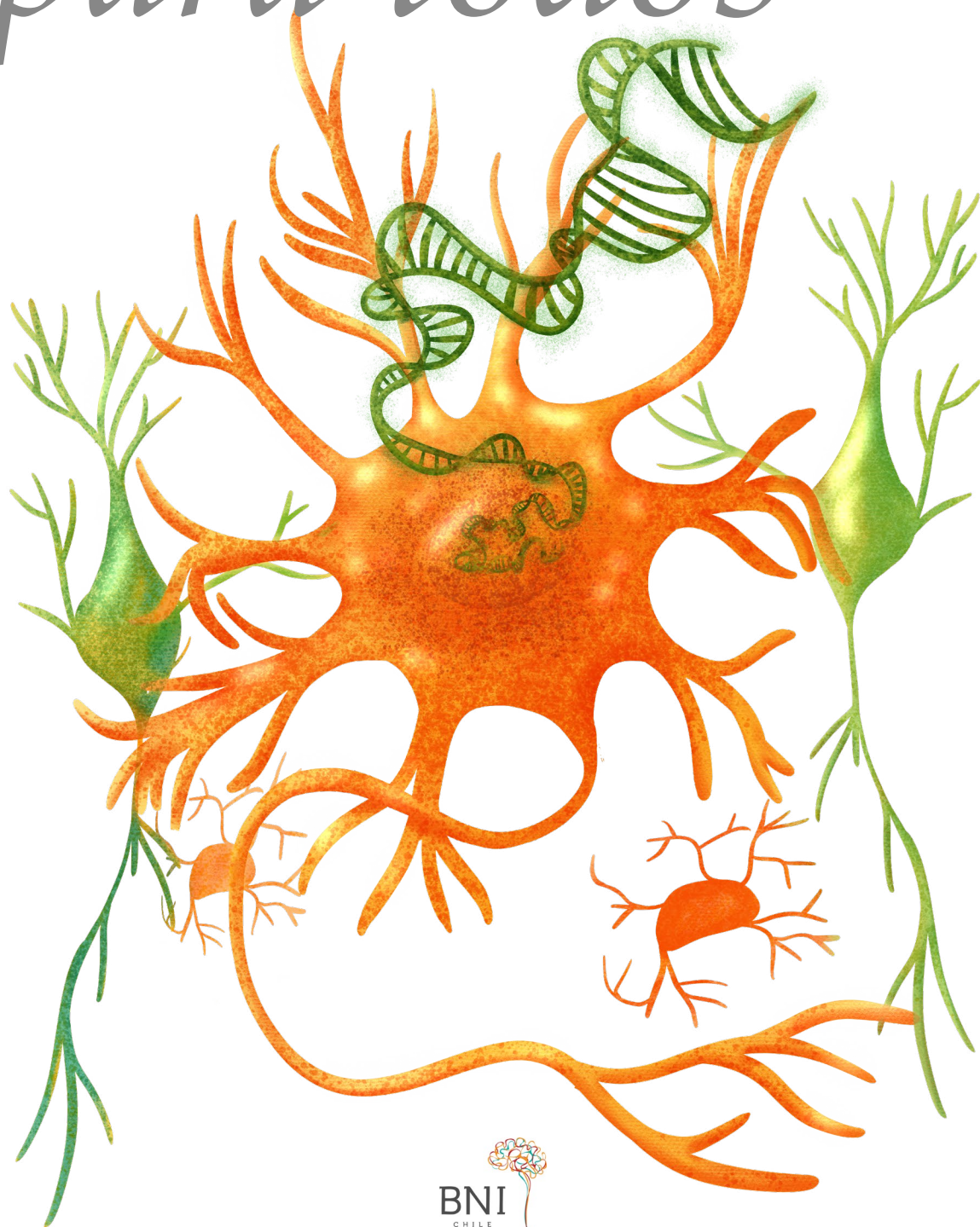




pappers

para todos



BNI
CHILE



Papers para todos

Primera edición, Noviembre, 2021

Instituto de Neurociencia Biomédica (BNI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Independencia 1027, Santiago, Chile

Dirección editorial y corrección de textos: Felipe G. Serrano
Diagramación, ilustraciones y diseño de portada: Felipe G. Serrano

Agradecimientos

Esta revista fue financiada por la Iniciativa Científica Milenio a través de su concurso Proyección al Medio Externo 2020, adjudicado al Instituto de Neurociencia Biomédica (ICN09_015).

Impresión: Emotions SpA



Este material puede ser distribuido, copiado y exhibido por terceros si se muestra en los créditos y solo para fines educacionales y de divulgación científica. No se puede obtener ningún beneficio comercial y las obras derivadas tienen que estar bajo los mismos términos de licencia que el trabajo original.



papers *para todos*



Créditos

• Directora del proyecto

Gabriela Martínez Bravo

• Directora de contenidos

Gabriela Martínez Bravo

• Diagramación y Diseño de portada

Felipe Serrano

• Ilustración e Infografías

Felipe Serrano

Equipo del proyecto

• Directora

Gabriela Martínez Bravo

• Edición

María Fernanda Álvarez

Gabriela Martínez Bravo

Yildy Utreras Mendoza

• Revisión de Contenido

Jimena Sierralta

Carolina Cubillos

• Asesoras Pedagógicas

Maria Fernanda Álvarez

Kimberling Correa

Roxana Nahuelcura

Eliana Pino

Constanza Villavicencio

Claudia Salazar.

• Investigadores

Carlos Dankert

Christ Devia

Cristopher Farías

Silvia Gleitze

Hazel Lira

Pedro Lobos

Enrique Lorca

Pedro Maldonado

Gabriela Martínez Bravo

Ignacio Muñoz

Karla Padilla

Andrea Paula-lima

Iván Plaza

Joaquín Reyes

Katherine Sagredo

Ignacio Vega

• Producción y Gestión

Carolina Cubillos

• Audiolibro

Elizabeth Caballería

Manuel Ortíz

Natalia Saez

• Sonidista y músico

Manuel Rivadeneira

• Agradecimientos

Claudio Hetz

Roque Lillo

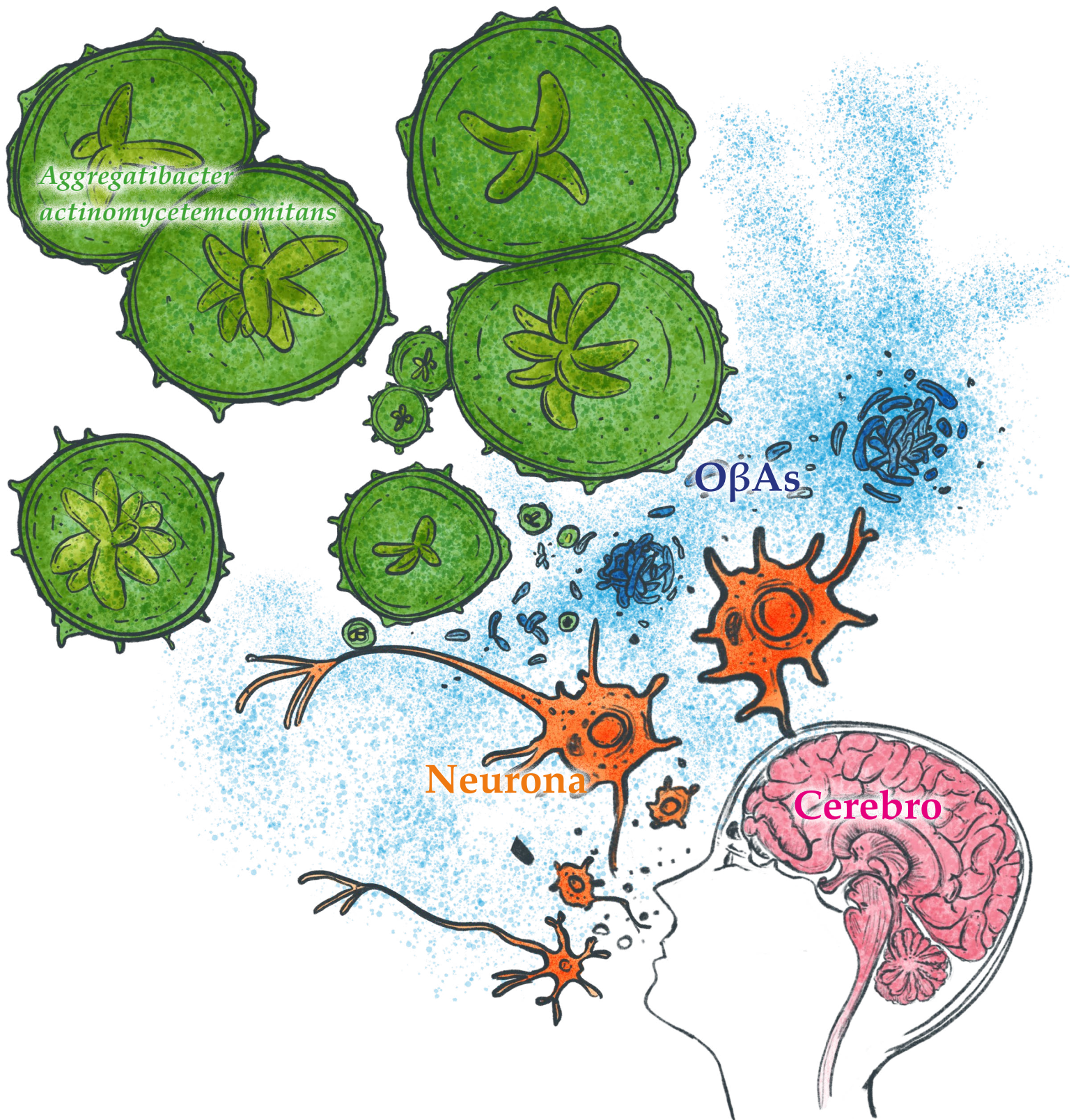
Evelyn Millar

Milangela Mogollón

Rodrigo Tapia Seaman

Ana Timmerman







BACTERIA ORAL PODRÍA PRODUCIR INFLAMACIÓN Y DAÑOS EN EL CEREBRO RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Adaptado por

Farías, C., Dankert, C., Sagredo, K., Lira, H. & Muñoz, I.

Afiliación

Escuela de Pregrado, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Autores

Díaz, J.^{ab}, Muñoz, Y.^c, Melgar, S.^a, Moreb, J.^b, Bruna, B.^b, Lobos, P.^b, Monasterio, G.^a, Vernal, R.^{ad} & Paula-Lima, A.^{be}

Afiliación

^aDepartamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^bInstituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^cLaboratorio de Envejecimiento Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^dUnidad de Odontología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Temuco, Chile

^eInstituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago Chile

Glosario

Anticuerpo: son proteínas producidas por el sistema inmune al detectar sustancias dañinas, llamadas antígenos, que pueden ser microorganismos o químicos.

Patógeno: es aquel agente infeccioso que puede causar una enfermedad en un organismo hospedador.

Neuronas: son células altamente especializadas del sistema nervioso, a nivel estructural se componen de un soma o cuerpo y un axón. A nivel funcional responde a los estímulos al generar un impulso nervioso que se transmite a otra neurona, a un músculo o a una glándula.

1. Introducción

¿Cuántas veces tus padres te recordaron que te lavaras los dientes después de cada comida? ¿Por qué crees que lo hacían? El motivo es porque en nuestra boca habitan numerosas bacterias, la mayoría de estas no nos generan daño, sin embargo existen otras bacterias que nos pueden generar enfermedades, incluso, algunas podrían participar en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). ¿Cómo? te preguntarás, una cosa es olvidar cepillarse los dientes, pero olvidar todos nuestros recuerdos parece algo.... increíble.

Existen diversas enfermedades que pueden generarse dentro de nuestra boca. Entre las enfermedades más conocidas podemos encontrar la gingivitis, en donde la agrupación de bacterias forma una biopelícula conocida como placa bacteriana o “sarro”, provocando la inflamación de las encías ocasionando sangrado al cepillar, o sin razón aparente. Cuando la gingivitis no es tratada, se genera un desequilibrio en las comunidades bacterianas, progresando a Periodontitis o también conocida como Enfermedad Periodontal (EP) (1). En esta enfermedad además de la inflamación, se genera la pérdida del hueso que soporta al diente, pudiendo llegar a la pérdida de las piezas dentales (1). Tanto la gingivitis como la EP son enfermedades odontológicas bastante silenciosas y pueden pasar desapercibidas durante mucho tiempo.

La inflamación observada en la EP se produce debido a toxinas producidas por las bacterias, donde nuestro organismo al encontrarse con esta invasión, responderá activando al sistema inmune a través de diferentes mecanismos, como por ejemplo la producción de **anticuerpos**. Sin embargo, en ocasiones estos microbios pueden viajar por el torrente sanguíneo llegando a otras zonas u órganos del cuerpo, como al cerebro (2).

Algunas de las bacterias **patógenas** que pueden causar estas enfermedades son la ***Porphyromonas gingivalis*** (Pg) y la ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*** (Aa). Las bacterias Aa no son todas iguales, por lo que han sido clasificadas en subtipos o también llamados serotipos, siendo los más frecuentes en humanos el subtipo a que mayormente está presente en encías saludables, y los subtipos b y c que se asocian a personas con periodontitis agresiva (3-6) .

Pero volvamos a la pregunta inicial, ¿cómo participan las bacterias en el desarrollo de la EA? Todo empezó cuando un grupo de investigadores detectó en pacientes mayores de 60 años diagnosticados con la EA, una mayor cantidad de anticuerpos contra la bacteria Pg. Este hallazgo iba acompañado de un pobre rendimiento cognitivo en comparación a personas sanas (7). Similares resultados fueron obtenidos en el cerebro de ratas, donde se evidenció la presencia de Pg acompañado de un deterioro en la



memoria y un aumento en la inflamación de las células cerebrales de estos animales (8).

Entonces, para comenzar a entender cómo se relaciona la EP con la EA, debemos saber qué células hay en el cerebro. En el cerebro existen diferentes tipos celulares, como *neuronas*, *astrocitos* y *microglías*. Específicamente, las microglías participan en la defensa del tejido cerebral, a través de un proceso llamado *fagocitosis*.

Diferentes tipos de daños o microorganismos invasores generan un estado de inflamación crónica en el cerebro, promoviendo el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (9) ¿Cómo sucede esto? Cuando las microglías reciben estos estímulos, responderán especializándose y modificando su función en 2 tipos: M1 o M2(10). La microglía tipo M1, aumenta la liberación de moléculas proinflamatorias que permitirán combatir una infección. Por otro lado, la microglía tipo M2, ocurre el proceso contrario, produce moléculas antiinflamatorias que ayudan a revertir el daño y cicatrizar el tejido (10).

Sin embargo, si prevalece por tiempos largos la presencia de microglía de tipo M1 (por ejemplo una infección crónica) y la de tipo M2 no puede neutralizar a las moléculas inflamatorias, las células del cerebro están inflamadas permanentemente, lo que podría generar más

daño cerebral (10). Este proceso induce un estrés en el cerebro (menor nivel de glucosa y oxígeno), lo que afecta el funcionamiento de las neuronas que puede inducir su muerte. Cuando en nuestro cerebro ocurren estos episodios de inflamación, se genera un ambiente ideal que desencadena la producción y acumulación de *OβAs*, relacionado con la EA (11-13).

Las investigaciones previas indican que las EP están relacionadas con la EA (7, 14), mostrando una asociación entre los anticuerpos producidos contra la bacteria Pg presente en la boca. Sin embargo, no hay reportes de una posible relación de la bacteria Aa con esta enfermedad neurodegenerativa, a pesar de su conocido papel en formas agresivas de periodontitis.

Debido a esto en este trabajo proponemos que “Los serotipos de la bacteria Aa relacionados a la periodontitis agresiva, es decir los serotipos b y c, generan una respuesta inflamatoria en las células cerebrales (por activación de las microglías tipo M1), causando daños neuronales similares a los observados en la EA”.

2. Métodos

¿De qué manera podemos observar cómo actúan los diferentes tipos de bacterias Aa en las células cerebrales?

Para responder esta pregunta trabajamos con cultivos celulares, que corresponden a un proceso de obtención de células a

Glosario

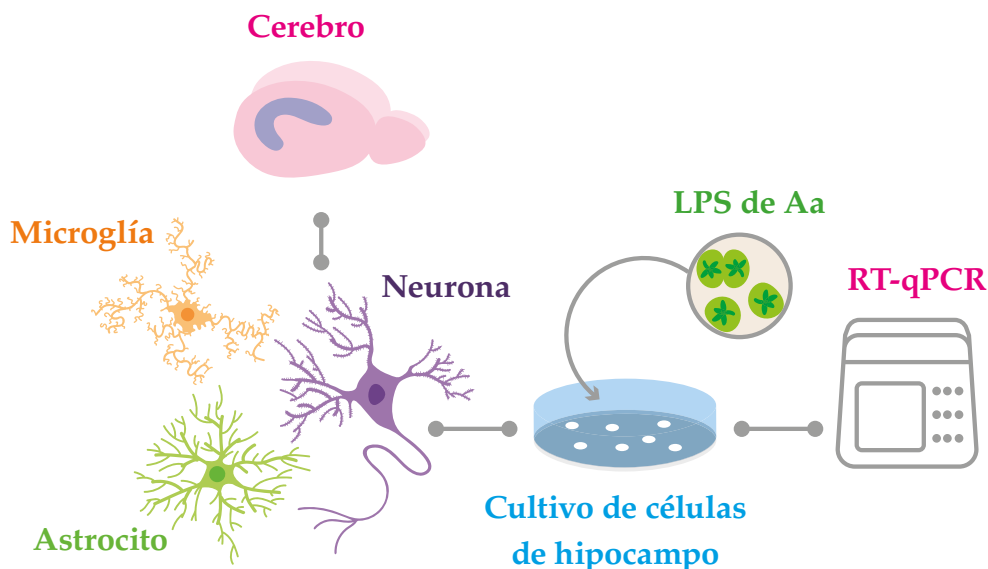
***Microglía:** un tipo de célula glial que se encuentra en el sistema nervioso que actúa como célula inmune y poseen la capacidad de realizar fagocitosis.*

***Astrocitos:** es una célula glial del sistema nervioso que mayoritariamente poseen forma de estrella. Se ha definido que los astrocitos son necesarios para la comunicación entre neuronas, como también para el suministro de los metabolitos que las neuronas necesitan para funcionar.*

***Fagocitosis:** es el proceso donde células especializadas absorben o endocitan agentes patógenos o células muertas.*

Diseño experimental

Se adicionó lipopolisacárido (LPS) de los distintos serotipos de la bacteria Aa, a cultivos de células de hipocampo enriquecidas en neuronas, astrocitos y microglías. Posteriormente, se evaluó los niveles de ARN mensajero de moléculas anti y pro-inflamatorias a través de la técnica de RT-qPCR



Glosario

OβAs: es un péptido de 36 a 42 aminoácidos que se sintetiza a partir de la proteína precursora del amiloide. Se relaciona con la Enfermedad de Alzheimer ya que compone las placas amiloides.

Lipopolisacárido (LPS): es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

partir de un tejido específico para ser cultivadas y manipuladas en condiciones controladas. Los cultivos celulares son mantenidos dentro de una cámara que posee la temperatura adecuada para su crecimiento, y se cultivan en placas tipo petri con un medio líquido que contiene todos los nutrientes necesarios para su supervivencia. En el área de la biología celular son ampliamente utilizados para simular el impacto que podrían tener ciertos tratamientos, en este caso los distintos serotipos de bacteria Aa. En este estudio, se obtuvieron células y de hipocampo, enriquecidos en neuronas, astrocitos y microglías de ratas (15). Al medio líquido del cultivo celular se adicionó una parte de la estructura externa de los diferentes serotipos de la bacteria Aa, llamado **lipopolisacárido (LPS)**

(16). Cabe destacar que en una correcta investigación, los resultados siempre deben ser comparados con una condición control o basal, en este experimento se comparó con una condición control de células cerebrales a las que no se agregó LPS en el cultivo.

¿Cómo podemos saber si existe un aumento en los niveles de una proteína que produce la célula en respuesta a la bacteria Aa?

Las células contienen información en su material genético o ADN. Así, según la información o genes que contenga su ADN, son los tipos de proteínas que expresará. La expresión de un gen tiene 2 etapas, la transcripción, en donde la célula codifica la información del ADN y la convierte en una



hebra de ARN mensajero (ARNm). Luego el código contenido en el ARN mensajero o molde, es traducido para que la célula genere una proteína.

Para evaluar si se genera un aumento en la producción de proteínas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias se mide si hay un aumento de ARNm de estas proteínas. Para ello se realiza una técnica llamada transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa (RT-qPCR) (16). Esta técnica permite cuantificar la cantidad del ARNm presente en la célula que codifica para proteínas con función inflamatoria.

Finalmente, *¿Cómo podemos estudiar el efecto de los serotipos a, b y c de la bacteria Aa en la forma y tamaño de las células cerebrales?*

Para estudiar los efectos que tiene el LPS de los distintos serotipos de bacterias en la forma (morfología) de las células cerebrales, se realizó una técnica llamada inmunofluorescencia mediante la cual usando marcadores específicos de los distintos tipos celulares (neuronas, astrocitos y la micro-

cambios en su morfología y abundancia a través del uso de un microscopio especializado.

Por otra parte, las neuronas son células altamente especializadas que poseen tres regiones el cuerpo o soma, las dendritas y el axón (muy fino y largo) que se ve solo con técnicas especializadas. Desde el cuerpo o soma se extienden las dendritas que permiten la comunicación con otras neuronas. El análisis de Sholl en neuronas, es un método que permite evaluar las dendritas en i) la cantidad de ramas que presentan y ii) la distancia en la cual se producen la mayor cantidad de ramas partiendo desde el cuerpo o soma de la neurona.

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de diferentes programas computacionales y estadísticos que permiten evaluar matemáticamente si las diferencias entre las condiciones tienen una alta probabilidad de ser verdaderos.

3. Resultados

a) El serotipo b de la bacteria Aa

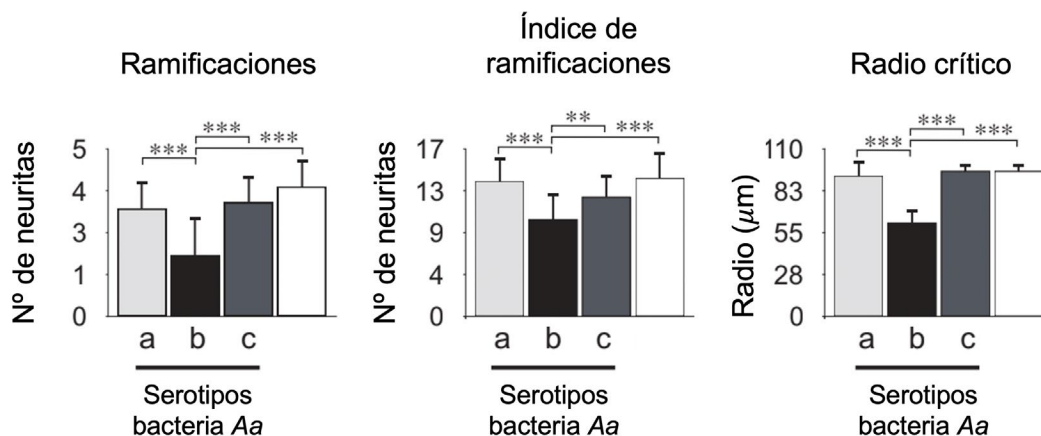


Figura 1.

Gráficos muestran la cantidad de veces que aumentaron las concentraciones de ARNm de moléculas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6), y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10), para los cultivos expuestos a los serotipos a, b, c, y sin exposición (control). Lo anteriormente mencionado se realizó mediante análisis de RT-qPCR.

En el sistema inmune participan diversas proteínas que se activan en respuesta a la presencia de patógenos, algunas promueven la inflamación, mientras que otras por el contrario tratan de detenerla. A las primeras las llamamos pro-inflamatorias, ejemplos de estas moléculas son la interleuqui-

na 1 beta (IL-1 β) y la interleuquina 6 (IL-6). Por el contrario, las anti-inflamatorias como su nombre lo indica, ejercerán la acción opuesta. Dentro de este último grupo encontramos a la interleuquina 4 (IL-4) y la interleuquina 10 (IL-10).

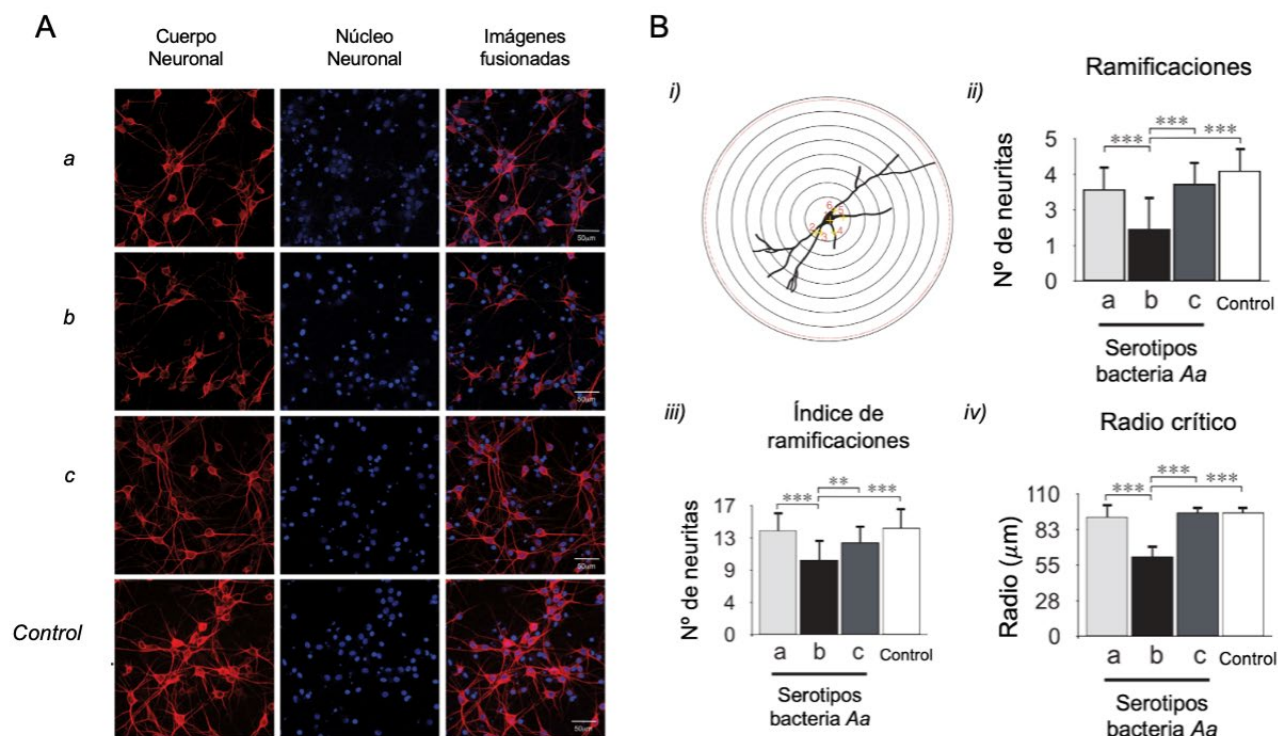


Figura 2.

(A) Morfología neuronal de cultivos mixtos de hipocampo, evaluada con tinción para MAP2 (cuerpos, dendritas y axones neuronales en rojo). Los cultivos fueron expuestos a LPS de los serotipos a, b, c de Aa, y los controles no fueron inducidos. Los núcleos celulares se observan en azul (DAPI), y se aprecia la colocación de ambas tinciones en las imágenes fusionadas. (B) Cuantificación de arborización dendrítica mediante análisis Sholl de neuronas de cultivos mixtos de hipocampo tratados con 50 ng / mL de LPS purificado de los serotipos a, b o c de Aa y teñidas con MAP2 (i) Esquema de análisis Sholl, esta técnica describe las arborizaciones neuronales de las marcas iniciales. Cada neurona es marcada en los núcleos y las dendritas, y el programa crea círculos concéntricos de 10 a 100 micrones alrededor del núcleo y cuenta cuántas veces las dendritas intersectan cada círculo. El programa cuantifica (ii) el número de ramas o dendritas iniciales, (iii) el índice de ramificación de Schoenen (la relación entre la intersección máxima y el número principal de dendritas) y (iv) el radio crítico (representa a qué distancia está la dendrita más larga). Los datos se presentan como el promedio $\pm$ la desviación estándar de cinco experimentos independientes. Luego de obtener los resultados, éstos se evalúan con análisis estadísticos para identificar si los resultados son significativos (*** $p < 0,001$).



Los cultivos celulares obtenidos a partir del hipocampo, región del cerebro que es afectado por la EA, que contienen microglías, astrocitos y neuronas fueron expuestos a la bacteria Aa serotipo a, b y c donde se observó que el serotipo b se asoció a un aumento en el ARN mensajero que se traduce en las moléculas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6, comparado con el control. Por otro lado, al evaluar las moléculas anti-inflamatorias con los mismos tratamientos, el serotipo b no se asoció a cambios significativos en sus niveles, mientras que el serotipo a se asoció a un aumento de los niveles de moléculas antiinflamatorias (**Figura 1**). Por lo tanto, el serotipo a aumenta los niveles de ARNm de moléculas anti-inflamatorias y el serotipo b aumenta los niveles de ARNm de moléculas pro-inflamatorias.

b) La administración de LPS correspondiente al serotipo b de la bacteria Aa induce cambios en la morfología de neuronas hipocampales.

Por los efectos que se observaron en los niveles de moléculas pro-inflamatorias se evaluó el efecto de los LPS provenientes de los distintos serotipos de la bacteria Aa en la morfología de las células hipocampales. En la **Figura 2A** se observaron cambios en la morfología de las neuronas tratadas con el serotipo b, donde se muestra una desaparición o disminución de las dendritas. Para cuantificar estos resultados se realizó el análisis de Sholl (**Figura 2B**), los resultados evidenciaron que el

serotipo b genera cambios morfológicos significativos en las células hipocampales produciendo encogimiento y una disminución tanto en la cantidad ramas dendríticas como en la ramificación (arborización) (**Figura 2B**).

4. Discusión

Recordemos que en la enfermedad de las encías (enfermedad periodontal) existe liberación de moléculas inflamatorias, lo cual además de contribuir al desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares, también podrían migrar, atravesar la barrera hematoencefálica y contribuir a una mayor inflamación cerebral (17).

Estudios previos demostraron que algunas bacterias tienen la capacidad de activar la respuesta inmune en células cerebrales, específicamente se vió que las células encargadas de defender al cerebro (microglia) se activaron generando inflamación sugiriendo su participación en el desarrollo de la EA (8, 18).

En este trabajo estudiamos si los serotipos de la bacteria Aa relacionados a la periodontitis agresiva podrían generar una respuesta inflamatoria en las células cerebrales, causando daños neuronales similares a los observados en la EA. Nuestros resultados aportan nueva evidencia indicando que el LPS del serotipo b de la bacteria Aa es capaz de provocar una mayor respuesta del sistema inmune de células del cerebro, la que se caracteriza por una mayor producción de moléculas infla-

matorias cómo IL-1 β e IL-6 en células del hipocampo.

Si bien los diferentes tipos de bacterias Aa estudiados en este trabajo pueden activar una respuesta inmune esta no será la misma para todas. Nuestros resultados sugieren que el serotipo b corresponde a la cepa más agresiva mostrando un cambio de la morfología de las neuronas (encogimiento, disminución de las ramas dendríticas y del índice de ramificación) que se acompañó de un aumento en la producción de O β As, (datos no mostrados) molécula clave en la EA.

Interesantemente, los resultados obtenidos con el serotipo a muestran que esta cepa promueve la síntesis de moléculas anti-inflamatorias. Mientras que el serotipo c no mostró diferencias significativas con el grupo control.

En conclusión, se demostró que el serotipo b de la bacteria Aa., presente en la enfermedad periodontal, causa una respuesta inmunológica específica en las células cerebrales, lo cual podría aumentar el riesgo de la EA.

Este trabajo además de estudiar la EA, pretende promover el cuidado de la salud bucal, no sólo por las implicancias odontológicas sino también por las eventuales consecuencias en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Referencias

1. Z. Wu, H. Nakanishi, Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *Journal of pharmacological sciences* 126, 8-13 (2014).
2. P. Sudhakara, A. Gupta, A. Bhardwaj, A. Wilson, Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent J (Basel)* 6, (2018).
3. J. A. Brigido, V. R. da Silveira, R. O. Rego, N. A. Nogueira, Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 19, e184-191 (2014).
4. J. B. Kaplan et al., Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* 69, 5375-5384 (2001).
5. M. B. Perry, L. M. MacLean, J. R. Brisson, M. E. Wilson, Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem* 242, 682-688 (1996).
6. M. B. Perry, L. L. MacLean, R. Gmur, M. E. Wilson, Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect Immun* 64, 1215-1219 (1996).
7. J. M. Noble et al., Periodontitis is



- associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1206-1211 (2009).
8. N. Ishida et al., Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis* 3, 15 (2017).
9. M. T. Heneka et al., Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14, 388-405 (2015).
10. M. L. Block, J. S. Hong, Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76, 77-98 (2005).
11. Y. Fang et al., The blockage of the Nogo/NgR signal pathway in microglia alleviates the formation of Aβ plaques and tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation* 13, 56 (2016).
12. A. C. Paula-Lima, J. Brito-Moreira, S. T. Ferreira, Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 126, 191-202 (2013).
13. S. T. Ferreira, M. V. Lourenco, M. M. Oliveira, F. G. De Felice, Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 9, 191 (2015).
14. P. Sparks Stein et al., Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 8, 196-203 (2012).
15. A. C. Paula-Lima, F. G. De Felice, J. Brito-Moreira, S. T. Ferreira, Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology* 49, 1140-1148 (2005).
16. J. Diaz-Zuniga et al., Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 41, 242-251 (2014).
17. A. Vargas-Caraveo et al., Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Sci Rep* 7, 13113 (2017).
18. S. Poole, S. K. Singhrao, L. Kesavalu, M. A. Curtis, S. Crean, Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 36, 665-677 (2013).



Esta revista fue financiada por la Iniciativa Científica Milenio a través de su concurso Proyección al Medio Externo 2020, adjudicado al Instituto de Neurociencia Biomédica (ICN09_015).

