



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE REHABILITACIÓN ORAL**

**“RELACIÓN ENTRE PATÓGENOS ORALES BACTERIANOS Y
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, REVISIÓN SISTEMÁTICA
DE LA LITERATURA”**

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la
Universidad de Talca como parte de los requisitos exigidos
para la obtención del título de Cirujano Dentista.

ESTUDIANTES: ALEJANDRA MORALES PALACIO

M. VALENTINA OPAZO INZULZA

PROFESOR GUÍA: DRA. SORAYA LEÓN ARAYA

PROFESOR INFORMANTE: DRA. CONSTANZA FERNÁNDEZ

TALCA - CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

ÍNDICE

ÍNDICE	1
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. METODOLOGÍA	6
3.1 Protocolo	6
3.2 Criterios de Elegibilidad	6
3.3 Fuentes de Información.....	6
3.4 Estrategias de Búsqueda	7
3.5 Selección de los Estudios.....	7
3.6 Extracción de Datos	7
3.7 Lista de Datos	8
3.8 Análisis de Riesgo de Sesgo	8
3.9 Análisis e interpretación de datos	9
4. RESULTADOS	10
4.1. Selección de Estudios	10
4.2 Características de los Estudios.....	11
4.2.1 Estudios experimentales in vitro:	11
4.2.2 Estudios experimentales en animales:.....	11
4.2.3 Estudios observacionales:.....	12
4.2.4 Resumen características principales.....	13
4.3 Análisis de riesgo de sesgo	15
4.4 Outcomes y Resultados.....	16

4.4.1 Estudios experimentales in vitro:	16
4.4.2 Estudios experimentales en animales:	16
4.4.3 Estudios observacionales:.....	17
4.5 Estudios excluidos	23
5. DISCUSIÓN	25
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
7. ANEXOS.....	33
7.1 Formulario para la Extracción de datos	33
7.2 Análisis de riesgo de sesgo	34
7.3 Metodología estudios incluidos	38

La enfermedad de Alzheimer (EA) y su etiología infecciosa es un tema actual de investigación en odontología enfocada en la microbiota oral. El objetivo de esta RSL es determinar la relación entre patógenos orales bacterianos y EA, identificando estudios que los enlacen. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica en *Medline*, *Web of Science*, *Cochrane Library* y *Scielo*, sin restricción idiomática ni fecha. Se incluyeron estudios primarios in vivo o in vitro, con signos y/o diagnóstico de EA, y enfermedades bucales asociadas a patógenos bacterianos. Se excluyen los estudios con patología viral, micótica y bacterias no asociadas a la cavidad bucal. Se identificaron 918 estudios, se evaluaron 23 artículos de texto completo y finalmente se incluyeron 2 estudios in vitro, 7 estudios experimentales en animales y 8 observacionales, obteniendo así una muestra muy heterogénea. Se encontró mayor prevalencia de bacterias y anticuerpos contra *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, entre otras, en tejido cerebral y en suero, además de niveles altos de citoquinas pro-inflamatorias, asociada a EA.

La posible asociación entre ambas variables se relaciona con la inflamación crónica, por la exposición constante a factores de patogenicidad bacterianos o por la infección bacteriana a los tejidos cerebrales. Si bien aún faltan ensayos clínicos aleatorizados para confirmar significativamente esta relación, esta RSL da pie para continuar en la investigación y enfatizar en la prevención de enfermedades orales bacterianas, principalmente periodontales en el adulto mayor quienes tienen mayor riesgo de desarrollar EA.

PALABRAS CLAVE: *Alzheimer disease, dementia, Oral Microbiota, bacterias, oral pathogens.*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente en el adulto mayor, constituyendo entre el 50 al 75% de los casos de demencia en personas mayores de 60 años (1). Se estima que 44 millones de personas en el mundo la padecen (2), siendo un problema de salud pública importante en sociedades envejecidas como la nuestra.

La EA es un trastorno neurodegenerativo y su presentación clínica inicial más común es el déficit de memoria episódica, que se acompaña de la afectación progresiva de otros dominios cognitivos (3). Este tipo de demencia se define patológicamente por la acumulación extracelular de amiloide- β (A β), acumulación intracelular de proteína Tau, pérdida neuronal y sináptica, atrofia cerebral e inflamación (4). Se describen dos tipos de EA: de inicio precoz o “familiar”, asociada a la mutación de 3 genes “*amyloid precursor protein* (APP), *presenilin 1* (PSEN1) y *presenilin 2* (PSEN2)”, es poco frecuente y se inicia en personas jóvenes, entre 30-50 años, mientras que el tipo de EA tardío o “esporádica” está impulsada por una interacción compleja entre factores genéticos, principalmente al gen de la alipoproteína E-4 (ApoE 4) y ambientales, como enfermedades crónicas no transmisibles, ej. la hipertensión o diabetes (2) ante lo cual, actualmente se plantea una nueva línea de investigación relacionando los patógenos orales con la etiología y progresión de la EA, ya que se describe que estos pueden aumentar el estado inflamatorio y la susceptibilidad al desarrollo de EA.(1)

Recientes estudios describen que los pacientes con periodontitis crónica tienen mayor riesgo de desarrollar demencia (5). Así también, algunos estudios describen que infecciones orales con *Porphyromonas gingivalis* (Pg) o la introducción de su lipopolisacárido (LPS) en varios modelos de ratón, ha demostrado el desarrollo de lesiones distintivas neuropatológicas clave en la EA, manifestándose entonces asociaciones de patógenos bacterianos orales presentes en la boca de la mayoría de las personas(6). En relación a lo anterior, y llevándolo a la población chilena, un estudio nacional del año 2017 (7) mostró que el 67,9% de la población en estudio presenta Pg en el fluido crevicular gingival. Con ello se trazan esbozos de una relación de suma importancia, ya que las

bacterias que actualmente se vinculan a la EA, como *Pg*, *Fusobacterium nucleatum (Fn)* y *Prevotella intermedia (Pi)*, entre otras, están asociadas a la enfermedad periodontal (EP) (1). Por lo tanto, la identificación y exposición a estos patógenos orales puede ser un factor prevenible y controlable en el tiempo, ya sea con un adecuado manejo de la higiene del paciente, como con sus factores de riesgo (ej. tabaco, diabetes mellitus) sería posible de este modo retrasar la aparición y/o la progresión de una de las mayores causas de dependencia, discapacidad y mortalidad en el adulto mayor como es la EA (2). Es por ello que el objetivo de nuestra investigación es determinar la relación entre patógenos orales bacterianos y EA, mediante una revisión sistemática de la literatura (RSL) disponible en la actualidad.

3.

METODOLOGÍA

3.1 Protocolo

Para llevar a cabo esta RSL se utilizó el protocolo “PRISMA” (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*) (8), que consiste en una lista de comprobación de 27 puntos sobre los apartados más representativos de un artículo original, así como el proceso de elaboración de estas directrices.

3.2 Criterios de Elegibilidad

La pregunta de investigación se determinó en base al acrónimo *P.E.C.O.*:

- **Participantes:** *Se incluyeron estudios en murinos (ratones) y humanos. Además de los modelos in vitro con células cerebrales, pertenecientes a mamíferos.*
- **Exposición:** Patógenos orales bacterianos asociados a enfermedades bucales
- **Comparación:** Sin exposición a patógenos orales bacterianos asociados a enfermedades bucales
- **Outcomes:** Diagnóstico clínico y/o histopatológico de EA

Los tipos de estudios de elegidos son ensayos clínicos aleatorizados (ECA), estudios observacionales (casos y control, cohorte de casos), estudios experimentales en animales e *in vitro*, que cumplen con los criterios anteriormente mencionados en la pregunta *P.E.C.O.*

No se aplicaron restricciones en cuanto al idioma, ni fecha de publicación, abarcando toda la literatura disponible.

Además se realizó “*Cross-referencing*” para identificar nuevos artículos pertinentes al tema. La literatura gris no fue evaluada.

3.3 Fuentes de Información

Se realizó una búsqueda en las bases de datos: *Medline*, *Web of Science*, *Scopus*, *Cochrane Library* y *SciELO*, durante el mes de Abril del 2019, y se actualizó de manera pertinente en el mes de septiembre del mismo año.

3.4 Estrategias de Búsqueda

La estrategia de búsqueda realizada se describe a continuación:

("Alzheimer Disease" OR "Impairment Cognitive" OR Dementia OR "Dementia Senile") AND (Relatio OR Connec* OR Connection OR Association OR Link OR Connexion) AND (((((Bacteria) OR "Porphyromonas gingivalis") OR "Fusobacterium Nucleatum") OR "Prevotella Intermedia") OR "Treponema Pallidum")*

3.5 Selección de los Estudios

Dos autores de manera independiente realizaron la selección de estudios mediante el programa *Rayyan* (9), en el cual se eliminan duplicados de búsqueda. Se procedió a seleccionar los estudios según título, resumen y finalmente texto completo, descrito en el diagrama de flujo PRISMA(10) (*Figura 1*).

Al aplicar los criterios de elegibilidad, los autores no conocen los nombres de los autores, instituciones, revista, ni año de publicación.

En caso de controversia en la selección de un estudio, se resolvió con una discusión entre los autores y de no resolver, se acudió a un tercero, en este caso la docente guía de memoria.

Se incluyeron en un inicio todos los estudios que cumplan con los criterios anteriormente mencionados en el ítem “3.2 Criterios de Elegibilidad”

Se excluyeron todos los estudios de etiología infecciosa relacionada a hongos o virus, como también microorganismos bacterianos no relacionados a la cavidad oral.

3.6 Extracción de Datos

Una vez seleccionados los artículos, dos autoras de manera independiente realizaron la extracción de datos mediante un formulario adaptada al estudio basados en el Manual Cochrane de revisiones sistemáticas de intervenciones, Versión 5.1.0. (11) con el fin de poder llevar a cabo un análisis cualitativo de los datos.

Los desacuerdos se resolvieron mediante discusión entre las dos autoras de la revisión anteriormente mencionadas; si no se llega a un acuerdo, se planeó que un tercer autor decidiera, en este caso, la docente guía.

3.7 Lista de Datos

De cada estudio incluido, se extrajo la siguiente información mediante un formulario piloto: (*Anexo 7.1*)

- **Información del Estudio:** ID del estudio, cita, país, declaración de conflictos de intereses y elegibilidad.
- **Participantes:** edad, sexo, entorno clínico, estado de salud, criterios de inclusión, criterios de exclusión, parámetros clínicos de interés, número de muestra incluido, número de muestra evaluado, n° pérdidas y n° intervenciones.
- **Métodos:** diseño del estudio y tiempo de seguimiento
- **Intervenciones y Comparaciones:** n° total intervenciones, descripción de la intervención y controles.
- **Outcomes:** nombre de cada *outcome*, definición del resultado, criterios diagnósticos y descripción del tiempo de determinación.
- **Resultados:** resumen de resultados para cada resultado incluyendo variables cuantitativas o cualitativas según sea el caso.
- **Conclusiones Principales & Otros:** financiamiento, referencias de otros estudios relevantes, si se requiere contactar a los autores, otros comentarios.

3.8 Análisis de Riesgo de Sesgo

Para determinar la validez de los estudios incluidos, dos autoras realizaron el análisis de riesgo de sesgo de forma independiente y cegado respecto al par, título, autor y revista de los estudios. Se utilizó para ello la herramienta de colaboración de Cochrane ‘ROBINS - I’, (12) (*Anexo 7.2*), justificando de ese modo si el estudio es de **Bajo, Moderado, Crítico o Grave riesgo de sesgo** según los siguientes ítems:

- A. Sesgo de confusión
- B. Sesgo de selección de participantes

- C. Sesgo en la clasificación de intervenciones
- D. Sesgo por desviación de las intervenciones previstas
- E. Sesgo por datos faltantes
- F. Sesgo en la medición de resultados
- G. Sesgo en la selección del resultado informado

3.9 Análisis e interpretación de datos

La realización de un meta-análisis para determinar la relación de los estudios incluidos no fue posible debido a la heterogeneidad de las investigaciones, metodologías y participantes. Por lo tanto, se desarrolló una RSL con enfoque cualitativo, resumido en una tabla de aspectos importantes de cada estudio, tales como participantes, metodología, *outcomes* y resultados.

4.

RESULTADOS

4.1. Selección de Estudios

Al realizar la búsqueda bibliográfica se identificaron inicialmente 911 citas, además de 6 estudios identificados mediante la verificación de referencias de los trabajos relevantes previamente localizados, tras ajustar duplicados, quedaron 685 estudios.

Estos últimos fueron analizados según título y resumen, descartando 662 artículos que claramente no cumplían con los criterios de inclusión mencionados.

Se analizaron a texto completo 23 artículos, de ellos se eliminaron 7 (refiérase al ítem “4.4 Estudios excluidos”), incluyendo entonces 16 artículos de investigación en la RSL.

Todo el proceso de búsqueda y selección de los estudios primarios se explica detalladamente en la *Figura 1*.

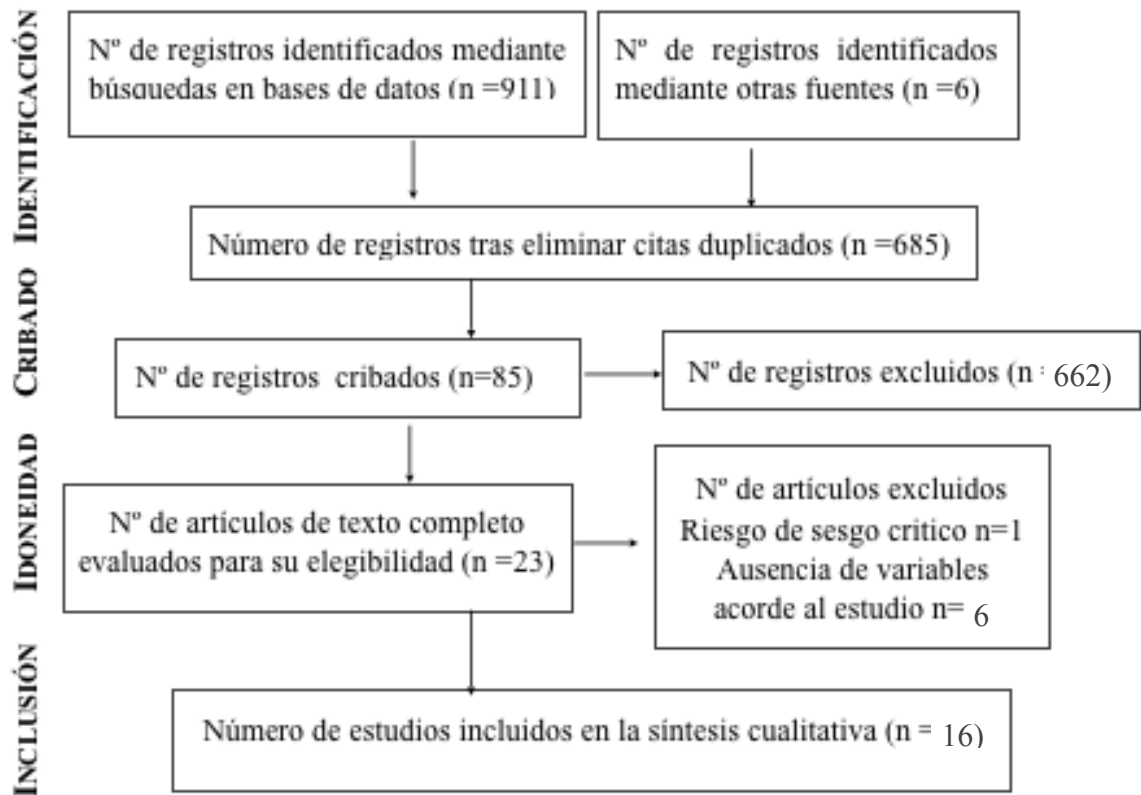


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA.

4.2 Características de los Estudios

Todos los estudios se disponen en idioma inglés y el periodo de publicaciones oscila entre el año 2002 al 2019.

Se incluyeron 4 estudios experimentales *in vitro*, 7 estudios experimentales en animales y 8 observacionales, lo que demuestra una heterogeneidad en los estudios disponibles en la actualidad. Es importante destacar que el estudio de Poole, S., & cols. (13) presenta metodología experimental *in vitro* y observacional, además los estudios de Ishida, N., & cols (14) y Wu, Z., & cols. (15) presentan metodología experimental *in vitro* y en animales, por lo que se presentan características principales, metodologías, *outcomes* y resultados para cada una, como si fuesen estudios diferentes.

La metodología y estadísticos utilizados en cada estudio se describe detalladamente en el *Anexo 7.3*.

A continuación se describen las características de los estudios incluidos y se presenta una tabla resumen de ellas (*Tabla 1*).

4.2.1 Estudios experimentales *in vitro*:

Las muestras de estos estudios contemplaban cultivos celulares microgliales, de células mixtas del hipocampo o cultivos celulares de astríctos (SVGp12).

Los cultivos se estimularon con *Pg*-LPS o *Aa*-LPS del Serotipo a, b y/o c; determinando la presencia de los agentes bacterianos en los cultivos (invasividad), los efectos del LPS a nivel celular, como la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, receptores tipo Toll, cambios morfológicos celulares, etc.

4.2.2 Estudios experimentales *en animales*:

Las muestras de estos estudios contemplaban ratones de distintas cepas, de 4 semanas a 12 meses de edad y tamaño muestral desde los 24 a 138 ratones, con un total de 420 ratones evaluados.

Estos animales fueron infectados principalmente con *Pg*-LPS ya sea de forma sistémica u oral en el tiempo, simulando una inflamación crónica, como es en el caso de la enfermedad periodontal.

Se observó el comportamiento de los ratones mediante diversas pruebas, por ejemplo: la prueba de campo abierto (PCA), laberinto de agua de Morris (LAM), prueba de evitación pasiva (PEP), etc., evaluando la capacidad de aprendizaje y memoria, entre otros.

Además, se analizaron los tejidos cerebrales post infección por medio de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), electrotransferencia para la detección de ADN genómico bacteriano, y de citoquinas como $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8, entre otras.

4.2.3 Estudios observacionales:

Las muestras de estos estudios contemplaban adultos con un promedio de edad de 74,8 años. La recopilación final de muestras, incluyendo todos los estudios observacionales correspondieron a 63 muestras de tejido cerebral humano, 2858 muestras de suero sanguíneo, 33 muestras de saliva, 40 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y 2.441 evaluaciones cognitiva a adultos mayores.

Se examinó el estado cognitivo a través del Test “Mini-Examen del Estado Mental” (MMSE), además de diversos parámetros, tales como: detección de anticuerpos IgG contra *Pg*, *Aa*, *Tf*, *Td*, *Cr*, *En*, *An*, *Fn*, *Pi*, citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IL-1 β , IL6, IL 10; mediante PCR, inmunotransferencia o ELISA, en suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo y en ganglio trigémino. También se buscó mediante inmunohistoquímica, PCR y/o inmunofluorescencia, la presencia del LPS-*Pg* y de especies *Treponema* en tejidos cerebrales.

Con ello, se busca encontrar una relación entre cantidad de anticuerpos presentes en los pacientes & alteración cognitiva, cantidad de anticuerpo & riesgo de padecer EA, asociación entre citoquinas & diagnóstico de EA y detección de bacterias orales a nivel cerebral & del ganglio trigémino.

4.2.4 Resumen características principales

Tabla 1. Resumen características de los estudios incluidos en la RSL

Autor, año	TE	n.e	Edad	Criterios de inclusión	Segui- miento	Bac. Evaluadas	Vía de infección
Riviere, G., & cols. (16)	Obs., Hum.	76	44 a 102 años	C/S EA	Trans- versal	<i>Bb, Ta, Td, Tma, Tme, Tv, Tp, Ts,</i>	VO, EP
Noble, J., & cols. (17)	Obs., Hum.	2.355	\bar{x} : 70,8 años	Inscrito en 1991-1994, Análisis sérico Pg, Evaluación cognitiva, y ≥ 60 años	Trans- versal	<i>Pg (Pg-IgG)</i>	VO, EP
Kamer, A., & cols. (18)	Obs., Hum.	34	40 a > 80 años	C/S EA, disponibilidad de plasma congelado y estado de portador APOE $\epsilon 4$.	Trans- versal	<i>Aa, Pg, Tf</i>	VO, EP
Sparks Stein, P. & cols. (19)	Obs., Hum.	158	70 a 74 años	Sujetos CI en la extracción de suero basal, con extracciones de sangre en serie disponibles hasta DCL o EA.	GC: 12,5 años en \bar{x} . DCL: 9,8 años en \bar{x} . EA: 9,6 años en \bar{x} .	<i>Aa, Pg, Cr, Td, Fn, Tf y Pi</i>	VO, EP
Poole, S., & cols. (13)	Obs., Hum.	20	22 a 103 años	C/S EA	Trans- versal	<i>Pg, Td, Tf</i>	VO, EP
	Exp. In Vitro	-	-	Cultivos de una línea celular de astrictos (SVGp12)	24-48 hrs	<i>Pg (Pg-LPS)</i>	Exp. directa
Ishida, N & cols. (14)	Exp. In Vitro	-	-	Cultivos neuronales y células microgliales de ratón	Trans- versal	<i>Pg (Pg-LPS)</i>	Exp. directa
	Exp. Anim	26	62 sem	Ratones transgénicos tipo: APP-tg	5 y 11 sem	<i>Pg</i>	VO, MG
Noble, J.M., & cols. (20)	Obs., Hum.	219	\bar{x} : 75,5 años	Inscrito en 1999-2000, sin deterioro cognitivo en la extracción de suero basal, y ≥ 1 visitas de seguimiento a partir de entonces.	4,4 años (EA), 5,5 años (GC)	<i>Pg, Tf, Aa, Td, Cr, En, An,</i>	VO, EP
Poole, S., & cols. (21)	Exp. Anim	138	8sem	Ratón ApoE -/-	12 y 24 sem	<i>Pg, Td, Tf</i>	VO
Ide, M., & cols.(22)	Obs., Hum.	52	\bar{x} : 77,7 años	Mínimo 10 dientes, sin tto para EP en los últimos 6 meses, no fumadores	6 meses	<i>Pg</i>	VO, EP
Wu, Z., & cols. (15)	Exp. Anim	24	2 y 12 meses	Ratones CatB -/-, GC: ratones salvajes (WT)	1 y 5 sem	<i>Pg</i>	IP

Continuación tabla 1. Resumen características de los estudios incluidos en la RSL

Autor, año	TE	n.e	Edad	Criterios de inclusión	Segui- miento	Bac. Evaluadas	Vía de infección
Wu, Z., & cols. (15)	Exp. In Vitro	-	-	Microglia primaria y MG6	24hrs	Pg (Pg-LPS)	Exp. directa
Ilievski, W & cols. (23)	Exp. Anim	20	6 sem	Ratones C57BL / 6 machos	22 sem	Pg	VO
Zhang, J., & cols. (24)	Exp. Anim	60	8 sem	ratones C57BL / 6 machos, asépticos	7 días	Pg	Inyección LPS
Ding, Y., & cols. (25)	Exp. Anim	60	4 y 12 sem	Ratones C57BL / 6 J hembra	6 sem	Pg	VO
Laugisch, O & cols. (26)	Obs., Hum.	40	< a 70 años	Puntaje del MMSE >19 sin consumo de medicamentos relevantes, sin DM o anemia, no fumadores o ex-fumadores >5 años.	Transversal	Pg, Aa y Treponema (Ts/Td)	VO, EP
Hayashi, K & cols, (27)	Exp. Anim	92	6 y 13 meses	ratones tipo: 5XFAD tratados 6 y 13 meses con pb y Pg-LPS/ Ratones LT 5XFAD	28 días	Pg-LPS	ICV
Díaz, J., & cols. (28)	Exp. In Vitro	-	-	Cultivos primarios de microglía y mixtos del hipocampo	48hrs	Aa serotipo a, b y c (Aa-LPS)	Exp. directa

Aa: Agregatibacter Actinomycetemcomitans, Aj: Adulto joven, An: Actinomyces Naeslundii, Bac: Bacterias, Bb: Borrelia Burgdorferi, c/g: cada grupo (EA y GC), CI: cognitivamente intacto, C/S EA: con y sin EA, Cr: Campylobacter Rectus, DCL: deterioro cognitivo leve, EA: enfermedad de Alzheimer, En: Eubacterium nodatum, EP: enfermedad periodontal, Exp.: experimental, ExpA: experimental en animales, Fn: Fusobacterium Nucleatum, GC: grupo control, Hrs: horas, ICV: intracerebroventricular, IgG: Inmunoglobulina G, IP: Intraperitoneal, LT: littermate, MG: margen gingival, n.e: muestra evaluada, Obs, Hum: observacional en humanos, Pb: placebo, Pg: Porphyromonas Gingivalis, Pi: Prevotella Intermedia, Sem: semana, Ta: Treponema amylovorum, Td: Treponema denticola, TE: tipo de estudio, Tf: Tannerella forsythia, Tma: Treponema maltophilum, Tme: Treponema Medium, Tp: Treponema Pectinovorum, Ts: Treponema Socranskii, tto: tratamiento, Tv: Treponema vincentii, VO: vía oral, x̄: promedio.

4.3 Análisis de riesgo de sesgo

Los estudios analizados a texto completo se clasificaron en: 7 estudios con riesgo de sesgo bajo, 6 estudios con al menos un criterio a analizar con riesgo moderado, 3 estudios con al menos un criterio a analizar con riesgo grave, y finalmente 1 estudio con riesgo de sesgo crítico, este último fue excluido de la RSL. (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de riesgo de sesgo de los estudios primarios de la RSL

AUTORES (Fecha)	DOMINIO	Sesgo de confusión	Sesgo de selección de participantes	Sesgo en la clasificación de intervenciones	Sesgo por desviación de las intervenciones	Sesgo por datos faltantes	Sesgo en la medición de resultados	Sesgo en la selección del resultado informado
Riviere, G., & cols. (16)		G	M	B	B	B	B	B
Noble, J.M, & cols. (17)		B	B	B	NI	B	B	B
Kamer, A., & cols. (18)		B	B	B	B	B	B	M
Cockburn, A., & cols. (29)		C	G	B	B	G	B	B
Sparks Stein, P. & cols. (19)		B	B	B	B	B	B	B
Poole, S., & cols. (13)		G	M	B	B	B	B	B
Ishida, N & cols. (14)		B	B	B	B	B	B	B
Noble, J.M, & cols. (20)		M	B	B	B	B	B	B
Poole, S., & cols. (21)		B	B	B	B	B	B	B
Ide, M., & cols. (22)		B	B	B	B	M	B	B
Wu, Z., & cols. (15)		B	B	B	B	B	B	B
Ilievski, W & cols. (23)		B	B	B	B	M	B	B
Zhang, J., & cols. (24)		B	B	B	B	B	B	B
Ding, Y., & cols. (25)		B	B	B	B	B	B	B
Laugisch, O & cols. (26)		M	M	B	B	B	B	B
Hayashi, K & cols, (27)		B	B	B	B	B	B	M
Díaz, J., & cols. (28)		G	NI	B	B	B	B	B

B: Bajo riesgo de sesgo, M: moderado riesgo de sesgo, G: Grave riesgo de sesgo C: Crítico riesgo de sesgo, NI: no hay información. Cols.: Colaboradores.

4.4 Outcomes y Resultados

4.4.1 Estudios experimentales *in vitro*:

En los 4 estudios *in vitro* también se reflejó la asociación entre las dos variables estudiadas, ya que se detectó la presencia de PgLPS en astrocitos (13), el aumento de los niveles de A β 40 y A β 42 en cultivos neuronales estimulados con 1 y 10 μ g/ml de *Pg*-LPS, además en cultivos microgliales se produjo mayor producción de IL-1 β (15) y TNF-*a* al exponerlos a A β -42 y *Pg*-LPS en comparación a la exposición solamente de *Pg*-LPS (14) y hubo mayor cantidad de microglía activada en la presencia de PgLPS (15). Del mismo modo, frente a la exposición *Aa* en cultivos microgliales, se produjo mayor expresión de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF-*a*, mayor expresión de ARNm para TLR2 y TLR4, lo mismo ocurre en cultivos mixtos del hipocampo, y además se expresa un aumento leve pero significativo de A β 1-42 y algo sumamente importante, es que no se indujo la pérdida de células del hipocampo. (28)

4.4.2 Estudios experimentales *en animales*:

En los 7 estudios experimentales en animales (ratones) se confirmó la asociación en cuestión. Después de la infección con *Pg*, *Td* o *Tf*, se encontró ADN genómico de *Pg* en el tejido cerebral (21, 23), gingipaína intranuclear, perinuclear y extracelularmente en el hipocampo (23) y presencia de endotoxinas bacterianas (14), demostrando que *Pg* y sus productos tienen la capacidad para invadir tejidos cerebrales. La producción de IL-1 β , IL-6, IL8, TNF-*a*, expresión de APP, β -secretasa (BACE), receptores tipo toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4) aumentó significativamente en el hipocampo de los cerebros infectados con *Pg* en comparación al grupo control (14, 15, 23, 24) dependiente de la edad (25). También se detectó mayor número de neuronas deterioradas y de microglía activada, presencia de proteína Tau fosforilada y niveles de A β que en el grupo control no se detectó (14, 23, 24) y además se determinó alteración en la función de aprendizaje y memoria ante la exposición sistémica al PgLPS en ratones de mayor edad (15, 24, 27).

4.4.3 Estudios observacionales:

De los 8 estudios observacionales descritos, solo 2 estudios (22, 26) no asocian las variables en cuestión, ya que los resultados no fueron estadísticamente significativos, mencionando que “Los patógenos periodontales (PP) pueden ingresar al cerebro y estimular una respuesta inmune local. Sin embargo, en pacientes con demencia de hasta 70 años, los PP no actúan como desencadenantes en la EA” (26). Por el contrario, los 6 estudios restantes sí comprueban la asociación (13, 16 - 20), mediante el nivel de anticuerpos (IgG) contra patógenos orales como *Pg*, *Aa*, *Tf*, *Fn*, *Pi*, *An* y *Td*, el nivel de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α presentes en el suero sanguíneo, la detección de especies de *Treponema* (*Td*, *Ts*, *Tp*, *Tma* y *Tme*) y de factores de virulencia como el LPS de *Aa* y *Pg* en tejidos cerebrales de personas con EA vs personas que no la padecen.

Además en el estudio (19) se determinó que el mayor nivel de anticuerpos contra las bacterias *Fn*, *Cr* y *Pi*, esta asociado a la probabilidad de desarrollar el deterioro cognitivo leve, mostrando un paso previo a la EA. Por otro lado, el estudio (20) sugiere que el alto nivel de *En*-IgG se asocia con un menor riesgo de EA.

En la Tabla 3 se describen de forma detallada cada *outcome* con su respectivo resultado de cada estudio incluido en relación con el objetivo de esta RSL.

Tabla 3. Outcomes y resultados de los estudios primarios incluidos en la RSL

Autor: Riviere, G., (16) (Obs. Hum.)

Outcome 1 “Prevalencia de *Treponema* en la corteza cerebral humana”:

- La diferencia en la proporción de *Treponema* (14/16 EA y 4/18 GC) fue E.S mediante PCR ($p < 0.001$) y/o mAbs ($p < 0.001$).
- Cada sujeto EA tenían mayor porcentaje de especies *Treponema* oral en un trozo de cerebro que el GC ($p < 0.001$)
- Tanto por PCR como mAbs, hubieron E.S más sujetos EA con *Tp* (10/16 v/s 3/18, $p < 0.02$) y *Ts* (13/16 vs. 3/18, $p < 0.001$).

Outcome 2 “Prevalencia de *Treponema* oral en el GT”: Las 3 muestras de EA tenían *Tma*, 2 también *Tme* y 1 también *Td* y *Ts*, mientras que un control solo tenía *Tme* y el otro control *Td*.

Outcome 3 “Prevalencia de *Treponema* oral en la saliva de pacientes EA y CG”: No hay diferencias E.S.

Autores: Noble, J.M, & cols. (17) (Obs. Hum.)

Outcome 1 “Relación dosis/respuesta de *Pg* y deterioro cognitivo”: Las personas con *PgIgG* más alta (> 119 UE) tenían $>$ probabilidad de recuerdo verbal tardío deficiente (OR 2.89, IC del 95% 1,14 - 7,29) y sustracción deteriorada (OR 1.95, IC del 95% 1,22 - 3,11) que aquellos con los más bajos (57 EU), con relaciones dosis-respuesta para ambos (Valor p , memoria retardada = 0.045, sustracción = 0.04). Después de ajustar las variables socioeconómicas y vasculares, estas relaciones se mantuvieron sólidas para el grupo de *Pg-IgG* más alto (memoria verbal retardada OR 3.01, IC del 95% 1,06 - 8,53. Sustracción OR 2.00, IC del 95% 1,19 - 3,36). En contraste, la memoria verbal inmediata no se asoció significativamente con *PgIgG*.

Autores: Kamer, A., & cols (18) (Obs. Hum.)

Outcome 1 “Detección de anticuerpos, TNF- α e IL en suero”:

- El grupo EA tuvo $>$ n° de pruebas positivas de *IgG* contra *Aa*, *Pg* y *Tf* en comparación con GC ($p = 0,04$). Las muestras del plasma de 13 sujetos EA (72%) fueron positivas para al menos 1 tipo de *IgG* contra *Aa*, *Pg* y *Tf* en comparación con 6 (38%) sujetos GC ($p = 0.042$).
- Los niveles de TNF- α aumentaron E.S en sujetos con EA en comparación al GC ($p=0.007$).

- Los niveles de IL-1 β e IL-6 no difirieron en sujetos con EA del GC, no se encontraron diferencias E.S en niveles de citoquinas entre los portadores de ApoE 4 ϵ y los no portadores.

Outcome 2 “Contribución de la infección periodontal e inflamación sistémica (TNF- α) al diagnóstico de EA”: los modelos logísticos binarios mostraron que la inclusión del n° de pruebas de *IgG* positivas contra *Pg*, *Aa* y *Tf* (OR = 6.1, IC 95% 1,16 - 33, valor $p=0,04$) y TNF- α (OR = 1.4, IC 95% 1,08 - 1,9, valor $p=0,01$) se ingresaron se forma simultánea al modelo, éste clasificó la EA clínica y los sujetos cognitivamente normales con una precisión del 82%.

Autores: Sparks, P., & cols. (19) (Obs. Hum.)

Outcome 1 “Determinar la asociación entre los niveles de *IgG* contra bacterias periodontales y la conversión a EA”: Los niveles de *IgG* anti *Fn* ($p < 0.0001$), *Pi* ($p < 0.0001$) y *Td* ($p = 0.027$) fueron E.S mayores en la extracción basal del grupo EA vs GC y en el modelo ajustado se mantuvieron E.S *Fn* ($p = 0.0003$), *Pi* ($p = 0.0001$) y *Td* ($p = 0.0299$). Además, los niveles de *IgG* contra *Fn* ($p = 0.0003$), *Pg* ($p = 0.0077$), *Pi* ($p < 0.0001$) y *Td* ($p = 0.05$) se elevaron después de la conversión a EA; todos permanecieron E.S en el modelo ajustado *Fn* ($p = 0.0055$), *Pg* ($p = 0,013$), *Pi* ($p < 0.0001$) y *Td* ($p = 0.044$).

Outcome 2 “Determinar la asociación entre los niveles de *IgG* contra bacterias periodontales y la conversión a DCL”: Los niveles de *IgG* contra *Fn* ($p = 0.0001$), *Cr* ($p < 0.0001$) y *Pi* ($p = 0.0001$) fueron E.S mayores en la extracción basal del grupo DCL vs el GC y

Continuación Tabla 3. Outcomes y resultados de los estudios primarios incluidos en la RSL

se mantuvo en el modelo ajustado (*Fn* [$p = 0.0002$], *Cr* [$p = 0.014$] y *Pi* [$p = .0001$]). Sin embargo, los niveles de IgG contra *Td* ($p=0.0095$) y *Tf* ($p=0,0082$) disminuyeron E.S en después de la conversión a DCL vs GC, y en el modelo ajustado los niveles de IgG contra *Cr* ($p=0.04$), *Pg* ($p=0.043$), *Td* ($p=0.03$), y *Tf* ($p=0.0054$) fueron E.S menores.

Autores: Poole, S., & cols. (13) (Obs, Hum. y exp. *in vitro*)

Outcome 1 “Detectar bacterias o elementos bacterianos en tejidos cerebrales humanos”: El marcado de inmunofluorescencia demostró un fuerte marcado en la membrana superficial y agregados extracelulares en 4/10 EA y no en los controles, lo que fue confirmado mediante la detección de PgLPS con inmunotransferencia, siendo una diferencia E.S ($p = 0.029$).

Outcome 1 “Detectar bacterias o elementos bacterianos en la línea celular astrocitos SVGp12”: El marcado de inmunofluorescencia demostró que las células fueron capaces de adsorber el PgLPS del sobrenadante en su membrana superficial, lo que fue confirmado mediante la inmunotransferencia.

Autores: Ishida, N. & cols. (14) (Exp. *In vitro* y exp. anim.)

Outcome 1 “Efecto de PgLPS sobre cultivos neuronales y microgliales”:

- Los niveles de A β 40 y A β 42 aumentaron E.S en cultivos de células neuronales estimulados con 1.0 ($p = 0.002$) y 10.0 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.00052$) de *Pg-LPS*, pero no con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ PgLPS.
- Se indujeron pequeñas cantidades de TNF- α en cultivos de células microgliales preparadas con A β 42 10 μM y con la estimulación de 0,01–1,0 $\mu\text{g/mL}$ *Pg-LPS*, sin embargo al aumentar a 0.1–1.0 $\mu\text{g/mL}$ *Pg-LPS*, la producción de TNF- α aumentó E.S (A β 42 + 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS valor $P = 0.0038$, A β 42 + 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de LPS: valor $p = 0,0012$).
- La producción de IL-1 β en cultivos microgliales con A β 42 con 1.0 $\mu\text{g/ml}$ Pg-LPS aumentó E.S la producción en comparación a la estimulacion solamente con LPS ($p = 0.037$)

Outcome 1 “Niveles de A β , IL-1 β , TNF- α y endotoxina bacteriana en ratones infectados vs control”:

- Los niveles de A β 40 y A β 42 en el hipocampo (A β 40: $p=0.047$, A β 42: $p=0.025$) y en la corteza (A β 40: $p=0.011$, A β 42: $p = 0.031$) en el grupo infectados con *Pg* fueron E.S > al GC.
- Los niveles cerebrales de IL-1 β y TNF- α fueron más altos en los ratones inoculados con *Pg* que en el GC (IL-1 β : $p=0.0062$, TNF- α : $p = 0.016$)
- Se detectó endotoxina en suero y cerebro de ratones del GC e infectados, pero en estos fue mayor, con una diferencia E.S (suero: $p = 0.033$;; Cerebros: $p = 0.022$)

Autores: Noble, J.M & Cols. (20) (Obs. Hum.)

Outcome 1 “Riesgo de desarrollar EA con títulos altos de IgG contra las bacterias”: En el modelo ajustado, un título alto de IgG-*An* ($> 640 \text{ ng/ml}$) se asoció con un mayor riesgo de EA (OR = 2.0, IC 95%: 1.1–3.8). Esta asociación fue mas fuerte después de ajustar por otros títulos significativos (OR = 3.1, IC 95%: 1.5–6.4). En este modelo, la alta IgG anti- *En* ($> 1755 \text{ ng/ml}$; 19% de los sujetos) se asoció con un menor riesgo de EA (OR = 0.5, IC 95%: 0.2-0.9).

Autores: Poole, S.; & cols. (21) (Exp. anim.)

Outcome 1 “Detectar bacterias periodontales en cerebros de ratones”: Se encontró ADN genómico de *Pg* en 6/12 ratones ApoE-/- monoinfectados a las 12sem ($p=0,006$) y 9/12 ratones ApoE -/- monoinfectados a las 24sem ($p=0,0001$), siendo ambos E.S en comparación al GC. Además, a las 24 sem, se encontró ADN genómico de *Pg* en 2/11 muestras de cerebro de ratones ApoE - / - poliinfectados, y no se mostró la presencia de *Td* ni *Tf* a las 12 o 24 sem.

Continuación Tabla 3. *Outcomes* y resultados de los estudios primarios incluidos en la RSL

Autores: Ide, M., & cols. (22) (Obs. Hum.)

Outcome 1 “Relación entre el nivel Pg-IgG con la puntuación de ADAS-cog y MMSE” No hubo asociación E.S entre los niveles IgG anti-Pg del suero y la tasa de disminución en la puntuación de ADAS-cog ($p = 0,9$) o tasa de disminución en la puntuación sMMSE ($p = 0,1$)

Autores: Wu, Z., & Cols. (15) (Exp. Anim. y exp *In Vitro*)

Outcome 1 “Alteración en la función de aprendizaje y memoria en exposición sistémica a PgLPS en ratones”: Se redujo significativamente la latencia en ratones salvajes, pero no en *CatB* - / - de mediana edad (12 meses), pero los ratones jóvenes no sufrieron retardo en el tiempo de latencia en ningún grupo.

Outcome 2 “Efectos de la exposición sistémica crónica a PgLPS en la neuroinflamación”: La producción de IL-1 β , expresión de TLR2, TLR4 y A β aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones salvajes de mediana edad, pero no en las demás intervenciones. Se aumentó significativamente la expresión de *CatB* en el hipocampo en comparación el GC en ratones de mediana edad tipo salvaje.

Outcome 1 “Efectos de la PgLPS en microglía cultivada”: La expresión media de IL-1 β en la microglía MG6 cultivada y la microglía activada aumentó significativamente a las 24hrs después del tratamiento con PgLPS (1 μ g / ml), pero ambos disminuyeron significativamente después de la incubación previa con un inhibidor específico de *CatB*.

Autores: Ilievski, V. & cols. (23) (Exp. Anim.)

Outcome 1 “Detección de Pg/gingipaina en el hipocampo de los ratones”: Se detectó Pg / gingipaina intranuclear, perinuclear y extracelularmente en el hipocampo, en todas las muestras del grupo experimental (9/9) y no en el GC (0/10) ($p < 0,0001$). Se detectó la presencia de ADN genómico para *Pg* (gen 16S ($p < 0,0001$))

Outcome 2 “Alteraciones en el hipocampo de los ratones”:

- Se observó inflamación en el hipocampo de ratones infectados, con una expresión significativamente mayor de IL6, IL1 β y TNF α en comparación al GC ($p < 0,01$).
- El n° de neuronas degenerativas fue significativamente mayor en el grupo experimental en comparación al GC ($p < 0,0001$).
- La expresión del gen APP ($p < 0,05$) y BACE1 ($p < 0,001$) fue significativamente mayor en los cerebros infectados en comparación al GC, pero la expresión de ADAM10 ($p < 0,001$) disminuyó significativamente en el grupo experimental.
- La proteína Tau fosforilada (Ser396) se detectó en los ratones *Pg* y no en el GC. ($p < 0,00001$)
- Los ratones experimentales adultos jóvenes (31 semanas) exhibieron una cantidad significativa de acumulación extracelular de A β 42 en la corteza como en el hipocampo ($p < 0,00001$), mientras que los ratones control no tenían. Además de la formación de placa amiloide extracelular, se detectó A β 42 intracelular en astrocitos en ratones experimentales pero no en ratones control (*sin valor p*)
- El n° de Microglía activada fue significativamente mayor en el grupo experimental en comparación al GC. ($p < 0,01$)
- Hubo un número significativamente mayor de astrocitos en las regiones CA1 y DG del hipocampo de ratones experimentales en comparación con los controles. Además, hubo astrocitos en asociación con A β 42 en el grupo experimental ($p < 0,0001$)

Autores: Zhang, J., & cols (24) (Exp. Anim.)

Outcome 1 “Efectos de Pg-LPS sobre la función cognitiva en ratones”:

- PCA: No hubo diferencias significativas en el comportamiento entre los grupos.
- LAM: tuvo una latencia de escape > al GC en los días 3, 4 y 5 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$),

Continuación Tabla 3. Outcomes y resultados de los estudios primarios incluidos en la RSL

además redujo significativamente el n° de cruces, recorrió < distancia y pasó < tiempo en el cuadrante objetivo (p<0.001). Ambos efectos fueron prevenidos significativamente por TAK-242 (p <0.01).

- PEP: mostró > tiempo de error para ingresar al compartimento oscuro (p<0,001), evitado significativamente por TAK-242 (p <0.001).

Outcome 2 "Efecto de Pg-LPS en las vías de señalización en tejido cerebral de ratones" : Aumentó la expresión de ARNm de TLR4 y CD14 (p <0,001), TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (p <0.01) y de las proteínas de TLR4, CD14, IRAK1 y p-p65/p65 (p <0.01)

Outcome 3 "Activación de microglía y astrocitos con Pg-LPS v/s GC":

- Se observó microglía activada en el hipocampo y la corteza del grupo Pg-LPS y Ec-LPS, rara vez se observa en GC
- En comparación a GC, el grupo Pg-LPS y Ec-LPS tuvieron > n° de astrocitos activados en el hipocampo y corteza (p <0,001) atenuado por TAK-242 (p<0,001)

Autores: Ding, Y., & Cols. (25) (Exp. Anim.)

Outcome 1 "Alteración en Test de aprendizaje espacial y memoria en ratones Pg v/s GC": LAM: La latencia de escape en los ratones Pg de mediana edad no se redujo significativamente en los 4 días sucesivos, siendo estadísticamente diferentes al GC. Y no se afectó significativamente la competencia cognitiva en ratones jóvenes.

Outcome 2 "Expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en cerebros de ratones Pg v/s GC" No se afectó significativamente la expresión de citoquinas pro inflamatorias en ratones jóvenes, pero se elevaron los niveles de las tres citocinas proinflamatorias (tanto ARNm como proteínas) en ratones de mediana edad (p <0.01)

Autores: Laugisch, O., & cols. (26) (Obs. hum.)

Outcome 1 "Determinar presencia de bacterias en el LCR o suero": No se detectó Pg, Tf ni Treponema en suero o LCR.

Outcome 2 "Niveles de anticuerpos periodontales en LCR o suero": No hubo diferencias significativas entre los grupos en el LCR y los niveles séricos de IgG contra Pg, Aa y Td/ Ts

Outcome 3 "Asociación de anticuerpos periodontales y biomarcadores demenciales": Existe asociación entre el nivel de T-tau en LCR del grupo EA con los niveles séricos de PgIgG y MCP-1 / CCL-2 (p = 0.002).

Autores: Hayashi, K & cols. (27) (Exp. Anim.)

Outcome 1 "Efecto de la exposición cerebral aguda a Pg-LPS": No indujo resultados positivos con respecto a la función cognitiva, condición física y peso de órganos.

Outcome 2 "Efecto de la exposición cerebral crónica a Pg-LPS a nivel cerebral":

- Hubo diferencias E.S en las pruebas de aprendizaje y ubicación espacial, los puntajes de la prueba de construcción de nidos en ratones de mediana edad fueron E.S menores que en ratones jóvenes control (p <0.05)
- Infiltración de células positivas Iba-1 y CD3 en el área periventricular aumentó con la inyección de Pg-LP en comparación a los controles (p<0,05), pero no aumentó las deposiciones de A β 1-40 y A β 1-42, ni hubo aumentos E.S en la expresión de NF- κ B y COX-2 fosforilados

Outcome 3 "Efecto de la exposición cerebral crónica de Pg-LPS a nivel físico":

- No afectó el valor de la PAS posterior a la cirugía ni cambios en el peso corporal
- Puntuación de síntomas en ratones de mediana edad con Pg-LPS se redujo E.S que en ratones jóvenes con placebo p<0,05
- Atenuó significativamente las fibras de cardiomiocitos, redujo significativamente las fibras musculares y aumentó las células positivas para Iba-1, y la fibrosis en ratones de mediana edad en comparación con las de ratones jóvenes con placebo p<0,05

Continuación Tabla 3. Outcomes y resultados de los estudios primarios incluidos en la RSL

Autores: Díaz, J., & cols. (28) (Exp. In vitro)

Outcome 1 “Expresión de citoquinas y receptores tipo Toll en células microgliales”:

- En las células expuestas al serotipo a de *Aa*, se detectó un incremento significativo en los niveles de expresión de IL-4 (p<0,0001) e IL-10 (p <0,0001) en comparación al GC y a las células tratadas con el serotipo b o c de *Aa*.
- Se aumentaron los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β , (p <0,0001), IL-6 (p = 0.002), IL-17 (p <0,0001) y TNF- α (p <0,0001), además de diferencias significativa en los niveles de ARNm de TLR2, en células tratadas con serotipo b de *Aa*, en comparación con el GC y con aquellos tratados con serotipo a y c de *Aa*.
- Se detectó un nivel de expresión más alto para el ARNm de TLR4 cuando las células se expusieron a todos los serotipos de *Aa*LPS, en comparación con el GC.
- Se detectaron niveles de expresión más altos de ARNm de TLR2 en microglia tratada con LPS del serotipo a o b de *Aa* en comparación con el GC.

Outcome 2 “Expresión de TLR 2 y citoquinas en cultivos mixtos del hipocampo”:

- Se detectó un incremento en los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β (acompañado de niveles mayores), IL-6, IL-17, TNF- α , TLR2 y TLR4 en células tratadas con serotipo b de *Aa* en comparación con el GC y aquellos tratados con el serotipo a o c de *Aa*.
- No se detectaron diferencias para los niveles de expresión de TLR2 o TLR4 cuando las células se trataron con el serotipo c de *Aa* en comparación con el GC o con las células tratadas con LPS del serotipo a de *Aa*.
- Los niveles de A β 1-42 mostraron un aumento leve pero significativo en los sobrenadantes obtenidos de cultivos primarios mixtos de hipocampo tratados con LPS de diferentes serotipos de *Aa*, con un efecto estadísticamente significativo en las células expuestas al serotipo b LPS (p <0,0001)

Outcome 3 “Cambios morfológicos en microglía y cultivos mixtos”: Después de la exposición a LPS de los serotipos a, b y c de *Aa*, la inmunotinción de los astrocitos y microglía de los cultivos mixtos del hipocampo no reveló una diferencia significativa en el n $^{\circ}$, ni en la morfología; pero sí se detectaron cambios morfológicos caracterizados por la reducción y desaparición de las dendritas en neuronas tratadas con *Aa*LPS serotipo b, en comparación con serotipos a, c o el GC.

Outcome 4 “Viabilidad celular en cultivos mixtos del hipocampo en exposición a *Aa*-LPS”: Los tratamientos con LPS no indujeron la pérdida de células ni cambios en la viabilidad celular del hipocampo, al menos en las condiciones experimentales empleadas.

<: Menor, >: Mayor, *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, **ADAM10**: desintegrina y metaloproteína 10, **ADAS-cog**: Escala de Evaluación de la EA, **ADN**: Ácido desoxirribonucleico, **An**: *Actinomyces naeslundii*, **ApoE**: Alipoproteína E, **APP**: proteína precursora amiloide, **ARNm**: ácido ribonucleico mensajero, **AB**: amiloide beta, **BACE1**: β -secretasa, **CatB**: Catepsina β , **CD-**: tipo de antígeno CD propio del sistema inmune de mamíferos (ej. CD14, CD3), **COX-2**: ciclooxigenasa-2, **Cr**: *Campylobacter rectus*, **DCL**: Deterioro cognitivo leve, **E.S**: Estadísticamente significativa, **EA**: Enfermedad de Alzheimer, **Ec**: *Escherichia coli*, **En**: *Eubacterium nodatum*, **Exp. anim.**: Estudio experimental en animales (ratones), **Exp. In Vitro**: Estudio Experimental *in vitro*, **Fn**: *Fusobacterium nucleatum*, **GC**: Grupo control, **GT**: ganglio trigeminal, **Hrs**: Horas, **Iba-1**: molécula adaptadora de unión al calcio anti-ionizada 1, **IC**: intervalo de confianza, **IgG**: Inmunoglobulina G, **IL-**: Interleuquina, **IRAK1**: *Quinasa asociada al receptor de interleucina 1*, **LAM**: prueba de laberinto de agua de Morris, **LCR**: Líquido céfalo raquídeo, **LPS**: Lipopolisacárido, **mAbs**: Anticuerpos Monoclonales, **MCP-1 / CCL-2**: proteína quimio-atrayente de monocitos 1, **MMSE**: *Mini-Mental State Exam*, **NF- κ B**: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, **n $^{\circ}$** : Número, **Obs. Hum**: Estudio observacional en humanos, **OR**: Odds Ratio, **PAS**: presión arterial diastólica, **PCA**: prueba de campo abierto, **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa, **PEP**: prueba de evitación pasiva, **Pg**: *Porphyromonas gingivalis*, **Pi**: *Prevotella Intermedia*, **sem.**: Semanas, **T-tau**: proteína Tau total, **TAK-242**: inhibidor del receptor Toll-like 4, **Td**: *Treponema denticola*, **Tf**: *Tannerella forsythia*, **TLR2**: receptores tipo toll, **Tma**: *Treponema maltophilum*, **Tme**: *Treponema Medium*, **TNF-a**: Factor de necrosis tumoral -a, **Tp**: *Treponema pectinovorum*, **Ts**: *Treponema socranskii*, **UE**: Unidades de ELISA.

4.5 Estudios excluidos

De los estudios incluidos para la revisión de texto completo se excluyeron finalmente 7 estudios. Estos se encuentran detallados en la Tabla 4.

El estudio de Cockburn, AF., & cols. (29) se excluyó por ser un estudio piloto, ya que presentaba un riesgo de sesgo crítico en el dominio sesgo de confusión, no considerando variables importantes como los factores orales previos de los sujetos en estudios.

El resto de los 6 estudios también fueron excluidos por no encontrar variables interés consideradas en el P.E.C.O del estudio.

Tabla 4. Estudios primarios excluidos en la RSL

Autor	Título	Motivo Exclusión
McLaughlin, R. & cols (31)	<i>Alzheimer's disease may not be a spirochetosis</i>	No cumple con los participantes del estudio, ya que no especifica si las bacterias detectadas fueron o no orales.
Cockburn, A., & Cols. (29)	<i>High throughput DNA sequencing to detect differences in the subgingival plaque microbiome in elderly subjects with and without dementia.</i>	Crítico riesgo de sesgo.
Kuriyama, N., & cols. (32)	<i>Oral Cnm-positive Streptococcus Mutans Expressing Collagen Binding Activity is a Risk Factor for Cerebral Microbleeds and Cognitive Impairment.</i>	No se encuentra el <i>outcome</i> , ya que no relaciona directamente a las bacterias orales con la demencia o EA, sino con hemorragias y estas con deterioro cognitivo.
Cestari, J., & cols. (33)	<i>Oral Infections and Cytokine Levels in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Controls.</i>	No cumple con los criterios PECO (no habla sobre bacterias orales específicas, sino sobre patologías infecciosas, relaciona parámetros clínicos)
Rokad, F., & cols. (30)	<i>Cerebral Oxidative Stress and Microvasculature Defects in TNF-α Expressing Transgenic and Porphyromonas gingivalis-Infected ApoE^{-/-} Mice.</i>	No se encuentra el Outcome de interés para la RSL.

Continuación Tabla 4. Estudios primarios excluidos en la RSL

Autor	Título	Motivo Exclusión
Singh Rao, S., & cols. (34)	<i>Chronic Porphyromonas gingivalis infection accelerates the occurrence of age-related granules in ApoE^{-/-} mice brains</i>	No se encuentra el <i>outcome</i> , ya que no relaciona directamente a las bacterias orales con la demencia o EA, sino con signos de envejecimiento presentes en ratones.
Prvulovic, D., & cols. (35)	<i>Dental health in advanced age and Alzheimer's Disease: A possible link with bacterial toxins entering the brain?</i>	No se encuentra el <i>Outcome</i> del estudio, ya que finalmente relaciona parámetros clínicos de periodontitis con EA.
<p>Cols.: colaboradores, EA: Enfermedad de Alzheimer, PECO: participantes, exposición, comparación, <i>outcomes.</i>, RSL: revisión sistemática de la literatura</p>		

Hoy en día se dispone en la literatura científica de una diversa gama de investigación sobre la relación entre la EA y las bacterias presentes en la cavidad oral. De los 19 estudios experimentales u observacionales incluidos en esta RSL, 17 aprueban esta asociación de variables, sobre la cual discutiremos a continuación.

Se puede llegar a la conclusión apresurada de que los pacientes con EA le dan menor importancia a la higiene y cuidado oral, e incluso puede depender de un tercero a medida que avanza el deterioro cognitivo, es por ello que en los estudios (19, 20, 22) se controla la variable tiempo, mediante el análisis antes y después del diagnóstico de EA, ya que es una de las principales limitaciones en los estudios observacionales transversales (13, 16, 17, 18, 26), puesto que no se logra determinar el inicio de cada variable, la direccionalidad o relación causal entre ambas. Sin embargo, por qué limitar esta asociación en una relación lineal, es decir, puede ser parte de un ciclo donde una mala higiene oral y la acumulación de bacterias potencie el deterioro cognitivo y este a su vez favorezca el acumulo de bacterias. Es en este punto donde tienen mayor importancia los estudios experimentales en animales e *in vitro*, ya que por principios bioéticos no se pueden realizar directamente en humanos.

Se determinó la detección de LPS en muestras de tejido cerebral, asociándolo a una respuesta inflamatoria, caracterizada por microglía activada, este tipo de microglía está presente en grandes cantidades en el tejido del SNC de pacientes con enfermedades neurodegenerativas crónicas como EA y enfermedad de Parkinson (36), estas células son capaces de reconocer bacterias presentes en los tejidos cerebrales (13), expresan el receptor TLR2, una proteína de membrana, que estimulada por A β conduce a la activación de la microglía, generación de moléculas proinflamatorias, la captación de A β (37, 38) contribuyendo a las reacciones proinflamatorias y proamiloidogénicas (39, 40). Además, en condiciones fisiológicas, el LPS ingresa al cerebro de la rata mediante un mecanismo de transporte mediado por lipoproteínas (41). Por lo tanto, la presencia crónica de LPS de

bacterias periodontopatógenas asociadas a la enfermedad periodontal podría representar un factor de riesgo para la función de las células cerebrales. (28)

Los receptores TLR2 y TLR4 están implicados en la patogénesis de la EA, en la cual se han sugerido roles neurodegenerativos para estos receptores (42, 43), observando un alto nivel de ARNm de TLR2 y TLR4 en el cerebro de pacientes y modelos animales con EA (44, 45).

Además, un reciente metaanálisis (46) reveló concentraciones elevadas de biomarcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-18 en pacientes con EA y no en pacientes con DCL, lo que valida que la exposición a patógenos orales presentes en la RSL tiene una asociación factible con la EA.

Asimismo, se conoce que un aumento en la inflamación estimula la producción de APP (47) y aumenta el nivel y actividad de β -secretasa, lo que lleva en una mayor producción de A β 42 (48, 49), consistente con los resultados de los estudios (14, 15, 23). Esta es una proteína de suma importancia, ya que se describe que en la EA se produce debido a que en la membrana neuronal se procesan péptidos de A β de 42 aminoácidos (A β -42) insolubles, en contraposición al péptido fisiológico soluble, de 40 aminoácidos (A β -40). Los monómeros de A β se van agregando en agrupaciones cada vez más complejas hasta formar placas extracelulares de amiloide. Paralelamente, en el interior de las neuronas, una proteína encargada de estabilizar los neurotúbulos, llamadas proteína Tau, es fosforilada de un modo excesivo, con lo que se altera la integridad de los neurotúbulos neuronales y productores unos agregados intraneuronales denominados ovillos neurofibrilares (50), explicando de ese modo los resultados obtenidos en las muestras de tejido cerebral en ratones expuestos a *Pg* en la presente RSL.

Por otro lado, todos los estudios incluidos en esta RSL investigan un grupo reducido de bacterias orales, mientras que la cavidad oral contiene alrededor de 6 mil millones de bacterias, entre 600 y 700 especies diferentes (51). Además, sólo 1 estudio (16) plantea una vía de ingreso al sistema nervioso central, por lo que mediante esta RSL no se puede explicar cómo ingresan las bacterias desde la cavidad oral hacia el tejido

cerebro. Además, se debe considerar que se debe presentar una exposición crónica en el tiempo a los factores de riesgo, en el caso de este estudio a la presencia de bacterias orales, para el posible desarrollo de la EA, ya que la amiloidosis tarda más de dos décadas en inducir la tauopatía cortical y la neurodegeneración en humanos (52).

En cuanto a la metodología, se sugiere para futuros estudios considerar la detección de ADN genómico dentro de los tejidos cerebrales para mayor validez, ya que por ejemplo bacterias como *Pg* presentan gingipainas, que están asociadas con la membrana celular externa y las vesículas de membrana (53) por lo que a la detección de anticuerpos, no se podría determinar si es la bacteria completa la cual estaría pasando la barrera hematoencefálica o solo sus productos bacterianos. Además se describe que la EA no se inicia en todas las regiones de la corteza cerebral al mismo tiempo, sino que existe una vulnerabilidad selectiva de ciertas regiones. Se inicia en la corteza del hipocampo y amígdala cerebral, desde donde progresa a la circunvolución parahipocampal y, posteriormente, a otras regiones de la corteza de los lóbulos temporales y frontal y sistema límbico (50), lo que explica la anatomía de las muestras seleccionadas y se debe tomar en cuenta para futuros estudios.

La realización de un meta-análisis para determinar la relación de los estudios incluidos no fue posible debido a la heterogeneidad de las investigaciones, en cuanto a vía de infección, participantes, seguimiento, entre otros.

Finalmente, y a modo de conclusión, el objetivo de esta RSL se llevó a cabo determinando la relación entre patógenos orales bacterianos y EA. Este es un tema controversial y relativamente nuevo en el área de la odontología, pero existe literatura que lo avala y con esta investigación se da la base para continuar en futuros estudios para determinar con claridad qué bacterias afectan en mayor o menor medida a esta patología tan prevalente como la EA.

6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. *The infectious etiology of Alzheimer's disease. Current Neuropharmacology*. 2017;15(7):996-1009.
2. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. 2018. p. 59-70.
3. Tellechea P, Pujol N, Esteve-Belloch P, Echeveste B, García-Eulate MR, Arbizu J, et al. Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿ son la misma entidad? *Neurología*. 2018;33(4):244-53.
4. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurology*. 2011;10(3):241-52.
5. 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. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2019;67(6):1234-9.
6. 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).
7. Arce Paniagua M, Ulloa Carmona M, Pozo Hernández P, Bravo Bown J. Detección de Porphyromonas gingivalis en Pacientes Adultos con Periodontitis Crónica. *International journal of odontostomatology*. 2017;11(1):13-8.
8. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, et al. (2009) *La declaración PRISMA para informar revisiones sistemáticas y metaanálisis de estudios que evalúan las intervenciones de atención médica: explicación y elaboración*. *PLoS Med* 6 (7): e1000100. doi: 10.1371 / journal.pmed.1000100
9. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. *Rayyan--a web and mobile app for systematic reviews*. (Report). *Systematic Reviews*. 2016;5(1).
10. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. *Preferred reporting items for systematic reviews and meta- analyses: The PRISMA statement*. *International Journal of Surgery*. 2010;8(5):336-41.
11. Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0* [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochrane-handbook.org
12. Sterne JAC, Hernán MA, Reeves BC, Savović J, Berkman ND, Viswanathan M, Henry D, Altman DG, Ansari MT, Boutron I, Carpenter JR, Chan AW, Churchill R, Deeks JJ, Hróbjartsson A, Kirkham J, Juni P , Loke YK, Pigott TD, Ramsay CR, Regidor D, Rothstein HR, Sandhu L, Santaguida PL, Schünemann HJ, Shea B, Shrier I, Tugwell P, Turner L, Valentine JC, Waddington H, Waters E, Wells GA, Whiting PF, Higgins JPT. *ROBINS-I: una herramienta para evaluar el riesgo de sesgo en estudios no aleatorios de intervenciones* . *BMJ* 2016; 355; i4919; doi: 10.1136 / bmj.i4919.

13. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean SUhwnnngp. *Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue*. Journal of Alzheimer's disease : JAD 1875-8908. 2013;36(4): 665-77.
14. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Isoda R, et al. *Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice*. Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association. 2013;9(4):P851-P.
15. 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.
16. Riviere GR, Riviere KH, Smith KS. *Molecular and immunological evidence of oral Treponema in the human brain and their association with Alzheimer's disease*. Oral microbiology and immunology. 2002;17(2):113-8.
17. Noble JM, Borrell LN, Papapanou PN, Elkind MSV, Scarmeas N, Wright CB. *Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: Analysis of NHANES-III*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. 2009;80(11): 1206-11.
18. Kamer AR, Craig RG, Pirraglia E, Dasanayake AP, Norman RG, Boylan RJ, et al. *TNF- α and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects*. Journal of Neuroimmunology. 2009;216(1-2): 92-7.
19. Sparks Stein P, Steffen MJ, Smith C, Jicha G, Ebersole JL, Abner E, et al. *Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease*. Alzheimer's and Dementia. 2012;8(3):196-203.
20. Noble JM, Scarmeas N, Celenti RS, Elkind MSV, Wright CB, Schupf N, et al. *Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident alzheimer disease*. PLoS ONE. 2014;9(12).
21. 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*. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2015;43(1):67-80.
22. 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).
23. 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 1932-6203. 2018;13(10):e0204941.

24. Zhang J, Yu C, Zhang X, Chen H, Dong J, Lu W, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. (toll-like receptor 4) (Report). *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(1).
25. 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).
26. Laugisch O, Johnen A, Maldonado A, Ehmke B, Bürgin W, Olsen I, et al. *Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2018;66(1):105-14.
27. Hayashi K, Hasegawa Y, Takemoto Y, Cao C, Takeya H, Komohara Y, et al. *Continuous intracerebroventricular injection of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces systemic organ dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease*. *Experimental gerontology* 1873-6815. 2019;120:1-5.
28. Díaz-Zúñiga J, Muñoz Y, Melgar-Rodríguez S, More J, Bruna B, Lobos P, et al. *Serotype b of Aggregatibacter actinomycetemcomitans triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease?* *Journal of Oral Microbiology*. 2019;11(1).
29. Cockburn AF, Dehlin JM, Ngan T, Crout R, Boskovic G, Denvir J, et al. *High throughput DNA sequencing to detect differences in the subgingival plaque microbiome in elderly subjects with and without dementia*. *Investigative genetics*. 2012;3(1):19.
30. Rokad F, Moseley R, Hardy RS, Chukkapalli S, Crean S, Kesavalu L, et al. *Cerebral Oxidative Stress and Microvasculature Defects in TNF- α Expressing Transgenic and Porphyromonas gingivalis-Infected ApoE^{-/-} Mice*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 1875-8908. 2017;60(2):359-69.
31. McLaughlin R, Ng Ying Kin NMK, Chen MF, Nair NPV, Chan ECS. *Alzheimer's disease may not be a spirochetosis*. *NeuroReport*. 1999;10(7):1489-91.
32. Kuriyama N, Watanabe I, Miyatani F, Nomura R, Naka S, Nakano K, et al. *Oral Cnm-positive Streptococcus Mutans Expressing Collagen Binding Activity is a Risk Factor for Cerebral Microbleeds and Cognitive Impairment*. *Scientific reports*. 2016;6:38561.
33. Cestari JAF, Fabri GMC, Kalil J, Nitrini R, Jacob-Filho W, De Siqueira JTT, et al. *Oral Infections and Cytokine Levels in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Controls*. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;52(4):1479-85.
34. Singhrao SK, Chukkapalli S, Poole S, Velsko I, Crean SJ, Kesavalu LUhwnnngp. *Chronic Porphyromonas gingivalis infection accelerates the occurrence of age-related granules in ApoE^{-/-} mice brains*. *Journal of oral microbiology* 2000-2297. 2017;9(1):1270602.

35. Prvulovic D, Maurer K, Rahming S, *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.
36. Perry, V., Nicoll, J. & Holmes, C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6, 193–201 (2010) doi:10.1038/nrneurol.2010.17
37. K. Chen, P. Iribarren, J. Hu, J. Chen, W. Gong, E.H. Cho, S. Lockett, N.M. Dunlop, J.M. Wang. *Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide.* J. Biol. Chem., 281 (2006), pp. 3651-3659
38. J.J. Jin, H.D. Kim, J.A. Maxwell, L. Li, K. Fukuchi. *Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease* J. Neuroinflammation, 5 (2008), p. 23
39. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J E, et al. *Review: neuroinflammation in Alzheimer's disease.* Lancet Neurol. 2015;14:388–405
40. Skaper SD, Facci L, Zusso M, et al. *An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the Neuron.* Front Cell Neurosci. 2018;12:72.
41. Vargas-Caraveo A, Sayd A, Maus SR, et al. *Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions.* Sci Rep. 2017;7:13113
42. D.L. Herber, L.M. Roth, D. Wilson, N. Wilson, J.E. Mason, D. Morgan, M.N. Gordon. *Time-dependent reduction in Abeta levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice.* Exp. Neurol., 190 (2004), pp. 245-253
43. J.P. Michaud, M. Halle, A. Lampron, P. Theriault, P. Prefontaine, M. Filali, P. Tribout-Jover, A.M. Lantaigne, R. Jodoin, C. Cluff, V. Brichard, R. Palmantier, A. Pilorget, D. Larocque, S. Rivest. *Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110 (2013), pp. 1941-1946
44. K. Chen, P. Iribarren, J. Hu, J. Chen, W. Gong, E.H. Cho, S. Lockett, N.M. Dunlop, J.M. Wang. *Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide.* J. Biol. Chem., 281 (2006), pp. 3651-3659
45. S. Frank, E. Copanaki, G.J. Burbach, U.C. Muller, T. Deller. *Differential regulation of toll-like receptor mRNAs in amyloid plaque-associated brain tissue of aged APP23 transgenic mice.* Neurosci. Lett., 453 (2009), pp. 41-44
46. Su C, Zhao K, Xia H, Xu Y. *Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis.* Psychogeriatrics. 2019;19(4):300-309.

47. Herbst-Robinson KJ, Liu L, James M, Yao Y, Xie SX, Brunden KR. *Inflammatory eicosanoids increase amyloid precursor protein expression via activation of multiple neuronal receptors*. Sci Rep. 2015;5:18286 10.1038/srep18286
48. Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, et al. *Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation*. J Neuroinflammation. 2008;5:37 10.1186/1742-2094-5-37
49. Sastre M, Walter J, Gentleman SM. *Interactions between APP secretases and inflammatory mediators*. J Neuroinflammation. 2008;5:25 10.1186/1742-2094-5-25
50. Menéndez, M., & cols. *Biomarcadores para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer*. Biomedicina, [S.l.], v. 2, mar. 2017. ISSN 2386-6942.
51. Cruz Quintana Sandra Margarita, Díaz Sjöstrom Pedro, Arias Socarrás Dunier, Mazón Baldeón Gloria Marlene. *Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal*. Rev Cubana Estomatol . 2017 ; 54(1): 84-99.
52. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. *Dominantly inherited Alzheimer network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease*. N Engl J Med. 2012;367(9):795–804. 10.1056/NEJMoa1202753
53. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. *Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of Porphyromonas gingivalis: structure, function and assembly of multidomain protein complexes*. Curr Protein Pept Sci. 2003;4:397–407.

7.

ANEXOS

7.1 Formulario para la Extracción de datos

Tabla 5. Formulario Piloto: "Extracción de datos"

EXTRACCIÓN DE DATOS		
Fuente		
ID del estudio: _____	País: _____	
ID del revisor: _____	Contacto: _____	
Citación: _____	Conflicto de Intereses: Sí - No	
Elegibilidad del estudio: Sí - No	Razones de Exclusión: _____	
Participantes		
Edad, Sexo: _____	Nº de Muestra incluida: _____	
Escenario clínico: _____	Nº de Muestra evaluada: _____	
Estado de Salud: _____	Nº de pérdidas de para c/tratamiento: _____	
Criterios de inclusión: _____	Nº de Intervenciones (I+C): _____	
Criterios de exclusión: _____	Nº de pacientes en cada Intervención (I+C): _____	
Parámetros clínicos de interés para la situación clínica: _____		
Métodos		
Diseño de estudio: _____	Tiempo de seguimiento: _____	
Intervenciones y Comparaciones		
Descripción de la intervención y controles (detalles dosis/duración/etc): _____		
Outcomes		
Nombre cada outcome investigado: _____	Descripción de tiempo de determinación: _____	
Definición del outcome: _____	Unidad de medida: _____	
Resultados		
TÍTULO DEL OUTCOME	INTERVENCIÓN O COMPARACIÓN	Resultado final
TÍTULO DEL OUTCOME	INTERVENCIÓN O COMPARACIÓN	Resultado final
Misceláneos		
Fuente de financiamiento		
Conclusiones claves del estudio		
Referencias de otros estudios relevantes		
SI requiere contactar a los autores		
Otros Comentarios		

7.2 Análisis de riesgo de sesgo

Tabla 6. Criterios de determinación del nivel de sesgo de cada estudio

Sesgo debido a confusión	
Riesgo	Razones
B	(i) “No se esperan confusiones”
M	(i) “Confusión esperada, todos los dominios de confusión importantes conocidos adecuadamente medidos y controlados.” y (ii) “La fiabilidad y la validez de la medición de dominios importantes fueron suficientes y no esperamos una confusión residual grave.”
G	(i) “Al menos un dominio importante conocido no se midió adecuadamente, o no se controló” o (ii) “La confiabilidad o validez de la medición de un dominio importante fue lo suficientemente baja como para esperar una confusión residual grave.”
C	(i) “Confusión inherentemente no controlable” o (ii) “El uso de controles negativos sugiere una confusión no medida.”
NI	(i) “No hay información sobre si puede haber confusión”
Sesgo por selección de participantes en el estudio	
Riesgo	Razones
B	(i) “Todos los participantes que hubieran sido elegibles para el ensayo objetivo fueron incluidos en el estudio” y (ii) “Para cada participante, el inicio del seguimiento y el inicio de la intervención coincidieron”
M	(i) “La selección en el estudio puede haber estado relacionada con la intervención y el resultado” y “Los autores utilizaron métodos apropiados para ajustar el sesgo de selección” o (ii) “El inicio del seguimiento y el inicio de la intervención no coinciden para todos los participantes” y (a) “la proporción de participantes para los que este era el caso era demasiado baja para inducir un sesgo importante” o (b) “los autores utilizaron métodos apropiados para ajustar el sesgo de selección” o (c) “los autores de la revisión confían en que la razón del riesgo para el efecto de la intervención se mantiene constante en el tiempo”
G	(i) “La selección en el estudio estaba relacionada (pero no muy fuertemente) con la intervención y el resultado” y “Esto no se pudo ajustar en los análisis” o (ii) “El inicio del seguimiento y el inicio de la intervención no coinciden” y “Falta una cantidad potencialmente importante de tiempo de seguimiento en los análisis” y “La relación de velocidad no es constante en el tiempo”
C	(i) “La selección en el estudio estuvo muy relacionada con la intervención y el resultado” y “Esto no se pudo ajustar en los análisis” o (ii) “Es probable que falte una cantidad considerable de tiempo de seguimiento en los análisis” y “La relación de velocidad no es constante en el tiempo”
NI	No se informa información sobre la selección de participantes en el estudio o si el inicio del seguimiento y el inicio de la intervención coinciden
Sesgo en la clasificación de las intervenciones	
Riesgo	Razones

Continuación Tabla 6. Criterios de determinación del nivel de sesgo de cada estudio

B	(i) “El estado de intervención está bien definido” y (ii) “La definición de intervención se basa únicamente en la información recopilada en el momento de la intervención”
M	(i) “El estado de intervención está bien definido” y (ii) “Algunos aspectos de las asignaciones del estado de intervención se determinaron retrospectivamente”
G	(i) “El estado de intervención está bien definido” y (ii) “Los aspectos principales de las asignaciones del estado de intervención se determinaron de una manera que podría haberse visto afectada por el conocimiento del resultado”
C	“(Inusual) Una cantidad extremadamente alta de clasificación errónea del estado de intervención, p. debido a sesgos de recuerdo inusualmente fuertes”
NI	No se informa ninguna definición de intervención o no se explica la fuente de información sobre el estado de la intervención.
Sesgo debido a las desviaciones de las intervenciones previstas	
Riesgo	Razones
B	Efecto de la asignación a la intervención: (i) “Cualquier desviación de la intervención prevista refleja la práctica habitual” o (ii) “Cualquier desviación de la práctica habitual era poco probable que afectara el resultado” Efecto de comenzar y adherirse a la intervención: (i) “Las cointervenciones importantes se equilibraron entre los grupos de intervención, y no hubo desviaciones de las intervenciones previstas (en términos de implementación o adherencia) que probablemente impactarían en el resultado”
M	Efecto de la asignación a la intervención: (i) “Hubo desviaciones de la práctica habitual, pero se espera que su impacto en el resultado sea leve” Efecto de comenzar y adherirse a la intervención: (i) “Hubo desviaciones de la intervención prevista, pero se espera que su impacto en el resultado sea leve” o (ii) “Las cointervenciones importantes no se equilibraron entre los grupos de intervención, o hubo desviaciones de las intervenciones previstas que probablemente impactarían en el resultado” y “El análisis fue apropiado para estimar el efecto de comenzar y adherirse a la intervención, permitiendo desviaciones que probablemente impactarían en el resultado”
G	Efecto de la asignación a la intervención: (i) “Hubo desviaciones de la práctica habitual que no estaban equilibradas entre los grupos de intervención y que probablemente hayan afectado el resultado” Efecto de comenzar y adherirse a la intervención: (i) “Las cointervenciones importantes no se equilibraron entre los grupos de intervención, o hubo desviaciones de las intervenciones previstas que probablemente impactarían en el resultado” y (ii) “El análisis no fue apropiado para estimar el efecto de comenzar y adherirse a la intervención, permitiendo desviaciones que probablemente impactarían en el resultado”
C	Efecto de la asignación a la intervención: (i) “Hubo desviaciones sustanciales de la práctica habitual que no estaban equilibradas entre los grupos de intervención y que probablemente hayan afectado el resultado” Efecto de comenzar y adherirse a la intervención: (i) “Hubo desequilibrios sustanciales en cointervenciones importantes entre los grupos de intervención, o hubo desviaciones sustanciales de las intervenciones previstas que probablemente impactarían en el resultado” y (ii) “El análisis no fue apropiado para estimar el efecto de comenzar y adherirse a la intervención, permitiendo desviaciones que probablemente impactarían en el resultado.”
NI	“No se informa información sobre si hay una desviación de la intervención prevista”

Continuación Tabla 6. Criterios de determinación del nivel de sesgo de cada estudio

Sesgo debido a datos faltantes	
Riesgo	Razones
B	(i) “Los datos fueron razonablemente completos” o (ii) “Las proporciones y los motivos de los participantes desaparecidos fueron similares en todos los grupos” o (iii) “El análisis abordó los datos faltantes y es probable que se elimine cualquier riesgo de sesgo”
M	(i) “Las proporciones y los motivos de los participantes desaparecidos difieren ligeramente entre los grupos de intervención” y (ii) “Es improbable que el análisis haya eliminado el riesgo de sesgo derivado de los datos faltantes”
G	(i) “Las proporciones de participantes desaparecidos difieren sustancialmente entre las intervenciones” o “Las razones para la falta difieren sustancialmente entre las intervenciones” y (ii) “Es poco probable que el análisis haya eliminado el riesgo de sesgo derivado de los datos faltantes” o “Los datos faltantes se abordaron de manera inapropiada
	en el análisis” o “La naturaleza de los datos faltantes significa que el riesgo de sesgo no puede eliminarse mediante un análisis adecuado”
C	(i) “(Inusual) Hubo diferencias críticas entre las intervenciones en los participantes con datos faltantes” y (ii) “Los datos faltantes no se abordaron o no se pudieron abordar mediante un análisis adecuado”
NI	“No hay información sobre datos faltantes o la posibilidad de que falten datos”
Sesgo en la medición de resultados	
Riesgo	Razones
B	(i) “Los métodos de evaluación de resultados fueron comparables entre los grupos de intervención” y (ii) “Era improbable que la medida de resultado estuviera influenciada por el conocimiento de la intervención recibida por los participantes del estudio o los evaluadores de resultado desconocían la intervención recibida por los participantes del estudio” y (iii) “Cualquier error en la medición del resultado no está relacionado con el estado de la intervención”
M	(i) “Los métodos de evaluación de resultados fueron comparables entre los grupos de intervención” y (ii) “La medida de resultado está influenciada mínimamente por el conocimiento de la intervención recibida por los participantes del estudio” y (iii) “Cualquier error en la medición del resultado está mínimamente relacionado con el estado de la intervención”
G	(i) “Los métodos de evaluación de resultados no fueron comparables entre los grupos de intervención” o (ii) “La medida de resultado fue subjetiva (es decir, vulnerable a la influencia por el conocimiento de la intervención recibida por los participantes del estudio)” y “El resultado fue evaluado por evaluadores conscientes de la intervención recibida por los participantes del estudio” o (iii) “El error en la medición del resultado estuvo relacionado con el estado de la intervención”
C	“Los métodos de evaluación de resultados fueron tan diferentes que no se pueden comparar razonablemente entre los grupos de intervención”
NI	“No se informa información sobre los métodos de evaluación de resultados”
Sesgo en la selección del resultado informado	

Continuación Tabla 6. Criterios de determinación del nivel de sesgo de cada estudio

Riesgo	Razones
B	"Existe evidencia clara (generalmente mediante el examen de un protocolo pre-registrado o plan de análisis estadístico) de que todos los resultados informados corresponden a todos los resultados, análisis y subcohortes previstos"
M	(i) "Las mediciones y análisis de resultados son consistentes con un plan a priori; o están claramente definidos y son consistentes interna y externamente" y (ii) "No hay indicación de selección del análisis reportado entre múltiples análisis" y (iii) "No hay indicación de selección de la cohorte o subgrupos para el análisis y la presentación de informes sobre la base de los resultados"
G	(i) "Los resultados se definen de diferentes maneras en las secciones de métodos y resultados, o en diferentes publicaciones del estudio" o (ii) "Existe un alto riesgo de informes selectivos entre múltiples análisis" o (iii) "La cohorte o subgrupo se selecciona de un estudio más amplio para su análisis y parece informarse sobre la base de los resultados"
C	(i) "Existe evidencia o fuerte sospecha de notificación selectiva de resultados" y (ii) "Es probable que los resultados no informados sean sustancialmente diferentes de los resultados informados"
NI	"Hay muy poca información para emitir un juicio (por ejemplo, si solo hay un resumen disponible para el estudio)"
B: Bajo riesgo, M: Moderado riesgo, G: Grave sesgo, C: crítico sesgo, NI: No hay información	

Tabla 7. Formulario piloto para la definición del riesgo de sesgo de cada estudio

Tipo de Sesgo	Nivel	Justificación
Sesgo de confusión		
Sesgo de selección de participantes		
Sesgo en la clasificación de intervenciones		
Sesgo por desviación de las intervenciones previstas		
Sesgo por datos faltantes		
Sesgo en la medición de resultados		
Sesgo en la selección del resultado informado		

7.3 Metodología estudios incluidos

Tabla 8. Metodología de los estudios incluidos en la RSL

Autores: Riviere, G., & cols. (16)

Objetivo: Determinar si *Bb* o cualquiera de las 7 especies de *Treponema* oral podían detectarse en el cerebro humano de donantes que tenían EA y donantes que no tenían EA.

Metodología: La muestra correspondía a: corteza del lóbulo frontal (16 EA, 18 GC), ganglio trigémino congelado (3 EA y 2GC) y Saliva no estimulada de pacientes vivos (17 EA y 16 GC). Se purificó el ADN presente en las muestras, se amplificó por PCR y se realizó el procesamiento de la secuencia del ADN para detectar las bacterias *Bb*, *Ta*, *Td*, *Tma*, *Tme*, *Tp*, *Ts*, *Tv*. Fueron expuestos a anticuerpos monoclonales (mAbs) para realizar la detección molecular del ADN de *Ts* y *Tp*. Se verificó mediante inmunohistoquímica.

Estadísticos: Prueba U de Mann-Whitney y prueba de chi cuadrado.*

Autores: Noble, J., & cols. (17)

Objetivo: Se investigó si la periodontitis, definida como un marcador serológico, está asociada de forma independiente con el desempeño de las pruebas cognitivas en adultos mayores en una muestra representativa de EE.UU.

Metodología: Para evaluar las relaciones entre la exposición sistémica a los patógenos periodontales y los resultados de las pruebas cognitivas, se analizaron los datos de la Tercera Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES-III), un estudio observacional transversal representativo a nivel nacional entre adultos mayores. La muestra se clasificó en 4 grupos según el nivel de *Pg*-IgG, medido en Unidades de ELISA (EU): **sano:** ≤ 57 EU (n=186), **periodontitis leve:** 58-65 EU (n=445), **periodontitis moderada:** 66-119 EU (n= 1.274) y **periodontitis severa:** ≥ 120 EU (n=450). La cognición se midió mediante una prueba de memoria verbal lógica inmediata y retrasada de la "Prueba de memoria de East Boston", una tarea de registro/memoria de 3 palabras ("manzana", "mesa" y "centavo") y 5 restas en serie por intervalos de tres. Un puntaje $< 4/9$ puntos en total (0-6 puntos de memoria de párrafo/historia, 0-3 puntos de recuerdo de 3 palabras) se consideró deteriorado para la memoria retrasada. Para la memoria inmediata se consideró un puntaje $< 5/9$ puntos en total, tienen deterioro, mientras que en la prueba de sustracciones en serie, cualquier error de cálculo durante los 5 ensayos se consideró deteriorado.

Estadísticos: Prueba T y modelos de regresión logística, ajustado por: a) edad, sexo, educación, b) a + raza, seguro, ingresos, c) a + b + DM, HTA, tabaquismo, ICC, enfermedad de la arteria coronaria, ACV, proteína C reactiva.*

Autores: Kamer, A., & cols (18)

Objetivo: Determinar si la presencia de anticuerpos (IgG) contra bacterias periodontales (*Pf*, *Tf* y *Aa*) está asociada a la EA.

Metodología: La muestra se clasificó como casos (EA n=18) y controles (sin EA, n= 16). El deterioro cognitivo se evaluó mediante MMSE evaluando la atención, orientación, registro y cálculo. Se obtuvo plasma en ayunas de los sujetos, se evaluaron los niveles de IgG contra *Aa* serotipo b, *Tf* y *Pg* mediante ELISA, los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 fueron evaluados por Multiplex-PCR. Cada muestra se analizó por duplicado y el análisis Multiplex se realizó en dos ocasiones separadas. El promedio se utilizó para el análisis.

Estadísticos: Prueba T de Student y U de Mann-Whitney (variables continuas), las pruebas exactas de Chi-cuadrado o de Fischer (variables categóricas) y análisis de regresión logística binaria univariada y multivariada.*

Continuación Tabla 8. Metodología de los estudios incluidos en la RSL

Autores: Spark, P., & cols. (19)

Objetivo: Determinar si los niveles de IgG contra bacterias periodontales se elevarían en el suero de los participantes CI después que se conviertan a DCL o EA en comparación con los sujetos que se mantuvieron CI .

Metodología: La muestra se dividió en participantes CI que se convirtieron a DCL (n=35), participantes CI que se convirtieron a EA (n=46) y el grupo control, participantes CI que se mantuvieron así (n=77). Se analizaron muestras de suero para determinar los niveles de IgG contra *Aa*, *Pg*, *Cr*, *Td*, *Fn*, *Tf* y *Pi*, mediante el test de ELISA al momento basal, antes y después de la conversión a DCL o EA.

Estadísticos: Prueba Kolmogorov-Smirnov, prueba de suma de rangos de Wilcoxon y regresión lineal general, ajustado por: edad basal, MMSE basal, años de educación, género, APOE ϵ 4, diabetes y tabaquismo).* Además se utilizó Bonferroni ($\alpha=0,007$)

Autores: Poole, S., & cols. (13)

Objetivo: Determinar si las principales bacterias de la EP (*Td*, *Tf*, *Pg*) y/o componentes bacterianos están presentes en el tejido cerebral de individuos con y sin demencia.

Metodología:

Estudio Observacional: Las muestras son tejidos de cerebro humano (10 EA y 10 GC no relacionados con la edad) con un intervalo postmortem similar o mayor. Estas se seccionaron y fueron etiquetadas con inmunofluorescencia, a través de anti-*Pg* contra el que el LPS y gingipainas, anti-*Td*, anti-*Tf*.

In vitro: Cultivos de una línea celular de astrocitos (SVGp12) se expone al sobrenadante con *Pg*LPS, estas se inmunomarcaron y se inmunotransfirieron con mAbs anti-*Pg*.

En ambos casos se observó el etiquetado y se capturaron imágenes utilizando el microscopio confocal Zeiss serie 510. Además se lisaron las muestras y fueron analizadas por inmunotransferencia a través de electroforesis.

Estadístico: Prueba de U de Mann-Whitney.*

Autores: Ishida, N & cols. (14)

Objetivo: determinar el efecto de la periodontitis inducida por *Pg* en la fisiopatología de la EA en esos ratones.

Metodología:

Experimental en animales: Se indujo periodontitis con inóculo de *Pg* en el margen gingival. 5 semanas después, se realizó la prueba de objeción (se entrenó a los ratones en una caja con 2 objetos, registrando el comportamiento de búsqueda por 10 min. (enfrentar, tocar u olfatear). Después de 24 hrs, 1 de los objetos se cambió, y los ratones fueron devueltos a la caja, permitiendo buscar por 3 minutos). Se registró el tiempo de búsqueda y se evaluó la duración como el grado de función cognitiva, luego se sacrificaron los ratones para recoger suero y el cerebro, evaluando la deposición de A β mediante inmunotinción, el A β oligomerizado, TNF- α e IL-1 β se determinó mediante el test de ELISA, además mCT de mandíbula para determinar la reabsorción ósea del hueso alveolar mandibular, y estudios histopatológicos.

In Vitro: Los cultivos neuronales primarios se prepararon a partir de las cortezas de embriones de ratón C57BL/6 de 17 días. Las neuronas fueron estimuladas con o sin 0.1 - 1 - 10 μ g / ml de *Pg*-LPS por 24 h. Los niveles de A β 40 y A β 42 se midieron mediante un ELISA. Kit de cultivo de clones de células microglia. Las células se estimularon con A β 42 10 μ M durante 6 h y se estimularon adicionalmente con *Pg*-LPS (0.01, 0.1, 1.0 μ g / ml) por 24 h. Los niveles de TNF- α e IL-1 β se midieron con ELISA

Continuación Tabla 8. Metodología de los estudios incluidos en la RSL

Estadísticos: Prueba t de Student, comparaciones múltiples mediante análisis de varianza unidireccional y el método de Bonferroni o Dunn.*

Autores: Noble, J., & Cols. (20)

Objetivo: Determinar si los niveles premórbidos de IgG en suero contra microbiota periodontal seleccionada tiene una posible asociación con el riesgo de AD incidente.

Metodología: La muestra se divide en 110 casos de EA y 109 controles sin deterioro cognitivo. Los niveles séricos de anticuerpos IgG contra las bacterias periodontales *Pg*, *Tf*, *Aa*, *Cr*, *En* y *An* se determinaron mediante inmunotransferencia, se clasificaron los niveles umbral de anticuerpos descritos en NHANES-III para correlacionarlos con la periodontitis clínica.

Estadísticos: Pruebas t, chi-cuadrado y modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariantes ajustados por: edad de inscripción, sexo, educación, HTA, DM, hiperlipidemia, accidente cerebrovascular historial, enfermedad cardíaca, abuso de tabaco y estado de portador APOE e4.*

Autores: Poole, S., & cols. (21)

Objetivo: Determinar la posibilidad de que patógenos orales alteren el funcionamiento normal del cerebro en animales de experimentación.

Metodología: Los ratones ApoE - / - se infectaron vía oral (n = 12) con *Pg*, *Td*, *Tf* y *Fn* como infecciones mono y polimicrobianas, estos se sacrificaron a las de 12 y 24 semanas post infección. Se aisló el ADN genómico bacteriano de todos los tejidos cerebrales, excepto el grupo mono infectado con *Fn*. El PCR se realizó usando cebadores de ADNr de 16 s universales y conjuntos de cebadores específicos de especie para cada organismo para determinar si los patógenos infectantes accedieron al cerebro. Las respuestas inmunes innatas se detectaron usando anticuerpos contra los productos de activación del complemento de la etapa de convertasa C3 y el complejo de ataque de membrana.

Estadísticos: Prueba de U de Mann-Whitney.*

Autores: Ide, M., & cols. (22)

Objetivo: determinar si la periodontitis (medida como PgIgG) aumentaría con el aumento de la gravedad de la demencia en la EA.

Metodología: La muestra fue clasificada según sujetos con periodontitis (n=20), que a los 6 meses de seguimiento 15/20 sujetos seguían con periodontitis y sujetos sin periodontitis (n=32) que a los 6 meses de seguimiento 30/32 sujetos seguían sin ella.

Los participantes fueron evaluados cognitivamente utilizando la ADAS-cog como el resultado cognitivo primario y MMSE como resultado cognitivo secundario. Inmediatamente después de la evaluación cognitiva al inicio del estudio, fue tomada una muestra de sangre venosa y se analizó: CRP, TNF, IL-10 e IgG anti-Pg, mediante ELISA. La salud dental fue evaluada por un higienista dental, ciego a los resultados cognitivos. Todas las evaluaciones se repitieron a los seis meses.

Estadísticos: Prueba t de Student, U de Mann-Whitney, Chi cuadrado, y las comparaciones se realizaron mediante un modelo de regresión lineal ajustado por edad, puntuación cognitiva basal (ADAS-COG o sMMSE).*

Autores: Wu, Z., & Cols. (15)

Objetivo: determinar si CatB se activa después de la exposición sistémica a bacterias periodontales (o sus componentes) e inicia la patogénesis de la EA.

Continuación Tabla 8. Metodología de los estudios incluidos en la RSL

<p><u>Metodología:</u></p> <p><u>Experimental en animales:</u> Los ratones adultos (2 meses) y de mediana edad (12 meses) de tipo salvaje (CatB +/-) y de tipo CatB - / -(n = 6 en cada grupo) fueron sometidos a exposición sistémica de <i>Pg</i>LPS diariamente (1mg/kg/día, intraperitoneal) por 5 semanas para imitar la inflamación sistémica crónica inducida por periodontitis. La exposición sistémica a agua destilada desionizada (1mg/ml) diariamente se realizó en el GC. La función de aprendizaje y memoria se evaluó mediante PEP, y la expresión de APP, CatB, TLR2 e IL-1β se analizó en tejidos cerebrales mediante inmunohistoquímica y electrotransferencia.</p> <p><u>In Vitro:</u> Los cultivos de microglía se estimularon con <i>Pg</i>LPS (1 μg/ml) o pretratamiento con inhibidor de CatB, antiinflamatorio e inhibidor de la IκBα, fosforilación de la citoquina IκBα, o anticuerpo TLR2.</p> <p><u>Estadísticos:</u> ANOVA de una o dos vías con una prueba de Tukey post hoc*.</p>
<p>Autores: Ding, Y., & Cols. (25)</p>
<p><u>Objetivo:</u> determinar si la periodontitis puede causar deterioro cognitivo a través de la neuroinflamación dependiente de la edad en el modelo animal de infección por <i>Pg</i>.</p>
<p><u>Metodología:</u> La muestra fue dividida en el GC con 15 ratones jóvenes y 15 de mediana edad asépticos y el grupo intervención con 15 ratones jóvenes y 15 de mediana edad infectados con <i>Pg</i>. Se realizó la prueba de LAM para evaluar el aprendizaje y capacidad de memoria de los ratones a las 6 semanas. Los niveles de expresión de TNF-α, IL-6 e IL-1β en el tejido cerebral se determinaron mediante qRT-PCR, ELISA e inmunohistoquímica.</p> <p><u>Estadísticos:</u> ANOVA y prueba <i>t</i> de Student*.</p>
<p>Autores: Laugischa, O., & cols. (26)</p>
<p><u>Objetivo:</u> Determina la asociación de una infección intraoral con <i>Pg</i>, <i>Aa</i> y <i>Treponema sp.</i> con el desarrollo de la EA. Verificar la presencia de patógenos periodontales y la generación intratecal de anticuerpos específicos.</p> <p><u>Metodología:</u> La muestra contemplo 20 pacientes EA y 20 pacientes del grupo control con otros tipos de demencia (DEM-noEA). Se registraron índices clínicos periodontales. La biopelícula subgingival obtuvo insertando puntos de papel en los sitios más profundos por cuadrante durante 30 segundos, también se obtuvo líquido crevicular gingival. El LCR se analizó para la proteína T-tau y amiloide-(A1-42). En suero y LCR, se cuantificaron los niveles de anticuerpos contra <i>Pg</i>, <i>Aa</i>, y <i>Treponema (Td/ Ts)</i>. La presencia de las bacterias mencionadas y biomarcadores inflamatorios se determinaron en el periodonto, suero y LCR.</p> <p><u>Estadísticos:</u> Prueba U de Mann Whitney , modelo de regresión lineal y regresión logística.*</p>
<p>Autores: Zhang, J., & cols. (24)</p>

Continuación Tabla 8. Metodología de los estudios incluidos en la RSL

Objetivo: Observar los efectos de *Pg*-LPS sobre la función cognitiva en ratones.

Metodología: Los ratones C57BL/6 fueron inyectados con *Pg*LPS (5 mg/kg-1) con o sin TAK-242 (5 mg kg-1), n=12, para cada grupo, además se designaron 3 grupos adicionales (n=12 cada uno), infectado con *Ec*LPS, solo con TAK y el GC. Después de 7 días, se evaluaron las alteraciones del comportamiento mediante PCA, LAM y PEP. La activación de astrocitos y microglia en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones se observó por inmunohistoquímica. La expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, TLR2, TLR3, TLR4 y CD14 y la activación de la vía de señalización de NF- κ B (IRAK1, p65 y p-p65) en la corteza cerebral de los ratones fueron evaluados por RT-PCR, ELISA y electrotransferencia.

Estadísticos: ANOVA, ANOVA unidireccional y la prueba *t* de Student. Prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey.*

Autores: Ilievski, V. & cols. (23)

Objetivo: Determinar si la exposición crónica repetida de un patógeno periodontal puede dar lugar a neuropatología, incluida la producción extracelular de A β ₄₂ y enredos neurofibrilares, que son características de la EA en humanos.

Metodología: Se indujo periodontitis crónica experimental en 10 ratones C57BL / 6 de tipo salvaje de 8 semanas de edad por aplicación oral repetida de *Pg*/gingipain por 22 semanas los lunes, miércoles y viernes (grupo experimental). Otros 10 ratones de iguales características recibieron solución salina (placebo, grupo de control) por las 22 semanas. Ambos grupos se mantuvieron en una habitación separada para evitar la contaminación cruzada. A la semana 23 se recogieron tejidos cerebrales y se determinó la presencia de *Pg*/gingipaina, microgliosis y astrogliosis mediante microscopía de inmunofluorescencia, microscopía confocal y qPCR. Se examinaron los hipocampos en busca de signos de neuropatología relacionados con EA: expresión de TNF α , IL1 β e IL6, neurodegeneración (tinción de NeuN y Fluoro Jade C), A β - 1 42, producción y fosforilación de la proteína tau en Ser396, expresión génica de APP, BACE1, proteína que contiene el dominio desintegrina y metaloproteinas10 (ADAM10) para la α -secretasa y PSEN1 para la γ -secretasa, y NeuN se determinaron por RT-qPCR.

Estadísticos: Prueba U de Mann-Whitney*.

Autores: Díaz, J., & cols. (25)

Objetivo: Determinar si las células cerebrales reconocen la variabilidad en la conformación de LPS de los serotipos *Aa*.

Metodología: Se cuantificó en los cultivos celulares la expresión de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α y los receptores de ARNm TLR2 y TLR4 mediante PCR, se midieron los niveles de secreción de las citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α Y A β 1-42 con ELISA y un espectrofotómetro. Además se analizaron los efectos sobre la morfología celular de la respuesta inmune inducida por los diferentes serotipos de *Aa* en cultivos celulares, mediante inmunofluorescencia, utilizando los marcadores MAP2 específicamente para las neuronas, los astrocitos con el marcador proteína ácida anti-glial y la microglia con Iba1. Finalmente se realizó el Ensayo de viabilidad celular después de la estimulación con LPS de serotipo b durante 48 h. Las neuronas vivas se identificaron por fluorescencia verde de calceína y las neuronas muertas se identificaron por fluorescencia roja de etidio unido a ADN. Las células se examinaron y se contaron con un Nikon® Eclipse Ti-E con un aumento de 20X. Se tomaron imágenes de al menos 3 campos aleatorios por pozo de cultivo

Estadísticos: prueba de Shapiro-Wilk, prueba *t*, ANOVA-Tukey o Kruskal Wallis-Dunn*.

Autores: Hayashi, K & cols. (27)

Continuación Tabla 8. Metodología de los estudios incluidos en la RSL

Objetivo: determinar si la exposición cerebral de Pg-LPS indujo la disfunción orgánica sistémica en un modelo de ratón AD.

Metodología: Grupo 1 (n=40): inyección ICV única de Pg-LPS v/s placebo (solución salina). Grupo 2 (n=40): inyección continua ICV de Pg-LPS en solución salina v/s placebo, ambos en ratones 5XFAD de 6 y 13 meses. Grupo 3 (n=12), igual al grupo 2, con ratones 5XFAD de 6 meses.

Se realizaron las siguientes pruebas post-cirugías: Prueba del laberinto en Y a los 4 y 13 días (memoria de trabajo espacial), prueba de Rotarod a los 15 y 27 días (coordinación sensorio-motora y fuerza motora), prueba de construcción del nido a los 20 días, LAM a los 21-25 días (aprendizaje espacial y la función de la memoria). A los 28 días después de la cirugía, se realizaron evaluaciones histológicas y de inmunohistoquímica mediante electrotransferencia de: el cerebro, los músculos gastrocnemio y sóleo, los ventrículos cardíacos izquierdo y derecho, y las grasas subcutáneas y viscerales.

Estadísticos: prueba de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc Steel-Dwass, ANOVA de 2 vías y prueba de comparación múltiple de Tukey post hoc, ANOVA unidireccional y prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey.*

<: Menor, >: Mayor, *: significativo $a < 0,05$, **Aa**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ACV: accidente cerebro vascular, **ADAM10**: metaloproteinasa10, **ADAS-cog**: Escala de Evaluación de la EA, **ADN**: Ácido desoxirribonucleico, **ADNr**: Ácido desoxirribonucleico ribosomal, **An**: *Actinomyces naeslundii*, **ApoE**: Alipoproteína E, **APP**: proteína precursora amiloide, **ARNm**: ácido ribonucleico mensajero, **AB**: amiloide beta, **BACE1**: β -secretasa, **Bb**: *Borrelia burgdorferi*, **CatB**: Cathepsina β , **CI**: cognitivamente intactos, **Cols.**: colaboradores, **CPR**: proteína C reactiva, **Cr**: *Campylobacter rectus*, **DCL**: Deterioro cognitivo leve, **DEM-noEA**: Demencia del tipo NO enf. De Alzheimer, **DM**: Diabetes Mellitus, **EA**: Enfermedad de Alzheimer, **Ec**: *Escherichia coli*, **ELISA**: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, **En**: *Eubacterium nodatum*, **EP**: enfermedad periodontal, **FISH**: hibridación fluorescente *in situ*, **Fn**: *Fusobacterium nucleatum*, **GC**: Grupo control, **Hrs**: Horas, **HTA**: Hipertensión arterial, **Iba-1**: molécula adaptadora de unión al calcio anti-ionizada 1, **ICC**: insuficiencia cardíaca congestiva, **ICV**: intracerebroventricular, **IgG**: Inmunoglobulina G, **IL-**: Interleuquina, **IRAK1**: , **LAM**: prueba de laberinto de agua de Morris, **LCR**: Líquido céfalo raquídeo, **LPS**: Lipopolisacárido, **mAbs**: Anticuerpos Monoclonales, **MAP2**: anti-proteína asociada a microtubos, **mCT**: mini tomografía computarizada, **min.**: minutos, **MMSE**: *Mini-Mental State Exam*, **n**: tamaño muestral, **NeunN**: neuronas intactas, **NHANES-III**: *National Health and Nutrition Examination Survey III*, **NF- κ B**: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, **PAS**: ácido peryodico de schiff, **PCA**: prueba de campo abierto, **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa, **PEP**: prueba de evitación pasiva, **Pg**: *Porphyromonas gingivalis*, **Pi**: *Prevotella Intermedia*, **PSEN**: presenilin, **qRT-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, **Ta**: *Treponema amylovorum*, **T-tau**: proteína Tau total, **TAK-242**: inhibidor del receptor Toll-like 4, **Td**: *Treponema denticola*, **Tf**: *Tannerella forsythia*, **TLR**: receptores tipo toll, **Tma**: *Treponema maltophilum*, **Tme**: *Treponema Medium*, **TNF- α** : Factor de necrosis tumoral - α , **Tp**: *Treponema pectinovorum*, **Ts**: *Treponema socranskii*, **Tv**: *Treponema vincentii*, **UE**: Unidades de ELISA.