfermedades infecciosas que han sido reconocidas científicamente (OMS 2008; Tohidpour *et al.* 2017; Huang 2018).

Este grupo de enfermedades emergentes se incluye un grupo de agentes patógenos tales como: *Borrelia burgdorferi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Citomegalovirus*, que están siendo evaluados con un interés mayor por tener un efecto significativo en el desarrollo patológico de enfermedades a nivel del sistema nervioso central, y estas pueden conllevar a una morbilidad en la población (Tohidpour *et al.* 2017).

Dentro de estas enfermedades emergentes que se han visto asociadas a daño endotelial y neuroinflamación se encuentra la enfermedad periodontal una de las infecciones crónicas más prevalentes en la actualidad en individuos adultos (Kamer *et al.* 2008 & Straka and Trapezanlidis 2013). Se ha reportado que los periodontopatógenos pueden desencadenar una respuesta proinflamatoria que aumenta de manera progresiva la producción de algunas citoquinas y la expresión de IL1- β , TNF- α e IL-12 (McManus and Heneka 2017).

En función de la comorbilidad entre la enfermedad periodontal y la enfermedad de Alzheimer han sido reportadas dos diferentes líneas: La primera línea de evidencia es que los pacientes con enfermedad de Alzheimer tienen un mayor deterioro de su salud bucal porque su deterioro cognitivo afecta sus hábitos de higiene oral directamente y la segunda línea de evidencia es que la enfermedad periodontal no controlada puede desencadenar o exacerbar un fenómeno neuroinflamatorio que observamos en la enfermedad de Alzheimer (Kaye *et al.* 2010 & Darveau *et al.* 2012). En los pacientes con enfermedad de Alzheimer se presenta una inflamación consistente con infección incluida la activación de las células microgliales y del inflammasoma, también la activación del sistema de complemento y el aumento de citoquinas (Abbayya *et al.* 2015 & Teixeira *et al.* 2017).

Todos estos estudios donde vemos la relación de la enfermedad periodontal con la enfermedad Alzheimer, hasta la fecha sólo ha generado hipótesis, que genera muchas dudas y preguntas a responder (D'Uscio *et al.* 2012; Nation *et al.* 2013; Gangoda *et al.* 2018). Sabemos que la enfermedad periodontal y la respuesta inmune inflamatoria contra el periodonto puede aumentar la susceptibilidad del huésped a enfermedades sistémicas como la diabetes, osteoporosis, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares y por último a las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, que han sido menos estudiados hasta la actualidad.

En la década de 1990, surgió la idea de que en la enfermedad de Alzheimer se encuentra distorsionado el ciclo celular neuronal, y desde ese entonces las investigaciones han demostrado que los pacientes con trastornos neurodegenerativos muestran una regulación positiva de las proteínas involucradas en el ciclo celular, como E2F1, este es un biomarcador de la fase G1 y a su vez es un factor de transcripción que desencadena la activación del ciclo celular y la apoptosis. Por otro lado CDK11 participa en el control de los puntos de control G2/M e *iNOS* está involucrado en la producción de óxido nítrico, que estimula la proliferación de células madre e inducir la división celular. Por consiguiente se cree que el reingreso de las células neuronales al ciclo celular se realiza a través de una vía apoptótica que promueve la muerte neural (Frade and Ovejero-Benito 2015; van Leeuwen and Hoozemans 2015).

De acuerdo a lo anterior expuesto, este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de *P. gingivalis* W83 sobre el ciclo neuronal y producción de péptidos A β en células neuronales (SHSY5Y).

5. Situación Actual

Con el pasar el tiempo y el avance de las investigaciones, se ha informado que la enfermedad periodontal crónica de 10 años o más de duración se convierte en un doble factor de riesgo para el desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer. Este factor de riesgo es modificable y esto es un punto positivo para el tratamiento y prevención de la EA. Estudios confirman que las personas que no se cepillan los dientes todos los días tiene riesgo entre el 22% y el 65% mayor para desarrollar demencia que quienes si se cepillan los dientes, tres veces al día, y es claro que la mala higiene oral es un factor de riesgo importante para la periodontitis (Gil-Montoya *et al.* 2015; Lee *et al.* 2017; Singhrao and Olsen 2019).

Otros estudios epidemiológicos de pacientes de edades avanzadas (mayores de 65 años de edad) han demostrado que existe una asociación entre la enfermedad periodontal y la edad de estos, en dónde se encontraron niveles altos de la proteína C reactiva (PCR) y niveles séricos de TNF- α , en pacientes con enfermedad de Alzheimer y periodontitis crónica, en comparación con pacientes que tenían sólo enfermedad de Alzheimer (Winning *et al.* 2015).

La asociación de la enfermedad periodontal con enfermedades neurodegenerativas principalmente la enfermedad de Alzheimer, donde los microorganismos alteran el microambiente de la barrera hematoencefálica (BHE) y se genera una producción de citoquinas proinflamatorias aumentada (Kamer *et al.* 2008; Olsen *et al.* 2016 & Abbott *et al.* 2010). Se ha demostrado como la infección de periodontopatógenos toma un rol importante en la activación endotelial (Gotsman *et al.* 2007 & DeStefano *et al.* 2009) los cuales se basan en el reconocimiento que hace el endotelio y los monocitos a los distintos factores de virulencia bacterianos como el lipopolisacárido, causando o potencializando procesos inflamatorios vasculares (Beck *et al.* 2010).

A nivel del sistema nervioso central los estudios sugieren que la presencia de gingipaínas y otros factores de virulencia que actualmente no están tan estudiados, pueden estar asociados al transporte de vesículas de membrana, que a su vez inducen la activación de inflamasoma

NLRP3 y agregación de péptido beta-amiloide que favorecen la formación de placas beta-amiloides en la enfermedad de Alzheimer, sin embargo es recomendable realizar estudios adicionales que confirmen estas hipótesis (Cerajewska *et al.* 2015 & Dominy *et al.* 2019).

Otro estudio importante de la neurodegeneración nos muestra que *Porphyromonas gingivalis* infecta e invade neuronas maduras y como resultado se obtuvo que estas células sobrevivieron a la infección inicial y mostraron muerte celular inducida por el periodo de infección dependiente del tiempo. También las neuronas infectadas evidenciaron acumulo de vacuolas autofágicas y cuerpos multivesiculares y aumento en la fosforilación de la proteína Tau (Haditsch *et al.* 2020). En otros estudios de modelos de animales experimentales, se ha demostrado que *P. gingivalis* produce factores de virulencia como la gingipaína y los lipopolisacáridos que destruyen los tejidos del huésped y evitan la activación del sistema de defensa del huésped. La gingipaína juega un papel en el desarrollo de periodontitis y está asociada con enfermedades neurodegenerativas, como lo es la enfermedad de Alzheimer (Haditsch *et al.* 2020).

Se demostró también la presencia del lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis*, y este activa el sistema de complemento C3b, C3d produciendo una opsonización de las neuronas del hipocampo, como consecuencia de la entrada de este patógeno al cerebro, también a nivel de la barrera hematoencefálica se ha reportado que puede inducir un aumento de la apolipoproteína E3 (Cerajewska *et al.* 2015 & Singhrao *et al.* 2017). Estudios en ratones (de tipo salvaje) con apolipoproteína E (ApoE)-/- respaldan el papel de *P. gingivalis*, donde estos ratones se infectaban oralmente con este patógeno y se evidencia la infiltración en el cerebro de los animales, así como neuroinflamación, placas amiloides, microglía activada, ovillos de tau y neurodegeneración (Ryder 2020).

Por otro lado, otros estudios otorgan datos importantes sobre la presencia de niveles elevados de PPA en pacientes con periodontitis crónica, siendo esta proteína clave para la formación de péptidos beta-amiloides 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, y se estima que este factor está relacionado desde un 60% a 80% en los pacientes con EA (Jellinger 2002 & Singhrao *et al.* 2017).

Recientemente en un estudio preliminar, se demostró que existe el efecto de *Porphyromonas gingivalis*, en la regulación de la expresión génica de E2F1, CDK11 e iNOS (biomarcadores del ciclo celular) en el ciclo celular neuronal, y este puede regular al alza E2F1 (apoptosis) y regular a la baja la expresión génica de CDK11 e iNOS en el ciclo celular neuronal (Bachtiar and Septiwidyati 2021).

Por lo tanto, la presencia de un aumento en la actividad de los microorganismos da como resultado una mayor carga inflamatoria, la susceptibilidad genética e infecciones recurrentes y la entrada directa de microorganismos (*P. gingivalis*) en el cerebro, aumenta directamente la cronicidad de las enfermedades neurodegenerativas alterando el ciclo neuronal y llevando a la neurona a apoptosis (Poole *et al.* 2017 & Singhrao *et al.* 2017), por tal motivo se hace necesario para la actualidad realizar estudios, que den soporte a los diferentes mecanismos e hipótesis y la posibilidad de generar tratamientos ayudando a mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

6. Objetivos

6.1. *Objetivo general:*

Evaluar el efecto de *P. gingivalis* W83 sobre el ciclo neuronal y producción de péptidos A β en células neuronales (SHSY5Y).

6.2. *Objetivos específicos:*

1. Evaluar el efecto de la bacteria completa viva de *P. gingivalis* sobre la viabilidad y metabolismo en células neuronales SHSY5Y.
2. Determinar el efecto de *P. gingivalis* sobre el ciclo celular y apoptosis de las SHSY5Y.
3. Evaluar la producción y acumulación de péptidos A β en células neuronales SHSY5Y infectadas con bacteria completa de *P. gingivalis*.

7. Metodología

7.1. Tipo de estudio

- Estudio experimental in vitro

7.2. Población y muestra

- Células de neuroblastoma humano SHSY5Y (ATCC - CRL - 2266™)
- Bacteria completa de *P. gingivalis* cepa W83, (ATCC® BAA-308).

7.3. Metodología

Con el fin de cumplir con cada uno de los objetivos planteados se realizó la siguiente metodología:

Cultivo bacteriano e inóculo de P. gingivalis W83:

Se utilizó la Cepa W83 de *P. gingivalis* (ATCC® BAA-308) que se obtuvo comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC). La cepa se sembró en agar BHI (Brain-Heart-Infusión) en condiciones de anaerobiosis por 8 días a 37°C. Posteriormente, se observaron las características macroscópicas de las colonias con el fin de confirmar la pureza del cultivo.

Para la obtención del pre-inóculo, con un hisopo estéril se concentró la suspensión de bacterias en 5 mL de medio DMEM sin antibiótico, a una longitud de onda de 620 por lectura espectrofotométrica, se ajustó a una densidad óptica de $0,90 \pm 0,02$, ya estandarizado previamente en el laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque 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 la línea celular SHSY5Y. De cada uno de los pre-inóculos obtenidos se realizó resiembra en agar BHI para confirmar el crecimiento de colonias.

Estimulación con P. gingivalis en células SHSY5Y:

La línea celular SHSY5Y se obtuvo de la casa comercial American Type Culture Collection (ATCC), La línea celular SH-SY5Y es una sublínea clonada tres veces de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC HTB-11), que se estableció en 1970 a partir de un tumor óseo metastásico de un paciente con cáncer de 4 años (Saenz-Muñoz 2012).

Las células 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 CO₂ y 37°C), posteriormente se disociaron con una solución de tripsina. -EDTA (0.25%-0,5 mM) en PBS, y se sembraron en placas de 96 o 24 pozos dependiendo el experimento a realizar y se dejaron estabilizar hasta que se alcanzó una confluencia del 80% durante 20h, pasado este periodo las células se infectaron con bacteria completa viva de *P. gingivalis* a una MOI: 5.0, 10, 50, 100 y 200 y lisado celular durante un periodo de incubación de 24h. Se utilizó como control negativo células sin estimular y como control positivo lisado bacteriano de *P. gingivalis* W83 a 20 µg/mL.

Viabilidad de células SHSH5Y estimuladas con P. gingivalis W83 por el método de resazurina:

Se utilizó la técnica colorimétrica de resazurina para evaluar la viabilidad de las células SHSY5Y basándose en la alta correlación que existe entre la cantidad de resazurina metabolizada a resazurina y el número de células vivas y/o metabólicamente activas (Saenz-Muñoz 2021).

Se sembraron 10.000 cel/pozo en placas de 96 pozos, y pasado el tiempo de estabilización (20h) se infectaron con bacteria completa viva de *P. gingivalis* W83 o lisado celular de acuerdo con las especificaciones descritas previamente, pasado el tiempo de estimulación (24h) se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS para retirar los residuos celulares y de bacterianos, posteriormente se adicionó 100 µL de solución de resazurina a 44

μM en DMEM sin suplementar, las placas se incubaron durante 4h a 37 °C, transcurrido este tiempo, la fluorescencia emitida por las células viables y/o metabólicamente activas se cuantificó a una longitud de onda de excitación de 535nm y una de emisión de 595nm usando un espectrofotómetro TECAN (Infinite® 200 PRO, Switzerland), Los valores de fluorescencia, se llevaron a porcentajes de supervivencia y se graficaron en función del logaritmo de la concentración de tratamiento empleando el paquete estadístico GraphPad-Prism 9®. Se utilizó como control negativo, células sin estimular y como control positivo de muerte, células tratadas con Tritón-X al 1%.

Evaluación del efecto de P. gingivalis en el ciclo celular de SHSY5Y:

Con el fin de determinar si, *P. gingivalis* tiene la capacidad de inducir cambios en el contenido de ADN durante las fases G0/G1, S y G2/M en la línea celular SHSY5Y, se utilizó el método 7AAD (7-Amino Actinomicina D) que se incorpora al ADN de doble cadena entre pares de bases en regiones ricas en G-C y permite determinar por citometría de flujo el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases (Alehaideb *et al.* 2020).

Se sembraron 20.000 cel/pozo en placas de 24 pozos y se realizó el protocolo de estimulación descrito previamente, pasado el tiempo de estimulación se retiró el medio y los pozos se lavaron con PBS, las células se disociaron con una solución de tripsina. -EDTA (0.25%-0,5 mM) y se centrifugaron a 1.800 rpm durante 5 minutos, posteriormente, se lavaron dos veces en PBS, en cada lavado se centrifugaron las células durante 10 minutos a 1.500 rpm, se retiró el sobrenadante y el pellet celular se tiñó con 5 μL de 7-AAD (concentración final 25 mg/mL) en 200 μL de solución salina por 15 minutos a temperatura ambiente, luego del tiempo de incubación, se realizó el análisis mediante citometría de flujo en el equipo BD Accuri C6, utilizando el láser de 488-647 nm. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Modfit LT® y se graficaron en el programa GraphPad Prisma 6. Se utilizó como control negativo células sin estimular y como control positivo lisado celular.

Evaluación del efecto de P. gingivalis sobre la apoptosis de células SHSY5Y mediante el método de Anexina V:

Para la detección de la apoptosis se utilizó el método de Anexina V-FITC (kit biolegend), en el cual la anexina V esta conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las células SHSY5Y (20.000 cel/pozo) en placas de 24 pozos, después del periodo de estabilización se realizó el proceso de estimulación con *P. gingivalis* y lisado celular descrito anteriormente, luego del periodo de 24h de incubación se retiró el sobrenadante y las células se lavaron con PBS, seguido de la disociaron con una solución de tripsina. -EDTA (0.25%-0,5 mM) y se centrifugaron a 1.800 rpm durante 5 minutos, se lavaron con PBS a 1.500 rpm durante 10 minutos, posteriormente el pellet células se resuspendió en 0.5 ml del buffer de unión y 1 µL del reactivo de anexina V-FITC y 5 µL de yoduro de propidio, se incubó por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (BD Accuri C6) en donde se analizaron 10,000 eventos por experimento y a partir de las lecturas, en el citómetro se construyeron los citogramas que se usan para interpretar los resultados (Figura 11). La señal del FITC (fluorescencia en color verde) se detectó a 518 nm, y la señal del yoduro de propidio se detectó a 620 nm. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software FlowJo y se graficaron en el programa GraphPad Prisma 6. Se utilizó como control negativo células sin estimular y como control positivo lisado celular.

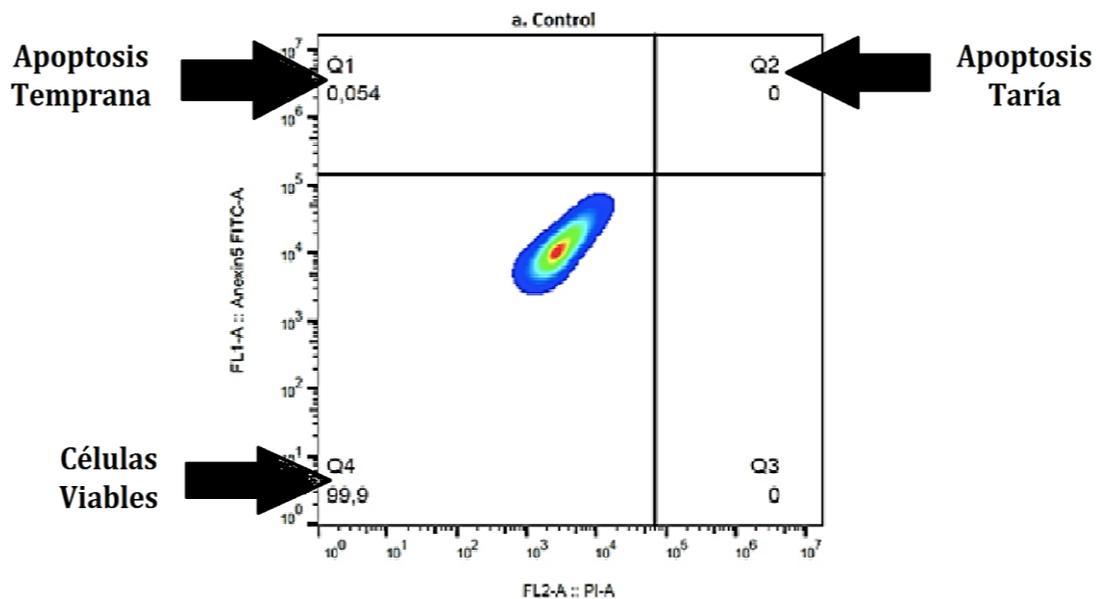


Figura 11: Representación del análisis por citometría de flujo con células SHSH5Y marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC. Figura realizada por: Ana María Vargas.

Medición de la secreción de A β 42 en células SHSH5Y estimuladas con P. gingivalis:

Se determinó la producción de péptido A β 42 amiloide en las células SHSH5Y, mediante el kit amiloide A β 42 humano ELISA (KHB3544, Invitrogen). Se sembraron 20.000 cel/pozo en placas de 24 pozos, se estimularon con *P. gingivalis* y lisado celular como se describió anteriormente, pasado en periodo de incubación de 24 h, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, se adición 200 μ L de buffer de lisis y se dejó incubando durante 5 minutos a 4C°. Posteriormente se realizó el protocolo de ELISA sándwich descrito por el fabricante, se utilizaron estándares de calibración (500-0 pg/mL). La intensidad de esta señal es directamente proporcional a la concentración del péptido presente en la muestra y se cuantificó a una longitud de onda de 450 nm usando un espectrofotómetro TECAN (Infinite® 200 PRO, Switzerland) y los niveles de A β para cada muestra se calcularon usando la curva estándar (Figura 12).

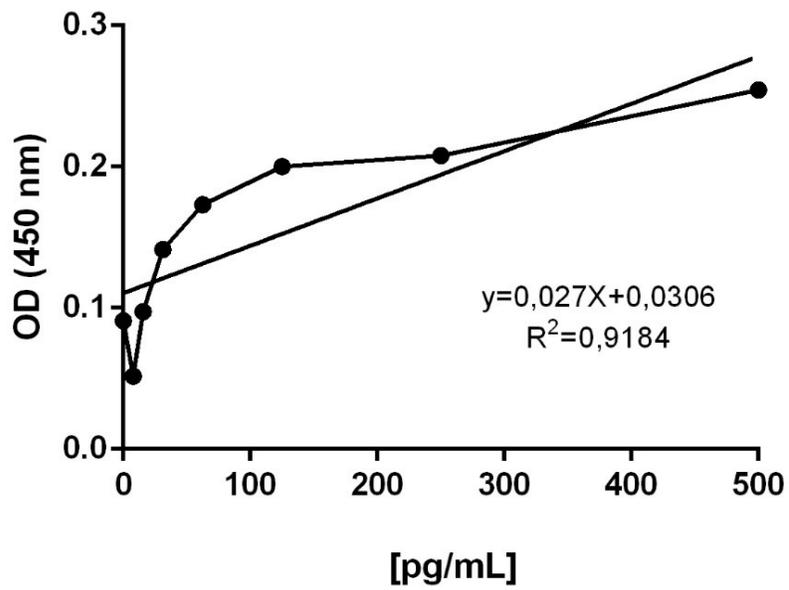


Figura 12: Curva estándar de calibración kit amiloide Aβ42 humano ELISA (KHB3544, Invitrogen. Figura realizada por: Ana María Vargas.

7.4. Plan de tabulación y análisis.

a. Hipótesis de estudio

Ho

- No se presenta efecto citotóxico en células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83
- No se presenta alteración en el ciclo celular de las células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83
- No se presenta apoptosis en las células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83
- No se presenta producción y acumulación de péptido Beta-amiloide en las células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83

Ha

- Se presenta efecto citotóxico en células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83
- Se presenta alteración en el ciclo celular de las células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83
- Se presenta apoptosis en las células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83
- No se presenta producción y acumulación de péptido Beta-amiloide en las células SHSY5Y estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83

b. 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 al ser un estudio experimental *in vitro*, en donde se usaron células obtenidas del cepario del Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque y que fueron adquiridas comercialmente y las cepas del microorganismo *P. gingivalis* que fueron obtenidos comercialmente, es considerado de acuerdo con la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud 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 manejarán en laboratorios de seguridad tipo 2, y se seguirán los protocolos de manejo y bioseguridad establecidos en los manuales de investigación del laboratorio de Investigaciones del Instituto UIBO. Para el desarrollo y ejecución del presente estudio se tiene previo aval del Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque (acta del 19 de febrero de 2020: Acta N° 003-2020 (anexo 1)).

9. Impacto Ambiental

El impacto ambiental de las actividades experimentales a realizar, poseen un riesgo mínimo para el ambiente según la resolución 2400 de 1979 (estatuto de seguridad industrial), la Ley 142 de 1994 (Ley de servicios públicos domiciliarios), la Ley 430 de 1998 (referente a desechos peligrosos), el decreto número 2676 de 2000 (diciembre 22) por el cual se reglamenta la gestión integral de los residuos biológicos y modificaciones de marzo del 2002; la resolución 01164 de 2002 del Ministerio del Medio Ambiente (septiembre 6), por la cual se adopta el manual de procedimientos para la gestión Integral de los residuos hospitalarios y similares del Ministerio del Medio Ambiente y el Ministerio de Salud; el decreto 4741 de 2005 (por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos y desechos peligrosos en el marco de la gestión integral); la resolución 1362 / 2007 (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.

10. Resultados:

10.1. Efecto de *P. gingivalis* sobre la viabilidad de células SHSY5Y:

Mediante el método de resazurina, se evaluó el efecto de *P. gingivalis* W83 sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma humano SHSY5Y, utilizadas como modelo de estudio de la enfermedad de Alzheimer. Nuestros resultados nos permiten demostrar que a las concentraciones de MOI más bajas no inducen alteraciones en el metabolismo, ni citotoxicidad en las SHSH5Y, mientras que a las concentraciones de MOI: 100 (62%) y 200 (50.2%) si se produce citotoxicidad y disminución del metabolismo celular en comparación al grupo control (células sin estimular, 100% viables) ($p < 0.05$). Con respecto a las células infectadas con el lisado células de *P. gingivalis* se pudo determinar que existe una disminución de la viabilidad celular (24.4%) con respecto al grupo control, siendo no estadísticamente significativa y menor que el efecto inducido por la bacteria completa de *P. gingivalis* a los MOI de 100 y 200 (Figura 13).

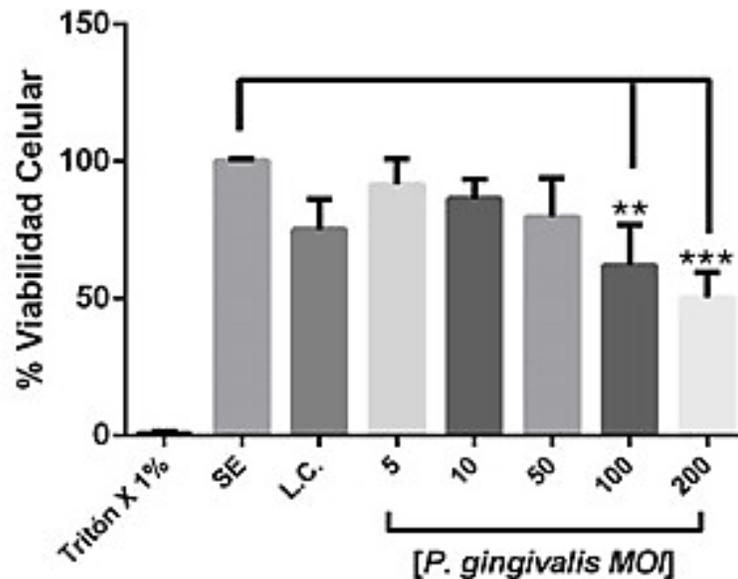


Figura 13: Viabilidad de células SHSY5Y expuesta a diferentes MOI de bacteria completa de *P. gingivalis* W83 por 24 horas.

Cada barra representa la media \pm 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 (células sin estimular) ($p < 0.05$). Figura realizada por: Ana María Vargas.

10.2. Efecto de *P. gingivalis* sobre el ciclo celular de SHSY5Y:

Se evaluó el efecto que tiene *P. gingivalis* sobre el ciclo de estas células SHSY5Y. Para esto, las células SHSY5Y fueron tratadas a diferentes MOI de concentración de 5, 10, 50, 100 y 200 durante 24 horas y recolectadas para el análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se representan como histogramas de frecuencia en las diferentes fases del ciclo celular G0/1, G2/M y S de las células y como porcentajes promedio de eventos encontrados para cada fase celular.

Nuestros resultados obtenidos sobre el ciclo neuronal demostraron que *P. gingivalis* induce cambios en la distribución de las fases celulares. En las concentraciones de MOI: 5 (65.37%) y 10 (53.46%) se presenta un arresto celular en fase S, disminuyendo la distribución celular en fase G0/G1, en comparación con el grupo control (células sin estimular, 35.47%)($p < 0.05$). Con respecto a las células infectadas con lisado celular de *P. gingivalis* se pudo determinar que existe un arresto celular en la fase S (48.28%) con respecto al grupo control, siendo de igual forma estadísticamente significativo pero menor que el efecto inducido por la bacteria completa de *P. gingivalis* a los MOI de 5 y 10 (Figura 14).

También pudimos demostrar que en a las máximas concentraciones de MOI evaluadas: 100 (40.10%) y 200 (34.58%) se presentó un arresto celular en la fase G0/G1, en comparación con el grupo de lisado celular (control positivo, 13.35%)($p < 0.05$) (Figura 14). Es importante resaltar que estos resultados del efecto de *P. gingivalis* sobre el ciclo celular de SHSY5Y, no han sido reportados previamente por literatura.

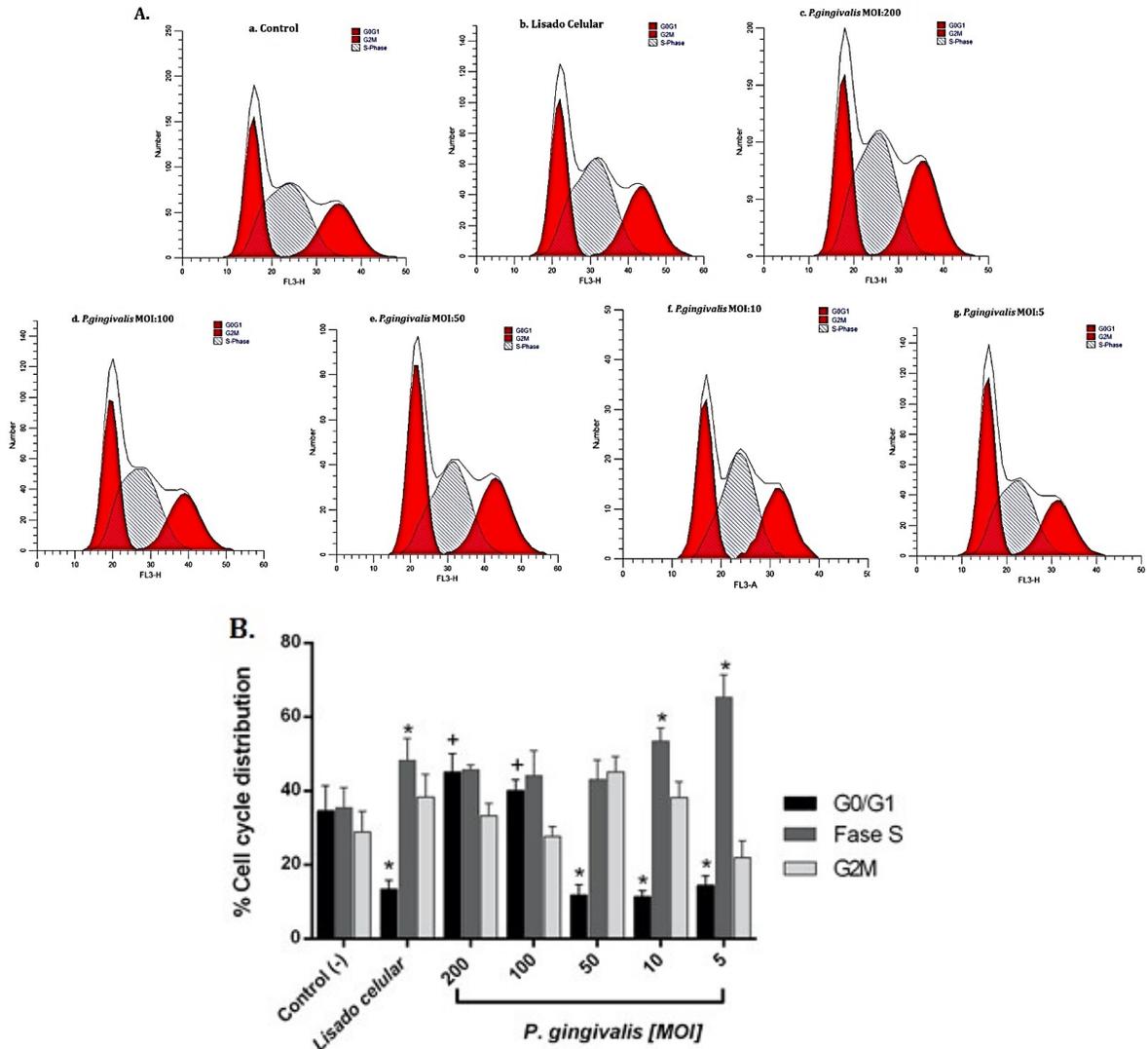


Figura 10: Efecto de *P. gingivalis* sobre la distribución de la línea celular SHSH5Y en las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2M) tratadas durante 24h a diferentes concentraciones de MOI.

A). Histogramas del ciclo células en SHSH5Y, **B)** Cuantificación de una población celular (en porcentaje) en diferentes fases del ciclo celular se muestra como diagramas de barras. 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 (células sin estimular) y +Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al control lisado celular ($p < 0.05$). Figura realizada por: Ana María Vargas.

10.3. Efecto de *P. gingivalis* sobre la apoptosis en células SHSY5Y:

Teniendo en cuenta los resultados de ciclo celular donde observamos que se presentaron modificaciones de arresto en fase S y G0/G1, queríamos correlacionar si hay una asociación a apoptosis temprana o tardía cuando eran expuestas a *P.gingivalis* W83; para esto las células SHSY5Y fueron tratadas a diferentes MOI de concentración de 5, 10, 50, 100, 200 y lisado celular durante 24 horas y recolectadas para el análisis de Anexina V mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se representan como histogramas de frecuencia a las diferentes concentraciones MOI: 5, 10, 50, 100, 200 y lisado celular (control positivo) y como porcentajes promedio de muerte celular.

Nuestros resultados obtenidos en las concentraciones de MOI: 5 (32.10%), 10 (27.23%), 50 (31.18%) y 100 (33.45%) inducen muerte celular de tipo apoptosis temprana, en comparación con el grupo control (células sin estimular, 3.248%) ($p < 0.05$). Con respecto a las células infectadas con lisado celular de *P. gingivalis* se pudo determinar que también inducen muerte celular de tipo apoptosis temprana (56.80%) en relación al grupo control, siendo de igual forma estadísticamente significativo y siendo un efecto mayor en comparación al inducido por la bacteria completa de *P. gingivalis* a los MOI de 5, 10, 50 y 100 (Figura 15).

También pudimos demostrar que en las concentraciones de MOI: 5 (47.87%), 10 (52.60%), 100 (26.32%) y 200 (64.22%) inducen muerte celular pero esta vez es de tipo apoptosis tardía, en comparación con el grupo control (células sin estimular, 5%) ($p < 0.05$) (Figura 15). Por otra parte, al comparar el efecto de la bacteria completa de *P. gingivalis*, demostramos que en las máximas concentraciones de MOI: 200 induce muerte celular de tipo apoptosis tardía (64.22%), con respecto al grupo de células tratadas con lisado celular (control positivo, 24.17%) ($p < 0.05$) (Figura 15).

De igual modo en la concentración de MOI 200 (17.32%) induce una tendencia de muerte celular de tipo apoptosis temprana, en comparación con el grupo control (células sin estimular, 3.248%) siendo esto estadísticamente no significativo (Figura 15).

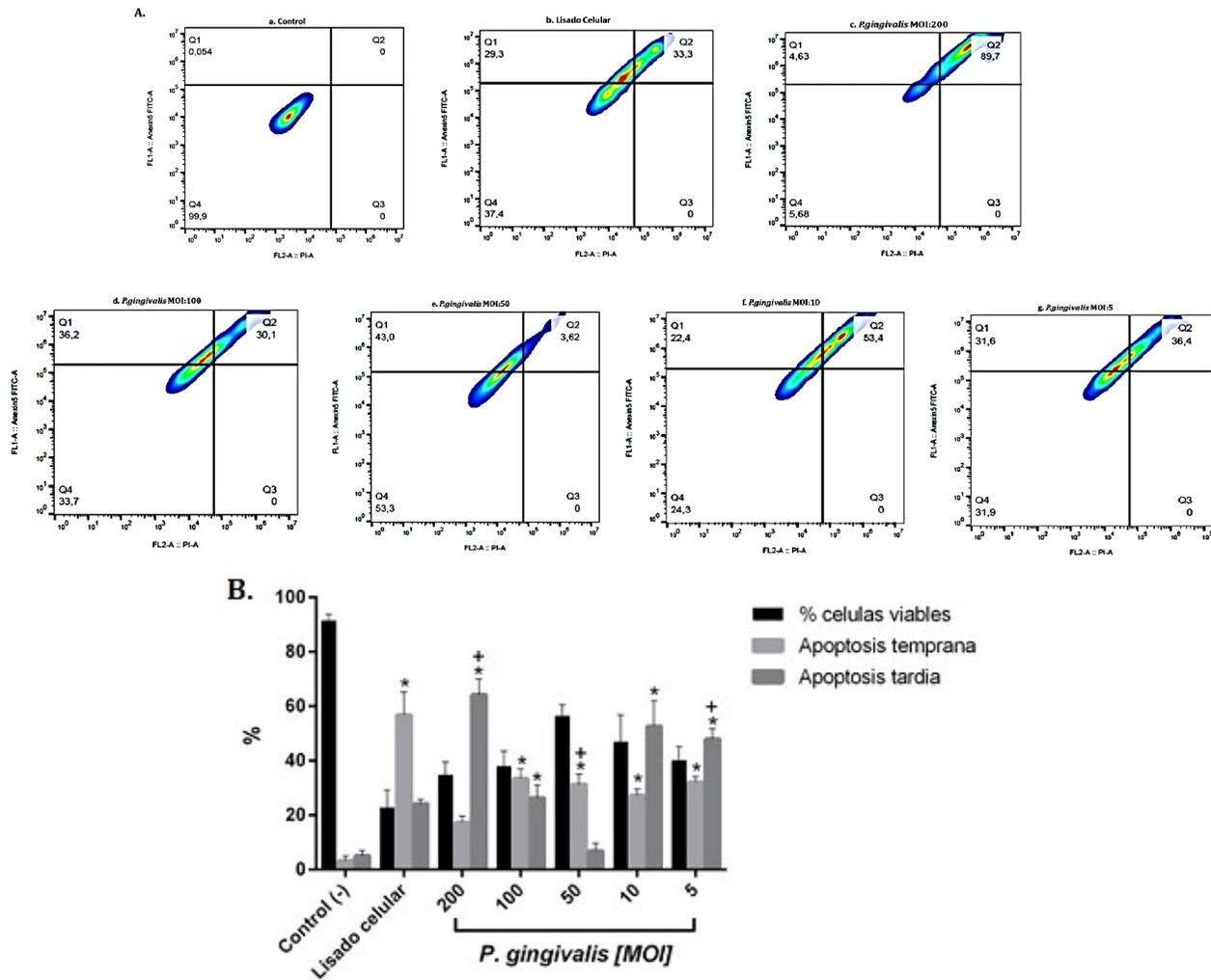


Figura 15: Efecto de *P. gingivalis* sobre la apoptosis de células SHSH5Y tratadas durante 24h a diferentes concentraciones de MOI.

A). Histogramas de apoptosis en SHSH5Y, **B)** Porcentaje de apoptosis temprana y tardía representada como diagramas de barras. 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 (células sin estimular) y +Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al control lisado celular ($p < 0.05$). Figura realizada por: Ana María Vargas.

10.4. Producción de péptido Beta-amiloide en células SHSY5Y expuestas a P. gingivalis:

El péptido beta-amiloide es el componente principal de las placas seniles o placas amiloideas de la enfermedad de Alzheimer, para determinar la producción de este utilizamos el Kit ELISA A β 42 humano. Para este ensayo, las células SHSY5Y fueron tratadas a diferentes MOI de concentración de 5, 10, 50, 100, 200 y lisado celular a 24 horas de estimulación y analizamos con el espectrofotómetro.

Nuestros resultados nos permiten demostrar que a todas las concentraciones de bacteria completa de pg. evaluadas se presentó un aumento de la producción de péptido beta-amiloidea, siendo estadísticamente significativo a partir del MOI: 10 (26.5%), 50 (55.4%), 100 (11.3%) y 200 (224.1%), en comparación con el grupo control (células sin estimular, 0.9%) y con el grupo lisado celular (control +, 6.7%)($p < 0.05$).

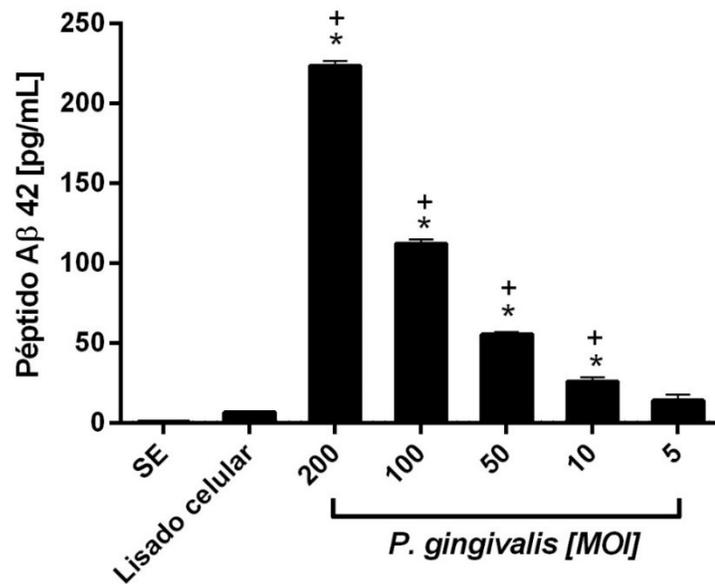


Figura 16: Cuantificación de péptido Aβ42 en células SHSH5Y estimuladas con la bacteria completa viva *P. gingivalis*.

Se cuantificó los niveles péptidos Aβ42 en SHSH5Y estimuladas a diferentes MOI por 24. Cada barra representa el valor promedio de la concentración ± E.S.M. Se uso la técnica ELISA mediante kit comercial (Invitrogen). * Representa diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control (sin estímulo), y +Representa la diferencia estadísticamente significativa con respecto al control lisado celular ($p < 0.05$). Figura realizada por: Ana María Vargas.

11. Discusión:

Actualmente ha aumentado el interés por estudiar y conocer más sobre la enfermedad periodontal, pues sabemos que el proceso de inflamación local, las citoquinas proinflamatorias derivadas del periodonto, los microorganismos y sus factores de virulencia viajan y pueden llegar al cerebro a través de la circulación sistémica y/o las vías neurales, y pueden favorecer la progresión y complicación de algunas enfermedades sistémicas, como en este caso la enfermedad de Alzheimer (Socransky and Haffajee 1997, 2002, 2010; Paraskevas *et al.* 2008; Kamer *et al.* 2015; Wang *et al.* 2019). Por tal motivo el propósito de este trabajo de investigación era evaluar el efecto de la bacteria completa de *P. gingivalis* W83 sobre la viabilidad y la apoptosis, sobre el ciclo celular neuronal y la producción /acumulación de péptidos A β en células neuronales SHSY5Y.

En nuestro trabajo pudimos demostrar que *P. gingivalis* W83 induce alteración en la viabilidad de las células SHSY5Y a las concentraciones de MOI más altas en comparación con el grupo control (células sin estimular); en 2019, Dominy *et al.*, reporto una disminución del 50% en la viabilidad celular de SHSY5Y a 400 MOI de concentración, lo que confirma que *P. gingivalis* produce citotoxicidad y disminución del metabolismo celular (Dominy *et al.* 2019).

La viabilidad celular ha sido reportada previamente en otros estudios que tratan de otras patologías o neuroinfecciones como el virus del dengue tipo 2 (DENV-2) en células SHSY5Y que es reportado en el estudio de Castellano *et al.*, en el 2016, ellos obtuvieron como resultados una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente 50% a las concentraciones de con MOI 1, 0,5 y 0,1 (Castellanos *et al.* 2016). Recientemente Yamada *et al.*, en el 2020, sembraron células CHO-7WD10 y SH-SY-5Y y sus resultados mostraron que la viabilidad se redujo significativamente (Yamada *et al.* 2020).

Así mismo pudimos demostrar que *P. gingivalis* induce cambios en la distribución de las fases del ciclo celular de SHSY5Y, de forma interesante se evidencia acumulación en la fase S y disminución de la distribución celular en fase G0/G1 cuando las células se trataron a las concentraciones más bajas de MOI y con lisado celular, con respecto al grupo control (células sin estimular); por otro lado a las concentraciones más altas de MOI se evidencia acumulación en la fase G0/G1 con respecto al grupo de lisado celular (control positivo).

Recientemente y de los pocos estudios que existen hasta el momento, en el 2021, Bachtiar *et al.*, en sus resultados demostraron que *P. gingivalis* puede regular el ciclo celular neuronal, mediante la expresión génica de E2F1 que induce la muerte celular en condiciones patológicas al activar la transcripción de genes relacionados con la apoptosis, encontraron también disminución de la expresión de CDK11 esto indica que las células expuesta no pueden completar el ciclo celular después del punto de control G2/M y finalmente aumentar la proliferación de células neurales a través de una disminución en la expresión de iNOS, estos resultados concuerdan con los de nosotros (Bachtiar and Septiwidayati 2021).

Estos cambios en la distribución de las fases del ciclo celular, nos indicaría que el efecto de este *P. gingivalis* es nocivo pues sabemos que las neuronas permanecen en una fase de no división/no replicación, que es la fase G0, durante la mayor parte de sus vidas y el hecho de que la distribución en las diferentes fases este viéndose afectada nos daría un indicio de que se cumple la hipótesis de los dos golpes de la EA. En el primer golpe, es la reentrada anormal en el ciclo celular, que da como resultado normalmente la apoptosis neuronal temprana y la prevención de la EA por formación de placa beta-amiloidea pero existe pérdida de sinapsis; y en el segundo golpe el actor principal es el estrés o daño oxidativo crónico, que se encarga de prevenir la apoptosis y las neuronas consiguen como una “inmortalidad” que esto favorece la formación de ovillos neurofibrilares y placa beta-amiloide (Copani *et al.* 2008 & Clark and Paluch 2011).

También otro de nuestros resultados relacionado con el efecto de *P. gingivalis* sobre la apoptosis, donde pudimos evidenciar que se produce muerte celular de tipo apoptosis temprana en las concentraciones de MOI: 5, 10, 50, 100 y lisado celular, y muerte celular de tipo apoptosis tardía en las concentraciones de MOI: 5,10,100 y 200.

Esto se confirma en el artículo de Inaba *et al.*, en el 2018, donde con sus resultados obtenidos realizan un modelo esquemático de la regulación del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células HTR-8 infectadas con *P. gingivalis*, donde este periodontopatógeno explota las vías JNK y p53/p38, generando progresión del ciclo celular y la posterior apoptosis (Figura 17) (Inaba *et al.* 2018).

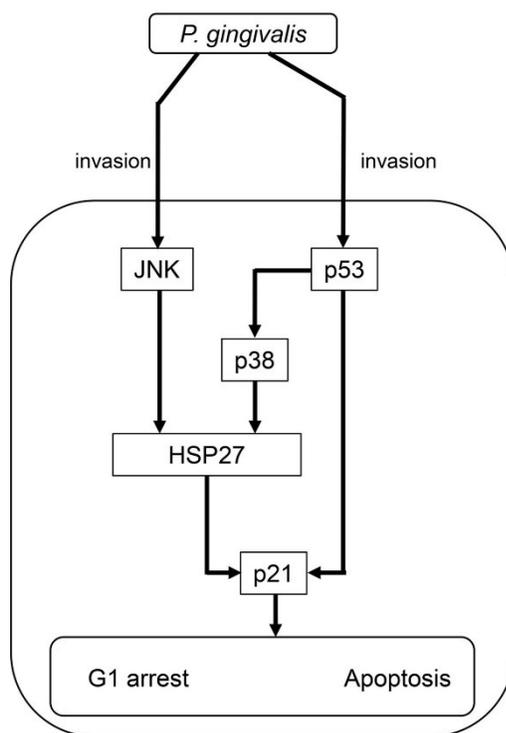


Figura 17: Modelo de la regulación del ciclo celular y la inducción de apoptosis, en células HTR-8 infectadas con *P. gingivalis*. Tomado de: Inaba *et al.* 2018.

Y finalmente hablando de la producción de péptido beta-amiloide por efecto de *P. gingivalis* W83 en células SHSY5Y, encontramos en nuestros resultados que esta producción es directamente proporcional, es decir que a mayor MOI mayor producción de péptido beta-amiloide. Esto se confirma con los resultados de Dominy *et al.*, en el 2019, donde obtuvieron que la infección oral por gingipaínas factor de virulencia de *P. gingivalis* en ratones provocó aumentó la producción de péptido beta-amiloide, componente principal de las placas amiloides, en la enfermedad de Alzheimer (Dominy *et al.* 2019). Por otro lado Yamada *et al.*, en el 2020, recientemente pudieron confirmar que PGDHC derivada de *P. gingivalis* promueve la amiloidogénesis y la hiperfosforilación, así como la producción de marcadores de fenotipo secretor asociados a la senescencia (SASP).

Como podemos observar a la fecha, este es el primer estudio donde se demuestra el efecto de la bacteria completa de *P. gingivalis* W83 sobre la viabilidad y la apoptosis, sobre el ciclo celular neuronal y la producción de péptidos A β en células neuronales SHSY5Y.

12. Conclusiones

1. La bacteria completa viva de *P. gingivalis* W83 indujo citotoxicidad y disminución del metabolismo celular a las concentraciones máximas evaluadas (MOI: 100 y 200) en células SHSY5Y, lo que nos demuestra el efecto neurotóxico que puede producir este periodontopatógeno a nivel neuronal.
2. La estimulación de *P. gingivalis* en las células SHSY5Y produjo cambios en la distribución de las fases del ciclo celular presentándose principalmente un arresto celular en la fase G0/G1 a las máximas concentraciones evaluadas (MOI: 100 y 200) y en la fase S a las menores concentraciones, correlacionándose con la hipótesis de los golpes de la EA.
3. *P. gingivalis* al producir un arresto en la fase G0/G1 induce en las células SHSY5Y una apoptosis temprana, mientras que cuando se presenta un arresto en la fase S se relaciona con una apoptosis tardía, lo que conlleva a la muerte neural.
4. La bacteria completa de *P. gingivalis* indujo la producción de péptido A β 42 en células SHSH5Y, lo que conlleva a los procesos de neurotóxica y amiloidogénesis, procesos claves en la enfermedad de Alzheimer.

13.Recomendaciones:

1. Continuar evaluando los mecanismos de neurodegeneración producidas por *P. gingivalis*, principalmente determinado el efecto sobre la vía de caspasas e inflamomasoma, Apoptosis mediada por el gen Bax y Citocromo C.
2. Realizar estudios asociados con los procesos de producción del PP, fosforilación de Tau. Mecanismos clave de la patogenia de EA.
3. Realizar estudios que permitan determinar la asociación de la neurodegeneración producida por *P. gingivalis* y los procesos de estrés oxidativo.

14. Financiación:

Este trabajo de grado 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 Undécima Convocatoria Interna para la Financiación de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica 2019, modalidad general, código proyecto PCI-2019-10820.

15. Referencias Bibliográficas:

1. D'Andrea MR, Nagele RG, Wang HY, Peterson PA, Lee DHS. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology*. 2001;38(2):120-34.
2. Rius-Pérez S, Tormos AM, Pérez S, Taléns-Visconti R. Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease? *Neurologia (Engl Ed)*. 2018 Mar;33(2):112-120.
3. Zeng F, Liu Y, Huang W, Qing H, Kadowaki T, Kashiwazaki H, et al. Receptor for advanced glycation end products up-regulation in cerebral endothelial cells mediates cerebrovascular-related amyloid β accumulation after *Porphyromonas gingivalis* infection. *Journal of Neurochemistry*. 2020;(May):1-13.
4. Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med*. 2008 Dec;12(6A):2263-80.
5. Kovacs GG. Concepts and classification of neurodegenerative diseases [Internet]. Kovacs GG, Alafuzoff I, editores. *Handbook of Clinical Neurology*, 1st ed. Elsevier B.V., 2018. Vol. 145, p. 301-307.
6. Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*. 2017;15(7):996-1009.
7. Trastornos neurológicos: un serio desafío para la salud pública en las Américas y en todo el mundo [Internet]. Washington. Organización mundial de la salud y Organización Panamericana de Salud, 26 agosto, 2008. [Citado 22 de octubre de 2021]. Disponible en: URL:
https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=240:2008-trastornos-neurológicos-un-serio-desafío-salud-publica-americas-todo-mundo&Itemid=40595&lang=es.
8. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* [Internet]. 2019;15(3):321-87.
9. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020 Mar 10.

10. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. Handbook of Clinical Neurology. 2019;167:231–55.
11. Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience. 1998;248(3):111–22.
12. Scheltens P, Strooper B de, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. 2022;397(10284):1577–90.
13. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. European Journal of Neurology. 2018;25(1):59–70.
14. 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.
15. Benefits P. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. Includes a Special Report on the Financial and Personal Benefits of Early Diagnosis. 2018; 1-88.
16. Impairment MC. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's and Dementia. 2022;18(4):700–89.
17. Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: Is there an association? Geriatrics and Gerontology International. 2015;15(4):391–404.
18. 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; 1-140.
19. Ministerio de salud, Boletín de Salud Mental No 3, Boletín de salud mental Demencia, Subdirección de Enfermedades No Trasmisibles Grupo Gestión Integrada para la Salud Mental., Octubre de 2017.
20. Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. FEBS Letters. 2013;587(13):2046–54.
21. Zhang X, Song W. The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation. Alzheimer's Research and Therapy. 2013;5(5):1–8.
22. Kamer AR, Pirraglia E, Tsui W, Rusinek H, Vallabhajosula S, Mosconi L, et al. Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. Neurobiology of Aging. 2015;

23. Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell*. 2005;120(4):545–55.
24. Sadrameli M, Bathini P, Alberi L. Linking mechanisms of periodontitis to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol*. 2020;33(2):230–8.
25. Cárdenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baéz-Matus X, Caviedes P. Role of Tau Protein in Neuronal Damage in Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *Archives of Medical Research*. 2012;43(8):645–54.
26. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. 2012;148(6):1204–22.
27. Seymour T, Zhang J. *Porphyromonas Gingivalis* in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Its Therapeutic Target . *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*. 2022;7(1):45–53.
28. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical Journal*. 2019;42(1):27–35.
29. Vergheze PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*. 2011;10(3):241–52.
30. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*. 2010;63(1–2):189–211.
31. Katsnelson A, Strooper B de, Zoghbi HY. Neurodegeneration : From cellular concepts to clinical applications. *Sci Transl Med*. 2016;18:1–6.
32. Leblanc AC. The Role of Apoptotic Pathways in Alzheimer ' s Disease Neurodegeneration and Cell Death. *Curr Alzheimer Res*. 2005;389–402.
33. Terry RD. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2000;59(12):1118–9.
34. Lossi L, Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology*. 2003;69(5):287–312.
35. Chan FKM, Luz NF, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annual Review of Immunology*. 2015;33(November):79–106.

36. Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(10).
37. Copani A, Guccione S, Giurato L, Caraci F, Calafiore M, Sortino MA. The Cell Cycle Molecules Behind Neurodegeneration in Alzheimer ' s Disease : Perspectives for Drug Development. 2008;2420-32.
38. Clark, A.G., Paluch, E. (2011). Mechanics and Regulation of Cell Shape During the Cell Cycle. In: Kubiak, J. (eds) *Cell Cycle in Development. Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer, Berlin, Heidelberg. Disponible en: URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_3
39. Raina AK, Monteiro MJ, Mcshea A, Smith MA. The role of cell cycle-mediated events in Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology*. 1999;80(2):71-6.
40. Nagy Z. The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2007;1772(4):402-8.
41. Currais A, Hortobágyi T, Soriano S. The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Aging*. 2009;1(4):363-71.
42. G. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, 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. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45(March):S1-8.
43. 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.
44. Mariano Sanz MT. Periodontitis. Orientación para clínicos. *Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración*. 2019;2019:12.
45. Meghil MM, Cutler CW. Oral microbes and mucosal dendritic cells, “spark and flame” of local and distant inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(5):1-17.
46. Herrera David, Figuero Elena, Shapira Lior, Jin Lijian SMariano. Clasificación de las enfermedades periodontales. *Avances en periodoncia e implantología oral*. 2017;6(1):3-50.

47. Ss S, Ad H, Ma C, Kent SC. Microbial complexes in subgingival plaque - Socronsky - J Clin Perio 1998. 1998;
48. Hajishengallis G. Immune Evasion Strategies of *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Oral Biosciences. 2011;53(3):233–40.
49. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology. 2015.
50. Nie R, Wu Z, Ni J, Zeng F, Yu W, Zhang Y, et al. *Porphyromonas gingivalis* Infection Induces Amyloid- β Accumulation in Monocytes/Macrophages. J Alzheimers Dis. 2019;72(2):479–94.
51. Olsen I, Singhrao SK. Is there a link between genetic defects in the complement cascade and *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease? Journal of Oral Microbiology. 2020;12(1).
52. Singhrao SK, Olsen I. Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. Journal of Oral Microbiology. 2019;11(1).
53. Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology. 1997;2(1):3–10.
54. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28(1):12–55.
55. Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. Journal of Periodontology. 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31.
56. 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.
57. Sheets SM, Potempa J, Travis J, Fletcher HM, Casiano CA. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 synergistically disrupt endothelial cell adhesion and can induce caspase-independent apoptosis. Infection and Immunity. 2006;74(10):5667–78.
58. 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, Behavior, and Immunity*. 2017;65:350–61.

59. 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. *Translational Neurodegeneration*. 2021;10(1):1–23.

60. Yamada C, Akkaoui J, Ho A, Duarte C, Deth R, Kawai T, et al. Potential Role of Phosphoglycerol Dihydroceramide Produced by Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology*. 2020;11(November):1–9.

61. Zahlten J, Riep B, Nichols FC, Walter C, Schmeck B, Bernimoulin JP, Hippenstiel S. *Porphyromonas gingivalis* dihydroceramides induce apoptosis in endothelial cells. *J Dent Res*. 2007 Jul;86(7):635-40.

62. 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. *Science Advances*. 2019;5(1):1–22.

63. Maurer K, Rahming S, Prvulovic D. Dental health in advanced age and Alzheimer's Disease: A possible link with bacterial toxins entering the brain? *Psychiatry Research – Neuroimaging*. 2018;282:132–3.

64. Hashioka S, Inoue K, Miyaoka T, Hayashida M, Wake R, Oh-Nishi A, et al. The possible causal link of periodontitis to neuropsychiatric disorders: More than psychosocial mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15).

65. 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.

66. Harding A, Gonder U, Robinson SJ, Crean SJ, Singhrao SK. Exploring the association between Alzheimer's disease, oral health, microbial endocrinology and nutrition. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017;9(DEC):1–13.

67. 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. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–13.

68. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience* [Internet]. 2017;20(2):145–55.
69. Ding Y, Ren J, Yu H, Yu W, Zhou Y. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity and Ageing*. 2018;15(1):1–8.
70. Belstrøm D, Holmstrup P, Damgaard C, Borch TS, Skjødt MO, Bendtzen K, et al. The atherogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* evades circulating phagocytes by adhering to erythrocytes. *Infection and Immunity*. 2011;79(4):1559–65.
71. Singhrao SK, Harding A, Poole S, Kesavalu L, Crean SJ. *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection and its putative links with Alzheimer’s disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:137357.
72. 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. *Journal of Oral Microbiology*. 2017 Jan 17;9(1):1270602.
73. Wang RPH, Ho YS, Leung WK, Goto T, Chang RCC. Systemic inflammation linking chronic periodontitis to cognitive decline. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2019;81(January):63–73.
74. Sansores-España D, Carrillo-Avila A, Melgar-Rodriguez S, Díaz-Zuñiga J, Martínez-Aguilar V. Periodontitis and Alzheimer disease *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2021;26(1):43–51.
75. 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. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017;9(OCT):1–9.
76. Kanagasingham S, Chukkapalli SS, Welbury R, Singhrao SK. *Porphyromonas gingivalis* is a Strong Risk Factor for Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease Reports*. 2020;4(1):501–11.
77. Dickson K, Lehmann C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(18):4341.

78. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2018 Sep 6;4:575-590.
79. 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*. 2020, 14:658.
80. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer Research*. 2010;7(8):656–64.
81. 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.
82. 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 and Mechanisms of Disease*. 2017;3(1):1–7.
83. 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;13(10):1–24.
84. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;2016(108):1–11.
85. *Cell Culture Protocols: Methods and Protocols*, Colombia, Thermo Fisher Scientific, 2013, [Citado 12 de septiembre de 2021]. Disponible en: URL: https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols.html?gclid=Cj0KCQjwof6WBhD4ARIsAOi65ahOm03TSJ4iF2N0EvxEu73tjgU5m6i9A1tq5aZKnLC_9C-5BVOCDMUaAhg8EALw_wcB&s_kwid=AL!3652!3!591483547102!p!!g!!cell%20culture%20protocol&ef_id=Cj0KCQjwof6WBhD4ARIsAOi65ahOm03TSJ4iF2N0EvxEu73tjgU5m6i9A1tq5aZKnLC_9C-

5BVOCDMUaAhg8EALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!591483547102!p!!g!!cell%20culture
%20protocol&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_awa_awa

86. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*. 2014;13(8):788-94.

87. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *The Lancet Neurology*. 2011;10(9):819-28.

88. 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.

89. 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. *Dentistry Journal*. 2019 May 1;7(2):49.

90. 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; Jun;67(6):1234-1239.

91. Cunningham C, Hennessy E. Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: New experimental models adopting a broader paradigm in dementia research. *Alzheimer's Research and Therapy*. 2015, Mar 24;7(1):33.

92. 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*. 2015;43(1):67-80.

93. 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. In: *J Alzheimers Dis*. 2013;36(4):665-77.

94. 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).

95. 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; Jul;4(4):242-50.

96. Thery C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. In: Current Protocols in Cell Biology. 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22.
97. Straka, M.R., & Trapezanlidis, M., Periodontitis and stroke. *Neuro endocrinology letters*. 2013, 34 3, 200-6 .
98. McManus RM, Heneka MT. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: New insights. *Alzheimer's Research and Therapy*. 2017 Mar 4;9(1):14.
99. Olsen I, Taubman MA, Singhrao SK. *Porphyromonas gingivalis* suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis, and alzheimer's disease. *Journal of Oral Microbiology*. 2016. Nov 22;8:33029.
100. 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. *Atencion Primaria*. 2018; May;50 Suppl 1(Suppl 1):83-108.
101. 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. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017 Jun 20;7:276.
102. Huang J. Amnesias - Trastornos neurológicos - Manual MSD versión para profesionales. Generalidades sobre la función cerebral, Estados Unidos, MSD, julio 2020, [Citado 20 de febrero de 2022]. Disponible en: URL: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-neurol%C3%B3gicos/funci%C3%B3n-y-disfunci%C3%B3n-de-los-l%C3%Bbulos-cerebrales/generalidades-sobre-la-funci%C3%B3n-cerebral>
103. Kaye EK, Valencia A, Baba N, Spiro A, Dietrich T, Garcia RI. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *J Am Geriatr Soc*. 2010 Apr;58(4):713-8.
104. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *Journal of Dental Research*. 2012; Sep;91(9):816-20.

105. Abbayya K, Puthanakar NY, Naduwinmani S, Chidambar YS. Association between periodontitis and alzheimer's disease. *North American Journal of Medical Sciences*. 2015;7(6):241-6.
106. D'Uscio L V., Das P, Santhanam AVR, He T, Younkin SG, Katusic ZS. Activation of PPAR δ prevents endothelial dysfunction induced by overexpression of amyloid- β precursor protein. *Cardiovascular Research*. 2012 Dec 1;96(3):504-12
107. Nation DA, Edland SD, Bondi MW, Salmon DP, Delano-Wood L, Peskind ER, et al. Pulse pressure is associated with Alzheimer biomarkers in cognitively normal older adults. *Neurology*. 2013 Dec 3;81(23):2024-7.
108. Gangoda SVS, Avadhanam B, Jufri NF, Sohn EH, Butlin M, Gupta V, et al. Pulsatile stretch as a novel modulator of amyloid precursor protein processing and associated inflammatory markers in human cerebral endothelial cells. *Scientific Reports*. **8**, 1689 (2018)
109. Frade JM, Ovejero-Benito MC. Neuronal cell cycle: The neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle*. 2015;14(5):712-20.
110. van Leeuwen LAG, Hoozemans JJM. Physiological and pathophysiological functions of cell cycle proteins in post-mitotic neurons: implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 2015;129(4):511-25
111. Gil-Montoya JA, Sanchez-Lara I, Carnero-Pardo C, Fornieles F, Montes J, Vilchez R, et al. Is Periodontitis a Risk Factor for Cognitive Impairment and Dementia? A Case-Control Study. *Journal of Periodontology*. 2015;86(2):244-53.
112. Lee YT, Lee HC, Hu CJ, Huang LK, Chao SP, Lin CP, et al. Periodontitis as a Modifiable Risk Factor for Dementia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *J Am Geriatr Soc*. 2017;65(2):301-5.
113. Winning L, Patterson CC, Cullen KM, Stevenson KA, Lundy FT, Kee F, et al. The association between subgingival periodontal pathogens and systemic inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015 Sep;42(9):799-806.
114. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010; Jan;37(1):13-25. doi:

115. Gotsman I, Lotan C, Soskolne WA, Rassovsky S, Pugatsch T, Lapidus L, et al. Periodontal Destruction Is Associated With Coronary Artery Disease and Periodontal Infection With Acute Coronary Syndrome. *Journal of Periodontology*. 2007; May;78(5):849-58
116. DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ*. 1993 Mar 13;306(6879):688-91.
117. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. *Journal of Periodontology*. 1996 Oct;67(10 Suppl):1123-37.
118. Cerajewska TL, Davies M, West NX. Periodontitis: A potential risk factor for Alzheimer's disease. *British Dental Journal*. 2015, Jan;218(1):29-34.
119. Ryder MI. *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer disease: Recent findings and potential therapies. *Journal of Periodontology*. 2020;91(S1):S45-9.
120. Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: An update. *Journal of Neural Transmission*. 109, 813-836 (2002).
121. Bachtiar EW, Septiawidiyati TR. Possible Role of *Porphyromonas gingivalis* in the Regulation of E2F1, CDK11, and iNOS Gene Expression in Neuronal Cell Cycle: A Preliminary Study. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2021 Sep 21;11(5):582-587.
122. SH-SY5Y, New York, ATCC, [Citado 20 de junio de 2022]. Disponible en: URL: <https://www.atcc.org/products/crl-2266#product-references>
123. Saenz-Muñoz B. Evaluación del metabolismo de la Resazurina en función de la forma y tamaño de esferoides tumorales orales. [tesis pregrado]. Bogotá, Universidad el Bosque 2021;1-44.
124. 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*. 2020;25:2515690X20978391.
125. Castellanos JE, Neissa JI, Camacho SJ. La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y. *Biomédica*. 2016;36:156.
126. Inaba H, Amano A, Lamont RJ, Murakami Y, Matsumoto-nakano M. crossm Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by *Porphyromonas*. 2018;1-13.

127. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(4):277-90.