



**GUÍA PARA PRESENTACIÓN DE INFORMES  
FINALES UAM**

**CÓDIGO:** GIN-GUI-001

**VERSIÓN:** 1

**FECHA ELABORACIÓN DEL  
DOCUMENTO:** 23/ENE/2015



**RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS GENES IL- 6, TNF-A Y  
TLR-4 CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN PACIENTES CON  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

**JUAN DAVID MUÑOZ ALVARADO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES**

**FACULTAD DE SALUD**

**ESPECIALIZACIÓN EN PERIODONCIA**

**MANIZALES**

**2018**

JUAN DAVID MUÑOZ ALVARADO

Proyecto de grado para optar al título de Especializa en periodoncia

Tutor

DR. Carlos Andrés Naranjo Galvis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE SALUD

ESPECIALIZACIÓN EN PERIODONCIA

MANIZALES

2018

## 1 RESUMEN

La enfermedad periodontal se ha relacionado con diversas enfermedades sistémicas inflamatorias crónicas, y actualmente se ha vinculado con enfermedad de Alzheimer (EA). Se conocen varias hipótesis sobre esta relación, sin embargo la evidencia científica actual no explica la relación entre ambas patologías completamente. Este estudio evaluó la presencia de polimorfismos en genes de respuesta inmune como la IL-6, TNF- $\alpha$ , y el receptor TLR-4 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y sanos relacionándolos con el diagnóstico periodontal, identificando como posible factor de riesgo la susceptibilidad genética al desarrollo de estas patologías.

**Metodología** Se incluyeron pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer de la ciudad Manizales, con un rango de edad entre 65 y 80 años, de ambos sexos. La muestra fue intencional, un total de 62 pacientes (20 casos y 42 controles). Se registraron datos sociodemográficos, se realizó la evaluación del estado de salud periodontal con hallazgos de profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, nivel clínico de inserción e índice de placa bacteriana. Se realizó proceso de genotipificación por (RT-PCR), se realizó un análisis estadístico descriptivo para determinar el comportamiento de las variables de los polimorfismos genéticos, los índices periodontales y el diagnóstico periodontal.

**Resultados:** Una vez realizado el proceso de genotipificación en los genes de interés, se encontró para este estudio una relación estadísticamente significativa entre el genotipo G/G del gen de la IL-6 (-174) en pacientes con periodontitis, mientras el genotipo C/G para el mismo gen se encontró asociado en pacientes sin periodontitis.

**Conclusiones:** La presencia del genotipo G/G en el gen de IL-6 (-174) podría sugerir ser un factor riesgo para el desarrollo de enfermedad periodontal y la presencia de genotipo C/G en el gen de la IL-6 (-174) un factor protector en la población estudiada.

**PALABRAS CLAVES:** Enfermedad de Alzheimer, Periodontitis, Polimorfismo de único nucleótido (SNP).

## ABSTRACT

Periodontal disease has been linked to various chronic inflammatory systemic diseases, and it has currently been linked to Alzheimer's disease (AD). Several hypotheses about this relationship are known, however the current scientific evidence does not explain the relationship between both pathologies completely. This study evaluated the presence of polymorphisms in immune response genes such as IL-6, TNF- $\alpha$ , and the TLR-4 receptor in patients with Alzheimer's disease and healthy people related to periodontal diagnosis, identifying susceptibility as a risk factor genetic development of these pathologies.

**Methodology:** We included patients diagnosed with Alzheimer's disease from the city of Manizales, with an age range between 65 and 80 years, of both sexes. The sample was intentional, a total of 62 patients (20 cases and 42 controls). Sociodemographic data were recorded, evaluation of the periodontal health status was made with depth probing findings, bleeding on probing, clinical level of insertion and bacterial plaque index. A genotyping process was carried out by (RT-PCR), a descriptive statistical analysis was carried out to determine the behavior of the variables of the genetic polymorphisms, the periodontal indices and the periodontal diagnosis.

**Results:** Once the genotyping process in the genes of interest was performed, a statistically significant relationship was found between the G / G genotype of the IL-6 gene (-174) in patients with periodontitis, while the genotype C / G for the same gene was found associated in patients without periodontitis.

**Conclusions:** The presence of the G / G genotype in the IL-6 gene (-174) could suggest a risk factor for the development of periodontal disease and the presence of genotype C / G in the gene of IL-6 (- 174) a protective factor in the population studied.

**KEY WORDS:** Alzheimer's disease, Periodontitis, Single Nucleotide Polymorphism (SNP).

## CONTENIDO

1	RESUMEN.....	iii
2	PRESENTACIÓN .....	9
3	INTRODUCCIÓN.....	10
4	ÁREA PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN .....	11
5	REFERENTE TEÓRICO .....	13
	5.1 COMPORTAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN EL ADULTO MAYOR .....	14
	5.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL EN PACIENTES CON ALZHEIMER.....	17
	5.3 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	20
	5.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y SU INFLUENCIA EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL .....	21
6	OBJETIVOS.....	26
	6.1 OBJETIVO GENERAL:.....	26
	6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	26
7	METODOLOGÍA.....	27
8	RESULTADOS .....	31
9	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
10	CONCLUSIONES .....	50
11	RECOMENDACIONES .....	52
12	EVIDENCIA DE RESULTADOS EN GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO, FORTALECIMIENTO DE LA CAPACIDAD CIENTÍFICA Y APROPIACIÓN SOCIAL DEL CONOCIMIENTO.....	53
13	IMPACTOS LOGRADOS.....	55

14	ANEXOS .....	56
14.1	ANEXO 1 .....	56
14.2	ANEXO 2 .....	58
15	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Características generales de los pacientes con Alzheimer y Sanos .....	33
Tabla 2 Indicadores de salud oral en función de los grupos de pacientes estudiados .....	34
Tabla 3 Características como enfermedad periodontal, uso de prótesis y consumo de alcohol y tabaco en función del sexo.....	35
Tabla 4 Indicadores de salud oral en función del sexo.....	36
Tabla 5 Presencia de alelos en diferentes marcadores genéticos para pacientes con Enfermedad de Alzheimer y pacientes sanos .....	37
Tabla 6 Presencia de genotipos en diferentes marcadores genéticos según el nivel de severidad de la enfermedad periodontal. ....	38
Tabla 7 Presencia de polimorfismos genéticos según la historia de periodontitis .....	40
Tabla 8 Estimación del modelo de regresión logística para la presencia/ausencia de enfermedad periodontal a través el método de selección Forward.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Presencia del marcador genético de la IL-6 (rs2069827) según el nivel de severidad a la enfermedad periodontal. Nótese la presencia del 84 % del genotipo G/G en pacientes con periodontitis crónica severa. ....	39
--	----



## 2 PRESENTACIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología inflamatoria neurodegenerativa. Según el informe mundial sobre Alzheimer en el año 2015, se estimó que más de 9.9 millones de personas padecen algún tipo de demencia<sup>1</sup>. Así mismo, la enfermedad Periodontal es una enfermedad inflamatoria que causa destrucción de los tejidos de soporte y protección de los dientes; y según el Estudio Nacional en salud bucal IV del 2012; se reporta que alrededor del 50% de la población presenta algún tipo de enfermedad periodontal de forma generalizada.

Se han descrito posibles asociaciones entre la enfermedad periodontal y la Enfermedad de Alzheimer, dado que la respuesta inflamatoria desencadenada por la presencia de microorganismos periodontopatógenos, contribuyen vía sanguínea a la activación de la microglía central, ocasionando una mayor concentración de marcadores inflamatorios a nivel encefálico, ayudando de ésta manera a la formación de las placas seniles y ovillos neurofibrilares tras la desnaturalización de la proteína Tau Neuronal, causando neurodegeneración irreversible presente en la enfermedad de Alzheimer.

Adicionalmente se ha descrito ampliamente la presencia de genotipos hiperinflamatorios en la enfermedad periodontal y enfermedad de Alzheimer. En la actualidad, en Colombia no se ha realizado ningún estudio de análisis de polimorfismos genéticos en pacientes con Enfermedad de Alzheimer y periodontitis. Este proyecto evaluó la presencia de polimorfismos genéticos mediante la técnica de PCR en Tiempo Real en genes de citoquinas (IL-6, TNF- $\alpha$ ) y el receptor (TLR-4) en pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA) con y sin periodontitis residentes en el municipio de Manizales, con el fin de exponer una posible existencia de asociación entre ambas patologías.

### 3 INTRODUCCIÓN

Las diferentes formas de demencia, incluida la Enfermedad de Alzheimer (EA), constituyen uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo debido a la prevalencia actual (46 millones de personas)<sup>2</sup>, al número de pacientes que se calculan para los años venideros y a los costos que ello representa. Afecta a más de 35 millones de personas en todo el mundo, una cifra que se duplicará para 2030 y se triplicará para 2050, hasta los 115 millones de personas afectadas. Latinoamérica es una de las regiones que se verán más afectadas y los casos aumentarán desde los más de 7,8 millones de personas desde la actualidad hasta más de 27 millones en 2050<sup>3</sup>. Según un estudio epidemiológico reciente, a nivel mundial, cerca de 25 millones de personas padecen EA, con aproximadamente 5 millones de nuevos casos de demencia cada año, y con un nuevo caso de EA cada 7 segundos<sup>4</sup>. Se estima que a nivel mundial, el número total de personas afectadas por la EA se duplicará cada 20 años hasta llegar a 81 millones en el 2040, estando las civilizaciones occidentales y los países en desarrollo en especial riesgo<sup>5</sup>.

En Colombia se ha determinado una prevalencia de demencia del 1.8 al 3.4% en pacientes mayores a 65 años, siendo las regiones de mayor prevalencia la región suroccidental y la oriental. Las proyecciones presentadas de demencia en mayores de 60 años y el crecimiento poblacional esperado según el DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística) en Colombia son cifras de alto impacto para los sistemas de salud<sup>6</sup>. De igual manera, el Cuarto Estudio Nacional en Salud Bucal (ENSAB IV) realizado en Colombia<sup>7</sup>, reportó que para todas las formas de enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis) existe una prevalencia mayor a 70%; de esta población, los adultos mayores a 65 años, presentan 95% de prevalencia de la misma, en donde, el 17.7% de los casos corresponden a periodontitis de moderada a severa<sup>8</sup>.

## 4 ÁREA PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer comparte características con la periodontitis en la producción de citoquinas pro-inflamatorias sistémicas, lo que permite plantear que polimorfismos genéticos comunes pueden estar asociados a ambas patologías. Con ello se plantea que la prevención o el tratamiento oportuno de la Periodontitis podrían controlar un factor de riesgo potencial para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer constituye una enfermedad neurodegenerativa que provoca demencia y muerte, se caracteriza por presentar neuroinflamación por la activación crónica de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ,<sup>9</sup> liberados por la microglía, lo cual desencadena la desnaturalización de la Proteína Precursora Amiloidea (APP), proteína transmembranal que está relacionada con el proceso de sinapsis, y la desnaturalización de la Proteína Tau intraneuronal, relacionada con la unión de los microtúbulos asociados a la tubulina para estabilizar el citoesqueleto neuronal; la desnaturalización de éstas proteínas termina en la formación de placas extra neuronales de péptidos de beta amiloide, y ovillos intraneuronales de moléculas Tau que produce degeneración neuronal irreversible<sup>10</sup>.

La enfermedad periodontal se caracteriza por el desafío bacteriano sobre los tejidos blandos y duros periodontales del hospedero, lo cual desencadena una respuesta inflamatoria crónica activando la respuesta inmune innata y adaptativa liberando en su proceso fisiológico citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , adicionalmente activando el receptor TLR-4 entre otros. Existe evidencia de la relación existente entre la enfermedad periodontal y la diabetes<sup>11</sup>, obesidad<sup>12</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>13</sup> y renales<sup>14</sup>; todas éstas comparten las mismas citoquinas proinflamatorias. Surge entonces la necesidad de saber si existe relación entre la enfermedad periodontal y la enfermedad de Alzheimer, puesto que se ha encontrado que al realizar tratamiento de la enfermedad periodontal se presenta disminución de marcadores inflamatorios y una mejora sistémica. Sin embargo, a pesar de que las enfermedades inflamatorias crónicas presentan en general las mismas citoquinas, existen personas que no desarrollan las enfermedades a pesar de

presentar los factores de riesgo; esto se explica desde el perfil genético de los individuos, y en el cual se pueden realizar análisis de polimorfismos genéticos que afectan a la secuencia codificante o reguladora de las proteínas produciendo cambios importantes en la estructura de la molécula implicada determinando su función, mecanismos de interacción celular y regulación.

La importancia de este trabajo radica en determinar la existencia de polimorfismos en genes de citoquinas de respuesta inflamatoria como la IL-6, TNF- $\alpha$ , y el receptor tipo Toll 4 (TLR-4) implicados en la respuesta inmune inflamatoria desencadenada por la enfermedad periodontal en pacientes con enfermedad de Alzheimer y población sana, planteando la posibilidad de que la enfermedad periodontal sea un factor de riesgo que contribuya al establecimiento y progresión de la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente establecer si los factores genéticos conllevan al desarrollo de éstas enfermedades<sup>15</sup>, y de esta manera aplicar protocolos y guías de manejo preventivo, paliativo y curativo integral para ambas entidades. Con los resultados de ésta investigación se plantea proponer el tratamiento periodontal, como parte del manejo integral preventivo para la progresión de la enfermedad de Alzheimer, contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de éste grupo poblacional y, así mismo, contribuir al conocimiento científico actual de la patogenia de éstas enfermedades, que afecta gran parte de la población.<sup>16</sup>

## 5 REFERENTE TEÓRICO

El término enfermedad periodontal se usa para designar a dos entidades comunes que afectan los tejidos periodontales. La gingivitis es la forma más leve y se manifiesta como una respuesta inflamatoria de la encía, en la cual permanece el tejido conectivo de inserción en su nivel original<sup>17</sup>. Esta entidad se considera una respuesta inmune a la presencia de biopelícula dental, pero modificada por factores sociales y de comportamiento, rasgos genéticos y epigenéticos, todos ellos modulados y controlados por la respuesta inmune e inflamatoria del hospedero. La periodontitis se considera una respuesta inmune individual en la cual existe un cambio en el contenido de la microflora oral, que se manifiesta con la pérdida progresiva de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar, presencia de bolsas periodontales, edema del tejido conectivo gingival, agrandamiento o recesión gingival, hemorragia al sondaje, aumento en la movilidad y pérdida dental. Histopatológicamente se encuentra migración del epitelio de unión, pérdida de fibras colágenas, presencia de numerosos leucocitos polimorfonucleares en el epitelio de unión y un denso infiltrado inflamatorio celular con plasmocitos, linfocitos y macrófagos<sup>18, 19</sup>. No existe una edad particular de aparición de la misma, pero es claro que la periodontitis puede iniciar en edades entre 40 y 50 años, afectando aproximadamente, en su forma leve, del 40 al 60% de los adultos occidentales. La periodontitis severa (caracterizada por pérdida de inserción mayor a 6 mm) afecta al menos de 8 a 15% de la población<sup>20</sup>.

En población de Estados Unidos se ha reportado que la mitad de la población ha tenido alguna historia de gingivitis y que el 14 % de ellos ha sufrido enfermedad periodontal, resultados que pueden variar de acuerdo a la forma de diagnóstico adoptado. El cuarto estudio nacional en salud bucal (ENSAB IV) que se realizó en Colombia en el 2014<sup>21</sup>, reportó una prevalencia del 54.8% de la población que presentan periodontitis de moderada a severa. El proceso inflamatorio inicial dentro del tejido periodontal se considera más que un proceso patológico, un mecanismo de defensa fisiológico contra el reto microbiano, el cual, al no ser eliminado mecánicamente para retornar a la homeostasis tisular, resulta en un exceso de inflamación y se considera un fracaso en las vías de resolución de la misma. La

persistencia de la biopelícula alrededor del tejido periodontal resulta en una evidente invasión leucocitaria, inflamación crónica y destrucción posterior de la matriz extracelular y del hueso alveolar<sup>22</sup>. Los procesos inflamatorios crónicos se manifiestan con la presencia no solamente en el sitio afectado sino en el torrente circulatorio de citoquinas y quimioquinas, las cuales regulan la respuesta inmune durante todas las etapas del proceso inflamatorio. Dichas proteínas son producidas por células propias del periodonto como las células epiteliales, fibroblastos y por los fagocitos del proceso inflamatorio (neutrófilos y macrófagos) durante la fase inicial, y por los linfocitos, durante la etapa establecida y avanzada de la lesión periodontal. Después del reconocimiento y presentación de los antígenos periodontopáticos, citoquinas como el Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina 1 beta (IL-1  $\beta$ ) y la interleuquina 6 (IL-6), son las primeras en aparecer en el proceso de patogénesis periodontal y son responsables de la migración celular inflamatoria, degradación de la matriz extracelular y de la activación de la osteoclastogénesis<sup>23</sup>. Por lo tanto se acepta que la interrupción del balance entre la actividad osteoblástica y osteoclástica característica de la periodontitis, es iniciada por la presencia de bacterias y sus productos, y por la presencia de citoquinas inflamatorias como resultado de este estímulo.

## **5.1 COMPORTAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN EL ADULTO MAYOR**

El envejecimiento se ha asociado al deterioro progresivo de la salud física y mental, así mismo, al incremento en el riesgo del desarrollo de patologías inflamatorias crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y periodontitis<sup>24</sup>.

La biología del envejecimiento aún no ha sido completamente comprendida; sin embargo, se han postulado teorías como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, en la cual la presencia acumulativa de radicales libres contribuye al daño celular al exceder la capacidad regulatoria de los mecanismos antioxidantes del organismo; como resultado, la

inflamación crónica es una de las manifestaciones del estrés oxidativo sistémico<sup>25</sup>; en el cual se genera daño de la membrana celular, proteínas transmembranales, el ADN y otras estructuras celulares. Ésta acción de forma prolongada genera pérdida de la función y muerte celular<sup>26</sup>.

En el curso de la respuesta inmune en la progresión de la enfermedad periodontal las células de primera línea de defensa, los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y macrófagos producen citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , entre otros, y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en los procesos de fagocitosis; éstos juegan un papel acumulativo en la inflamación crónica y destrucción tisular de tejido conectivo presente en la enfermedad periodontal<sup>27</sup>.

Se ha descrito en diferentes poblaciones que la prevalencia y la severidad de la enfermedad periodontal aumenta con el incremento de la edad<sup>28 29 30</sup>. Igualmente los escenarios de multimorbilidad con presencia de obesidad, síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos, procesos neoplásicos, susceptibilidad a infecciones y trastornos de la inmunidad, se asocian a una posible relación entre el envejecimiento y el desarrollo de inflamación crónica<sup>31</sup>.

La periodontitis es generada a partir de la respuesta inmune entre el hospedero ante el reto microbiano, en la cual se produce una inflamación crónica orquestando destrucción del tejido conectivo y hueso alveolar que protege y rodea el diente<sup>32</sup>; la respuesta inmune en la enfermedad periodontal es modulada por factores genéticos, enfermedades sistémicas, estado inmuno-inflamatorio individual y el ambiente.

En la progresión de la enfermedad periodontal y su asociación con el proceso de envejecimiento se ha postulado que el efecto acumulativo de la exposición a la microbiota periodontopatógena causa la progresión de la periodontitis; adicionalmente se ha planteado que el envejecimiento causa alteraciones en la función inmuno-inflamatoria del tejido periodontal causando una mayor susceptibilidad para desarrollar periodontitis<sup>33</sup>.

En un estudio experimental se indujo gingivitis en adultos jóvenes (20-25 años de edad) y en adultos mayores ( $\geq 65$  años de edad); todos los pacientes fueron tratados periodontalmente previamente estableciendo salud y posterior a ello se indujo gingivitis mediante la abstención de higiene oral. En los resultados se encontró que el grupo de adultos mayores desarrollaron mayor severidad de gingivitis y mayor acumulación de células inflamatorias<sup>34</sup>. En otro estudio similar se encontraron altos niveles de IL-1 $\beta$  en el fluido gingival crevicular en el grupo de adultos mayores.<sup>35</sup>

En una revisión reciente sobre el impacto del envejecimiento sobre la inmunidad celular y la inflamación en el desarrollo de la periodontitis, Hajishengallis<sup>25</sup> describe las posibles alteraciones en las células de la inmunidad; como la disminución en la producción de las células T por la involución del timo con el aumento de la edad, reduciendo el repertorio de la diversidad de reconocimiento de antígenos efectuados por estas células; así mismo la reducción de la expansión clonal de las células T y células B, por lo que se postula que existe una posible mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones en adultos mayores.<sup>36</sup>

Se ha encontrado que uno de los desafíos en el momento de estudiar las células de adultos mayores es la obtención de “células sanas” puesto que la mayoría presenta algún tipo de morbilidad; sin embargo se ha encontrado hallazgos interesantes que explicarían la mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades inflamatorias. El número de Neutrófilos (PMNs) no cambia con el aumento de la edad, pero si se genera cambios en la estructura de la membrana lipídica que sirve como plataforma para la transducción de la señales; con el envejecimiento se produce el aumento del colesterol que disminuye la fluidez de la membrana plasmática, afectando la activación del receptor (TREM-1) generando disminución en la degranulación y fagocitosis, adicionalmente los Neutrófilos (PMNs) de personas ancianas muestran una actividad incrementada de Proteínas supresoras de Señalización (SOCS), disminución de receptores (CD16)<sup>37</sup> lo que puede explicar la disminución de la expresión de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) que conlleva a una disminución en la quimiotaxis, fagocitosis y actividad microbicida,<sup>38</sup> comprometiendo a una respuesta inmune más lenta y una mayor susceptibilidad a las infecciones microbianas en el adulto mayor.<sup>39</sup>



Se ha descrito que los Macrófagos activados de adultos mayores incrementan la producción de (PGE2) lo cual puede explicar la inhibición del MCH-II y la IL-12, adicionalmente se ha descrito una disminución en la expresión de (TLR-3), lo que puede suscitar un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias a través de la activación de (STAT-1) <sup>40</sup> .

Las Células Dendríticas en adultos mayores realizan funciones como la quimiotaxis, endocitosis, presentación de antígenos y disminución de producción de IL-12, lo que resulta en una menor activación de Células T CD4+<sup>41</sup>, disminución en la expresión de TLR 1,3,5,8; Sin embargo, se ha reportado que producen mayor cantidad de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-23, y una mayor actividad del NF-K $\beta$ . En el proceso de envejecimiento existe un aumento en la concentración sistémica de marcadores inflamatorios tales como PCR, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , entre otros<sup>42</sup>.

Éstas alteraciones pueden asociarse a una pobre respuesta de anticuerpos en la inmunidad adquirida y consecuente mayor susceptibilidad a infecciones; al mismo tiempo podría contribuir al desarrollo de inflamación de carácter autoinmune al incrementarse la actividad contra antígenos propios<sup>43</sup>. Estos cambios a nivel inmunológico pueden ayudar a explicar la mayor prevalencia y severidad de la enfermedad periodontal en los adultos mayores en el mundo.

## **5.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL EN PACIENTES CON ALZHEIMER**

El papel de la periodontitis como factor de riesgo en múltiples enfermedades sistémicas ha sido ampliamente aceptado , <sup>44 45 46 47 48 49 50 51</sup>. Existe una evidencia creciente sobre una posible asociación entre periodontitis y la enfermedad de Alzheimer; recientes estudios han indicado que los patógenos periodontales pueden contribuir a la Neuroinflamación presente en la enfermedad de Alzheimer<sup>52</sup>.

La enfermedad de Alzheimer es una condición neurodegenerativa irreversible, siendo la causa más común de demencia; para el año 2010 se estimó que más de 35 millones de personas en el mundo padecían ésta enfermedad<sup>53</sup> y se estima que para el año 2030 estas

cifras se dupliquen<sup>54</sup>. Así mismo con el aumento de la expectativa de vida de la población, también se ha aumentado la prevalencia de enfermedades crónicas dentro de las cuales se encuentra la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad Periodontal.

La enfermedad de Alzheimer constituye una enfermedad neurodegenerativa que provoca demencia y muerte; la inflamación crónica es una de las características de los cerebros afectados con éste padecimiento, tras la neuroinflamación la activación crónica de mediadores inflamatorios dentro de los cuales se destacan la IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ <sup>55</sup>, liberados por la Microglía; se produce la desnaturalización de la Proteína Precursora Amiloidea (APP), proteína transmembranal que está relacionada con el proceso de sinapsis neuronal, y la desnaturalización de la Proteína Tau intraneuronal relacionada con la unión de los microtúbulos asociados a la tubulina para estabilizar el citoesqueleto neuronal; la desnaturalización de éstas proteínas termina en la formación de placas extra neuronales de péptidos de beta amiloide (A $\beta$ ), y ovillos intraneuronales de moléculas Tau que produce degeneración neuronal irreversible<sup>56</sup>.

Se han reportado diferentes factores de riesgo que tienen un efecto acumulativo nocivo en el cerebro durante la vida; como agentes infecciosos, respuesta inmune alterada del hospedero, enfermedad cerebrovascular<sup>57</sup>, bajo funcionamiento intelectual, bajos niveles de actividad física<sup>58</sup>, ingesta excesiva de alcohol<sup>59</sup>, aumento de la edad, género femenino, traumas craneoencefálicos<sup>60</sup>, y recientemente se ha sugerido la periodontitis<sup>61 62 63</sup>.

La periodontitis crónica se caracteriza por el desafío bacteriano sobre los tejidos blandos y duros periodontales del hospedero, afectando el tejido gingival y desencadenando una respuesta inmune que termina en la destrucción del ligamento periodontal y el hueso alveolar que soportan el diente; durante su progresión se desencadena una respuesta inflamatoria crónica activando la respuesta inmune innata y adaptativa liberando en su proceso fisiológico, citoquinas proinflamatorias de forma crónica en respuesta a la presencia de patógenos periodontales<sup>64</sup>

Se han reportado informes acerca de una posible relación existente entre la periodontitis y la enfermedad de Alzheimer<sup>65 66 67 68 69 70</sup>, en un estudio longitudinal con un seguimiento a

20 años, pacientes de 50 a 70 años, se encontró que aquellos individuos que tenían mayor presencia de inflamación periodontal estaba relacionado con niveles cognitivos menores<sup>71</sup>; Noble en el 2009, reportó en un estudio epidemiológico en 5.138 personas de 20 a 59 años, que el sangrado y la pérdida de inserción periodontal estaban significativamente asociados con el deterioro cognitivo<sup>72</sup>. Esto sugiere que la enfermedad periodontal podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de la EA; sin embargo ambos padecimientos comparten factores de riesgo como el tabaquismo y bajo nivel educativo; adicionalmente el individuo con enfermedad de Alzheimer tiene disminución en su capacidad motriz, ubicación consciente del tiempo y espacio, lo cual afecta directamente, la capacidad de la ejecución adecuada de la higiene oral, comprometiendo la salud periodontal.

La bacteremia de origen oral ha sido bien conocida. Un metanálisis reciente, evidenció que la acumulación de placa bacteriana y la inflamación gingival incrementa el riesgo de bacteremia en un simple cepillado dental<sup>73</sup>, también se ha reportado bacteremia después de realizado el raspaje y alisado radicular<sup>74</sup>, por lo cual se ha postulado que la ulceración del epitelio de la bolsa presente en la periodontitis crónica provee una superficie amplia de entrada de microorganismo al torrente sanguíneo, por tanto los pacientes con periodontitis tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades sistémicas de origen oral. Se ha comprobado la presencia de microorganismos periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*)<sup>75</sup> en placas ateroscleróticas, cuyas toxinas y factores de virulencia puedan llegar hasta el cerebro a través de la circulación sistémica<sup>76</sup>.

Recientemente, Poole<sup>77</sup> reportó que el lipopolisacarido de *Porphyromonas gingivalis* puede atravesar la barrera hematoencefálica de los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, pero no en cerebros de pacientes sanos. Adicionalmente se ha sugerido la entrada al cerebro, a través de la colonización de nervios periféricos. Se ha documentado la presencia de *Treponema denticola* que es una especie de espiroqueta causante de periodontitis, en el nervio trigémino, y cerebros de en especímenes post-mortem de pacientes con enfermedad de Alzheimer<sup>78</sup>.

La enfermedad de Alzheimer es fundamentalmente un proceso inflamatorio, que causa neurodegeneración progresiva e irreversible; tras la estimulación microbiana y la activación

de la respuesta inmune causa una activación proinflamatoria por parte de las células gliales que a su vez desencadena hiperfosforilación de la proteína Tau que causa la formación de las placas seniles y la formación de los ovillos neurofibrilares que perpetúan dicho ciclo. Se ha reportado que la periodontitis produce un aumento sostenido de productos inflamatorios en sangre<sup>79</sup>, las citoquinas proinflamatorias que son generadas a partir de la periodontitis como la IL-6, TNF  $\alpha$ , y proteínas inflamatorias de fase aguda como la Proteína C reactiva (PCR) pueden entrar en el torrente sanguíneo<sup>80</sup> y por tanto ser un factor de riesgo para la neuroinflamación presente en la enfermedad de Alzheimer<sup>81</sup>. Aunque es incierto cuál es el factor inflamatorio que desencadena directamente la enfermedad de Alzheimer, es posible que la inflamación periférica producida por la periodontitis crónica induzca o amplifique la Neuroinflamación.

### **5.3 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Es ampliamente conocido que existen fenotipos “hiper-inflamatorios” en los cuales, los individuos presentan una mayor susceptibilidad genética para desarrollar enfermedades inflamatorias y así mismo generar una respuesta inflamatoria exagerada. Diversos estudios han demostrado la existencia de determinados polimorfismos genéticos presentes en proteínas moduladoras de la respuesta inmune; que pueden generar defectos estructurales en los genes generando una mayor o menor susceptibilidad a padecer enfermedad periodontal<sup>82</sup>.

Un Polimorfismo de único nucleótido (SNPs) por sus siglas en inglés (Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) o Guanina (G) de una secuencia del genoma. Por definición es encontrado en más del 1% de la población; más de 9 Millones de (SNPs) se han registrado en las bases de datos,<sup>83</sup> los (SNPs) se clasifican en funcionales y no funcionales, cada uno de ellos tiene implicaciones biológicas importantes en la función del

gen, llegando a afectar la cantidad de los ARN mensajeros (ARNm), la traducción, el empalme, la estructura y función de las proteínas, mientras que los no funcionales pueden ser marcadores de susceptibilidad y protección. Un SNP puede desarrollar efectos biológicos importantes; por ejemplo si se produce una transición dentro de una región codificadora de un gen, el resultado puede ser la sustitución de un aminoácido y por lo tanto la alteración de la estructura de una proteína y finalmente su función; así mismo cuando estos cambios aparecen en la región promotora del gen puede alterar la regulación génica y dar como resultado una expresión génica inhibida, reducida o aumentada con posibles consecuencias biológicas.

Es importante considerar que los SNPs ocurren con mayor frecuencia que cualquier tipo de mutación, estimándose su frecuencia en el genoma humano de una de cada 0,3-1 Kilobases,<sup>84</sup> por tanto es plausible que una población pueda ser más susceptible o resistente frente al desarrollo de una enfermedad, este asunto fue confirmado por Kornman quien reportó una asociación significativa entre la periodontitis y una variación genética en el gen que codifica la IL-1 sugiriendo que el 30% de adultos con periodontitis tiene éste genotipo,<sup>85</sup> de esta manera se establece que la variabilidad clínica que presentan los pacientes con periodontitis está influenciada por los diferentes efectos de las citoquinas sobre la reabsorción ósea y destrucción del tejido conectivo.

#### **5.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y SU INFLUENCIA EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Los factores genéticos han sido reportados como influyentes en el desarrollo de la enfermedad periodontal, polimorfismos genéticos en las estructuras proteicas moleculares como citoquinas y receptores que intervienen en la respuesta innata han sido asociados a la susceptibilidad individual en el desarrollo de la periodontitis<sup>86</sup>.

Una importante variante genética en el desarrollo de la respuesta inmune ha sido el polimorfismo en el receptor Toll tipo 4 (TLR-4) que es un receptor presente en la superficie celular de (monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, linfocitos B) e intervienen en la respuesta inmunitaria reconociendo patrones moleculares de patógenos (PAMPs), incluyendo lipoproteínas bacterianas, ácidos lipoteicoicos, flagelina, ADN bacteriano y ARN viral.

Se han identificado once receptores diferentes en los tejidos periodontales humanos; el receptor Toll tipo 4 (TLR-4) es uno de los que predomina en los tejidos periodontales, en fibroblastos gingivales y en macrófagos circulantes de tejidos inflamados,<sup>87</sup> se ha encontrado que reconoce los LPS, componentes de la pared celular y lipoproteínas de bacterias periodontopatógenas como son la: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.<sup>88 89</sup> Cuando se unen a PAMPs, se inician una serie de eventos intracelulares mediante la activación de la cascada de proteínas intracelulares TRAM, TIRAP, MYD88, que activan el factor de transcripción nuclear Kappa Beta (NF- $\kappa$ B) aumentando la producción de IL-6, PGE2, RANK-L desencadenado la seguida estimulación de la respuesta inmunoinflamatoria.

Los polimorfismos genéticos en el receptor TLR-4 han sido asociados con la incidencia y la progresión de enfermedades inflamatorias generadas por microorganismos Gram-negativos<sup>90</sup>. Se ha sugerido la asociación positiva del polimorfismo genético de TLR-4 (rs 4986790) con la presencia de periodontitis crónica en población Alemana;<sup>91</sup> Schröder y colaboradores evaluaron 116 pacientes diagnosticados con Periodontitis Crónica y 81 con Periodontitis Agresiva. En este estudio no encontraron asociación entre Periodontitis agresiva y SNPs en TLR-4, sin embargo si se encontró una mayor frecuencia de pacientes con Periodontitis Crónica y la presencia del polimorfismo (Asp299Gly, Thr399Ile) en el receptor TLR-4<sup>92</sup>.

Brett y colaboradores<sup>77</sup> en 2005, evaluaron 57 pacientes con periodontitis crónica, 51 pacientes con periodontitis agresiva y 100 controles, mediante técnica de amplificación de

ADN con PCR. Se encontró una asociación significativa del polimorfismo (399Ile) del gen TLR-4 con enfermedad periodontal.

El TNF- $\alpha$  es una potente citoquina con múltiples funciones celulares; es producido por macrófagos, linfocitos, células endoteliales y otras células. El TNF- $\alpha$  se encuentra presente en dos formas: una precursora unida a membrana y otra soluble (sTNF- $\alpha$ ); se encargan de regular diversos eventos biológicos de las células, tales como la activación de los leucocitos, la liberación de diversas citoquinas, quimiocinas, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se ha observado que tanto la forma (sTNF- $\alpha$ ) como la unida a membrana ejercen un papel biológico inflamatorio; TNF- $\alpha$ , unida a membrana lo hace de manera local y depende de la interacción entre células; se ha reportado que puede funcionar como ligando y receptor en los procesos inflamatorios, mientras que la forma soluble (sTNF- $\alpha$ ) ejerce sus funciones a distancia de las células que lo sintetizan<sup>93</sup>, se ha relacionado de manera crítica con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias, cardiovasculares<sup>94</sup> y autoinmunes incluyendo la Enfermedad Periodontal y Enfermedad de Alzheimer<sup>95</sup>.

En el caso del TNF- $\alpha$  se han reportado que los polimorfismo de único nucleótido, en la región promotora en -308G/A (rs1800629), -238G/A (rs361525) y -863C/A (rs1800630) están asociados con el aumento de la producción de niveles de TNF- $\alpha$ <sup>96</sup>.

En un metanálisis reciente realizado por Ding,<sup>97</sup> se evaluaron 46 estudios de casos y controles donde se evidenció que la presencia de polimorfismos genéticos en región promotora en las posiciones - 863 C/A y -308 G/A del gen TNF- $\alpha$ , contribuyen a la susceptibilidad a la periodontitis. En un estudio clínico se evaluaron variaciones genéticas en TNF- $\alpha$  -308G/A, y -238G/A en 942 pacientes de origen Caucásicos (Alemania) con presencia de enfermedad coronaria y enfermedad periodontal; los pacientes fueron divididos de acuerdo a su estado periodontal en dos grupos; periodontitis leve y periodontitis severa; se encontró que en los pacientes con genotipo AG + AA del SNP (-238 G/A) aumento en la pérdida clínica de inserción y presencia de enfermedad coronaria; adicionalmente se halló en estos pacientes niveles elevados de Proteína C Reactiva y de

IL-6, también se encontró mayor índice de sangrado en el sondaje y prevalencia de *P. Intermedia* en pacientes con el SNP -308G/A; lo que sugiere que estos SNPs pueden estar asociados a la presencia de Periodontitis crónica severa y enfermedad coronaria.<sup>98</sup>

La interleucina 6 (IL-6), es una molécula pleiotrópica involucrada en la patogénesis de múltiples enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, diabetes, periodontitis, psoriasis, EA<sup>99</sup> entre otras. Esta citoquina es producida por los macrófagos y linfocitos activados, promueven la diferenciación de las Células B en plasmocitos, estimulan la producción de anticuerpos y la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado<sup>100</sup>. La asociación de (IL-6) y la enfermedad periodontal se encuentra como un potente mediador inflamatorio involucrada en el proceso de osteoclastogénesis al permitir la formación de los osteoclastos a partir de los monocitos, adicionalmente puede activar las células del hospedero llevando a la destrucción de la matriz extracelular. Por lo tanto la presencia de Polimorfismos genéticos en el gen de la (IL-6) pueden afectar los niveles séricos de (IL-6) tras una mayor actividad transcripcional y una mayor actividad inflamatoria.

En un estudio de cohorte realizado en Londres se evaluaron 57 pacientes con periodontitis crónica, 51 pacientes con periodontitis agresiva y 100 controles, se encontró que el genotipo (-174G/C) del gen de la IL-6 estaba sobre expresado en individuos con periodontitis crónica comparado con individuos sanos, sugiriendo que la presencia de éste polimorfismo está asociado a un incremento en el riesgo de presentar periodontitis<sup>101</sup>. Por otro lado en un estudio realizado en República checa en 2004 se evaluaron 148 pacientes con periodontitis crónica y 107 controles, se encontró una asociación significativa entre una baja frecuencia del polimorfismo (-572 G/C) del gen de la IL-6 en pacientes con periodontitis, lo que sugiere que este genotipo podría ser un factor protector para el desarrollo de periodontitis<sup>102</sup>.

Así mismo; se ha confirmado mediante un metanálisis reciente, la presencia de polimorfismos genéticos del gen TNF-  $\alpha$  (-308 G/C) que contribuyen al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer,<sup>103</sup> el cual también se encuentra presente en la enfermedad



periodontal.<sup>104</sup>Smith y colaboradores en 2012, describieron que polimorfismos presentes en el gen de la IL-6, favorecen los procesos inflamatorios neurodegenerativos en la enfermedad de Alzheimer<sup>105</sup>.

Estudios prospectivos de casos y controles demuestran la existencia de unos niveles séricos elevados de proteínas inflamatorias de fase aguda y de citoquinas en la Enfermedad de Alzheimer incluyendo la IL- 1- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , y la proteína C reactiva; las cuales han sido relacionadas también con la presencia de enfermedad periodontal. <sup>106</sup>

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL:**

Relacionar la presencia de polimorfismos en los genes de citoquinas y receptores de respuesta inmune IL-6, TNF- $\alpha$  y TLR-4 con la severidad de la enfermedad periodontal en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Caracterizar clínicamente los pacientes objeto del estudio en términos clínicos periodontales.
2. Identificar polimorfismos en región promotora de los genes IL-6 (rs2069827, rs1800796) TNF- $\alpha$  (rs1799724, rs1800629, rs1800630) y TLR4 (rs4986790) relacionados con enfermedad periodontal en la población objeto de estudio.
3. Relacionar los polimorfismos genéticos de los genes de interés con las características clínicas periodontales en la población objeto de estudio.

## 7 METODOLOGÍA

-Tipo de estudio: Estudio descriptivo, con enfoque empírico analítico con alcance descriptivo y relacional con información predominantemente cuantitativa.

-Población: Pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer comprobado por especialistas de la Clínica de Memoria de Manizales, con un rango de edad entre 65 y 80 años, de ambos sexos.

-Muestra y muestreo: Muestra intencional, total de pacientes 62 pacientes (20 casos y 42 controles).

-Criterios de inclusión de casos con EA: Edad mayor o igual a 65 años de ambos géneros, consentimiento informado del paciente para participar en el estudio, escolaridad mínima quinto de primaria, diagnóstico de enfermedad de Alzheimer CDR 1-3.

-Criterios de inclusión para personas sanas: Edad mayor o igual a 65 años de ambos géneros, consentimiento informado del paciente para participar en el estudio, escolaridad mínima quinto de primaria, ausencia de enfermedad con deterioro cognitivo - enfermedad psiquiátrica confirmado por la clínica de memoria. Ausencia HTA no controlada o enfermedad neurológica.

-Criterios de exclusión: Presencia de patología neurológica o psiquiátrica que explique los cambios cognitivos o comportamentales del paciente con EA, abuso de sustancias psicoactivas y alcohol, enfermedades alérgicas, o enfermedades inflamatorias sistémicas o condiciones médicas inestables, estar consumiendo corticosteroides sistémicos por lo menos un mes antes de la toma de la muestra, presencia de dificultades auditivas o visuales y mujeres embarazadas.

-Etapas de la investigación

**Para cumplir el objetivo 1:** Previa aprobación por el comité de bioética de la UAM (Acta. 048 de julio 8 de 2015) se realizó la evaluación del estado de salud periodontal y posteriormente el diligenciamiento del consentimiento informado por el paciente y el acudiente. Fue aplicado el protocolo denominado *Evaluación clínica de enfermedad periodontal de la AAP* (1999) (Armitage)<sup>107</sup>. Cada uno de los participantes en el estudio firmó el consentimiento informado que autoriza o no su participación en el estudio para el registro de los datos sociodemográficos.

Para el examen periodontal, se realizó una valoración clínica correspondiente a una observación del sistema periodontal en cuanto a la pérdida de inserción clínica y presencia de bolsas periodontales, con una sonda periodontal e instrumental básico y los insumos necesarios como gasas, algodones y los elementos de bioseguridad. El examen se realizó en una unidad odontológica acondicionada para este fin y bajo el cumplimiento estricto de las normas de bioseguridad del paciente. Esta valoración clínica permitió establecer el grado de severidad y extensión de la enfermedad periodontal para cada paciente.

Se realizó un examen de boca completa que incluyó el registro del Periodontograma con los hallazgos de sondaje y sangrado al sondaje para establecer el diagnóstico con los siguientes criterios (Armitage G. C.-6.)<sup>108</sup>.

- Periodontitis crónica leve a moderada: Definición de caso: inflamación de la encía que se extiende hacia el aparato de inserción caracterizada por pérdida de inserción clínica debida a destrucción del ligamento periodontal y pérdida del hueso de soporte. Hallazgos clínicos: ocurre en un amplio rango de edades, en dentición temporal o permanente con una tasa de progresión baja a moderada. Se pueden presentar los siguientes signos y síntomas: edema, eritema, sangrado al sondaje y/o supuración, pérdida de un tercio del soporte periodontal. En molares, si existe compromiso de furcaciones, no excede la clase I. Pueden encontrarse bolsas periodontales hasta 6 mm con pérdida de inserción hasta 4 mm. Puede haber evidencia radiográfica de pérdida ósea y movilidad. Puede ser localizada o generalizada (Armitage G. C.-6.)<sup>109</sup>.

- Periodontitis crónica severa: Definición de caso: inflamación de la encía y del aparato de inserción, caracterizada por pérdida de inserción producida por destrucción del ligamento periodontal y del hueso de soporte adyacente. Hallazgos clínicos: Pueden incluir combinación de los siguientes signos y síntomas: edema, eritema, sangrado al sondaje y/o supuración. El soporte periodontal está perdido en más de un tercio del tejido. Hay pérdida de inserción y compromiso de furcación mayor a Clase I, bolsas periodontales de 6 mm con pérdida de inserción mayor o igual a 5 mm. Pérdida ósea moderada a severa. Si la extensión evaluada compromete más del 30 % de los dientes fue considerada generalizada, si comprometía menos del 30% de los dientes involucrados fue considerada localizada (Armitage G. C.-6.)<sup>110</sup>.

**Para cumplir con el objetivo 2:** Identificar los polimorfismos de genes relacionados con la enfermedad periodontal en la población objeto de estudio. Se realizó el siguiente procedimiento:

1. Extracción de una muestra de sangre periférica
2. Extracción de ADN con kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Kit de Qiagen)
3. Amplificación del ADN por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)
4. Genotipificación de los polimorfismos asociados a los genes de interés mediante sondas Taqman (Applied Biosystem)
5. Análisis mediante el software Allelic discrimination (Applied Biosystems).
6. Comparación de la distribución de genotipos en la población estudiada para los diferentes SNP de los genes de interés.

### **1. Obtención de muestras de sangre y ADN de los participantes:**

- Extracción de 10 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA
- Aislamiento de ADN de 200 µl de sangre total empleando el kit de extracción DNA de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2. Genotipificación:**

- Amplificación y detección de los SNP de interés utilizando el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems), empleando la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real, cada reacción de RT-PCR se realizó en un volumen de 10 uL con 2 uL de DNA genómico, 1X TaqMan Genotyping Master Mix y 1X Taqman SNP Genotyping Assay Mix, siguiendo el protocolo del fabricante. En cada PCR se utilizaron dos controles positivos y dos controles negativos para cada genotipo. Los experimentos se desarrollaron con las siguientes condiciones: un calentamiento inicial de 60°C durante 30s, desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificación que consiste en 15 s a 95°C y 1 min a 60 ° C.
- La curva específica fluorescente para cada alelo y la discriminación alélica fueron visualizadas y analizadas mediante el software Allelic discrimination (Applied Biosystems).

**Para cumplir con el objetivo 3:** Relacionar los polimorfismos genéticos de los genes de interés con las características clínicas periodontales en la población objeto de estudio se realizó un:

- Análisis estadístico descriptivo para determinar el comportamiento de las variables de los polimorfismos genéticos y los índices periodontales (índice de placa bacteriana, profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica).
- Evaluación de asociaciones entre variables usando análisis bivariado controlados por edad y género utilizando el programa IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 24.

## 8 RESULTADOS

### **Análisis estadístico**

Los datos se digitalizaron en una hoja de cálculo de Excel para posteriormente ser exportados al programa IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 24, obteniendo así, toda la información de los participantes.

Para dar cumplimiento a los objetivos y alcances propuestos, se utilizaron tablas de frecuencia y contingencia, que muestran frecuencias y porcentajes. Asimismo se utilizaron gráficos de barras para el resumen de las variables cualitativas. En cuanto al análisis de las variables cuantitativas, se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión, como el mínimo, el máximo, la media y la desviación típica o estándar.

En el análisis bivariado, se hizo uso de la prueba Chi-cuadrado de Pearson, para identificar si factores como el sexo, estrato y consumo de tabaco y alcohol se encontraban relacionados con la severidad de la enfermedad periodontal y los polimorfismos genéticos. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para comparar la distribución de los datos entre dos o más de dos grupos, respectivamente.

Se realizó un análisis bivariado, mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson, para identificar si variables como el sexo, estrato, consumo de tabaco y alcohol se encuentran relacionados con la severidad a la enfermedad periodontal y presencia de polimorfismos genéticos en los genes de (IL-6) (TNF- $\alpha$ ) (TLR-4). Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para comparar la distribución de los datos entre dos o más de dos grupos, respectivamente.

Finalmente, se utilizó un modelo de regresión logística con el objetivo de analizar cómo influye en la probabilidad de enfermedad periodontal, la enfermedad de Alzheimer y la

presencia o no de polimorfismos genéticos en los genes de citoquinas inflamatorias. Este modelo permite identificar los factores de riesgo y los polimorfismos genéticos asociados a la enfermedad periodontal (Silva, 1994)<sup>111</sup>.

### **Características generales de los participantes**

Se analizó la información de un total de 62 pacientes, 20 casos diagnosticados con enfermedad de Alzheimer representando el 32.3% de la muestra, y 42 controles sin enfermedad de Alzheimer representado el 67.7% de la muestra. El 82.3% de los pacientes analizados fueron mujeres. La edad promedio de los pacientes con Alzheimer fue de  $84 \pm 8$  años y de los pacientes sanos fue de  $64 \pm 9$  años, mostrando una diferencia significativa entre ambos grupos, a partir de la prueba no paramétrica Mann-Whitney ( $p=0.000$ ).



**Tabla 1 Características generales de los pacientes con Alzheimer y Sanos**

		Control		Caso		Total		P*
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Masculino	8	19,0%	3	15,0%	11	17,7%	0,697
	Femenino	34	81,0%	17	85,0%	51	82,3%	
Diagnóstico Periodontal	Sin enfermedad	4	9,5%	10	50,0%	14	22,6%	0,005
	Leve	17	40,5%	4	20,0%	21	33,9%	
	Moderada	8	19,0%	2	10,0%	10	16,1%	
	Severa	13	31,0%	4	20,0%	17	27,4%	
Prótesis	No	25	59,5%	3	15,0%	28	45,2%	0,001
	Si	17	40,5%	17	85,0%	34	54,8%	
Tipo Prótesis	Total	8	19,0%	16	80,0%	24	38,7%	0,000
	Parcial	10	23,8%	1	5,0%	11	17,7%	
	No Tiene	24	57,1%	3	15,0%	27	43,5%	
Historia de Periodontitis	No	6	14,3%	8	40,0%	14	22,6%	0,024
	Si	36	85,7%	12	60,0%	48	77,4%	
Tabaco	No	32	76,2%	16	80,0%	48	77,4%	0,737
	Si	10	23,8%	4	20,0%	14	22,6%	
Alcohol	No	36	85,7%	16	80,0%	52	83,9%	0,567
	Si	6	14,3%	4	20,0%	10	16,1%	
Estrato	Bajo	5	11,9%	2	10,0%	7	11,3%	0,483
	Medio	30	71,4%	12	60,0%	42	67,7%	
	Alto	7	16,7%	6	30,0%	13	21,0%	

\* Prueba Chi-cuadrado

En la **tabla 1**, se observa que la mitad de los pacientes con EA no presentaron enfermedad periodontal, mientras casi el 90% de los pacientes sin Alzheimer presentaron algún nivel de severidad de enfermedad periodontal, mostrando de esta manera una diferencia de la severidad periodontal en los dos grupos de pacientes ( $p=0.005$ ). Sin embargo, el 85% de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y el 40.5% de los pacientes sanos presentaron prótesis (total o parcial), por tanto, dentro de la muestra seleccionada es más probable que los pacientes con EA tengan prótesis que aquellos sanos ( $p=0.001$ ), lo que representa mayor presencia de edentulismo en pacientes diagnosticados con EA. El 85.7% de los pacientes

sin enfermedad de Alzheimer presentaron historia de enfermedad periodontal y un 20% de los pacientes con Alzheimer también presentaron historia periodontal ( $p=0.024$ ). Factores como el sexo, consumo de tabaco, consumo de alcohol y estrato socioeconómico, son similares entre los pacientes con Alzheimer y pacientes sanos ( $p>0.05$ ). El consumo de tabaco se presentó cerca del 23%, el de alcohol de 16.1% y el estrato más frecuente es el estrato medio con un 67.75 % de participación.

**Tabla 2 Indicadores de salud oral en función de los grupos de pacientes estudiados**

Indicadores de Salud Oral	Control		Caso		Total		P*
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
Número de Dientes Presentes	20,4	9,1	4,7	6,5	15,3	11,1	0,000
% Índice de Sangrado	20,0	15,1	19,8	17,3	19,9	15,4	0,977
% Índice de placa	20,1	13,8	38,6	26,1	24,3	18,7	0,003
Profundidad al Sondaje (mm)	2,3	,5	2,4	,6	2,4	,5	0,722
Nivel de inserción (mm)	2,8	1,2	3,4	1,8	2,9	1,4	0,167

\* Prueba de Mann-Whitney

La **tabla 2** muestra indicadores de salud periodontal de los pacientes seleccionados en la muestra. En la tabla se observa que los pacientes con Alzheimer presentaron  $4.7 \pm 6.5$  número de dientes, y los pacientes sanos  $20.4 \pm 9.1$  número de dientes, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ), correlacionado con la utilización de más prótesis dentales en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer; Sin embargo se evidenció que los pacientes con Alzheimer presentaron un porcentaje de índice de 38.6%, mientras que los pacientes sin enfermedad de Alzheimer el porcentaje de placa bacteriana fue menor 20.1% ( $p=0.003$ ).

El índice de sangrado, la profundidad de sondaje fue similar entre ambos grupos de pacientes ( $p>0.05$ ) el índice de sangrado promedio fue de  $19.9 \pm 15.4\%$ , la profundidad del sondaje fue de  $2.4 \pm 0.5$  mm.

Aunque no se presentó diferencia significativa entre los grupos con respecto a nivel de inserción, se encontró un nivel de inserción de  $3.4 \pm 1.8$  mm en los pacientes con enfermedad de Alzheimer y  $2.8 \pm 1.2$  mm en los pacientes sin enfermedad de Alzheimer, con una media total de  $2.9 \pm 1.4$  mm. Lo que sugiere que los individuos con enfermedad de Alzheimer presentan una mayor pérdida de nivel de inserción y posible mayor severidad de la enfermedad periodontal con respecto a los individuos sin Alzheimer, aunque no estadísticamente significativa en este estudio.

**Tabla 3 Características como enfermedad periodontal, uso de prótesis y consumo de alcohol y tabaco en función del sexo**

		Masculino		Femenino		Total		P*
		n	%	n	%	n	%	
Diagnóstico Periodontal	Sin enfermedad	3	27,3%	11	21,6%	14	22,6%	0,776
	Leve	3	27,3%	18	35,3%	21	33,9%	
	Moderada	1	9,1%	9	17,6%	10	16,1%	
	Severa	4	36,4%	13	25,5%	17	27,4%	
Prótesis	No	6	54,5%	22	43,1%	28	45,2%	0,490
	Si	5	45,5%	29	56,9%	34	54,8%	
Tipo de Prótesis	Total	4	36,4%	20	39,2%	24	38,7%	0,620
	Parcial	1	9,1%	10	19,6%	11	17,7%	
	No Tiene	6	54,5%	21	41,2%	27	43,5%	
Historia de Periodontitis	No	1	9,1%	13	25,5%	14	22,6%	0,238
	Si	10	90,9%	38	74,5%	48	77,4%	
Tabaco	No	7	63,6%	41	80,4%	48	77,4%	0,228
	Si	4	36,4%	10	19,6%	14	22,6%	
Alcohol	No	7	63,6%	45	88,2%	52	83,9%	0,044
	Si	4	36,4%	6	11,8%	10	16,1%	
Estrato	Bajo	2	18,2%	5	9,8%	7	11,3%	0,728
	Medio	7	63,6%	35	68,6%	42	67,7%	
	Alto	2	18,2%	11	21,6%	13	21,0%	

\* Prueba Chi-cuadrado

En la **tabla 3** al relacionar el sexo de los pacientes con la presencia de enfermedad periodontal, uso de prótesis y consumo de alcohol y tabaco se encontró que solo existía una diferencia estadísticamente significativa entre hombres y mujeres en el consumo de alcohol, donde los hombres manifestaron un mayor consumo (36.4%) que las mujeres (11.8%) ( $p=0.044$ ). En los demás factores no se encontraron diferencias en función del sexo ( $p>0.05$ ).

**Tabla 4** Indicadores de salud oral en función del sexo

	Masculino		Femenino		Total		p*
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
Numero de Dientes Presentes	15	13	15	11	15	11	0,926
% Índice de Sangrado	15,4%	8,2%	21,0%	16,5%	19,9%	15,4%	0,713
% Índice de placa	19,8%	14,9%	25,3%	19,4%	24,3%	18,7%	0,500
Profundidad al Sondaje (mm)	2,6	,5	2,3	,5	2,4	,5	0,196
Nivel de inserción (mm)	4,1	2,1	2,7	1,0	2,9	1,4	0,077

\* *Prueba Mann-Whitney*

En la **tabla 4** se observa que, en relación a los indicadores de salud oral, no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, a partir de la prueba de Mann-Whitney ( $p>0.05$ ), sin embargo se encuentra mayor pérdida de nivel de inserción en hombres de  $4,1 \pm 2,1$  con respecto a mujeres  $2,7 \pm 1,0$ ; lo que sugiere que los individuos hombres presentan una mayor pérdida de nivel de inserción y posible mayor severidad de la enfermedad periodontal que las mujeres, aunque no estadísticamente significativa para este estudio.

**Tabla 5 Presencia de alelos en diferentes marcadores genéticos para pacientes con Enfermedad de Alzheimer y pacientes sanos**

Marcadores		Control		Caso		Total		P*
		n	%	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ (rs1799724)	C/C	27	67,5%	15	78,9%	42	71,2%	0,461
	T/T	1	2,5%	1	5,3%	2	3,4%	
	T/C	12	30,0%	3	15,8%	15	25,4%	
TNF- $\alpha$ (rs1800629)	A/A	1	2,5%	0	0,0%	1	1,7%	0,750
	G/G	31	77,5%	15	83,3%	46	79,3%	
	G/A	8	20,0%	3	16,7%	11	19,0%	
TNF- $\alpha$ (rs1800630)	C/C	27	69,2%	14	77,8%	41	71,9%	0,683
	C/A	1	2,6%	0	0,0%	1	1,8%	
	A/A	11	28,2%	4	22,2%	15	26,3%	
IL-6 (rs1800796)	G/G	28	68,3%	8	40,0%	36	59,0%	0,035
	G/C	13	31,7%	12	60,0%	25	41,0%	
IL-6 (rs2069827)	C/C	3	7,1%	2	10,0%	5	8,1%	0,001
	G/C	4	9,5%	10	50,0%	14	22,6%	
	G/G	35	83,3%	8	40,0%	43	69,4%	
TLR4 (rs4986790)	A/A	2	5,0%	0	0,0%	2	3,4%	0,624
	G/G	30	75,0%	14	77,8%	44	75,9%	
	G/A	8	20,0%	4	22,2%	12	20,7%	

\* Prueba Mann-Whitney

En la **tabla 5** se presenta la relación entre polimorfismos en genes de citoquinas y pacientes con EA y pacientes sanos. Se encontró que el 60 % de los casos con EA presentaron un genotipo heterocigoto G/C en el gen de la IL-6 (rs1800796) con respecto al 31,7% en pacientes sanos; Así mismo se encontró que el genotipo homocigoto G/G para el mismo gen, está presente en el 68.3% de los pacientes sin enfermedad de Alzheimer, con respecto a un 40 % en pacientes con enfermedad de Alzheimer, encontrándose un valor estadísticamente significativo de ( $p=0,035$ ).

Adicionalmente el 83.3 % de pacientes sanos presentaron un genotipo homocigoto G/G en gen de la IL-6 (rs2069827) con respecto al 40% en pacientes con enfermedad de Alzheimer, además se encontró en un 50 % la presencia del genotipo heterocigoto C/G en éstos pacientes con respecto a un 9.5 % en pacientes sin la enfermedad de Alzheimer, con un valor estadísticamente significativo ( $p=0,001$ ). Los demás genes de citoquinas

estudiadas no presentaros diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles.

**Tabla 6 Presencia de genotipos en diferentes marcadores genéticos según el nivel de severidad de la enfermedad periodontal.**

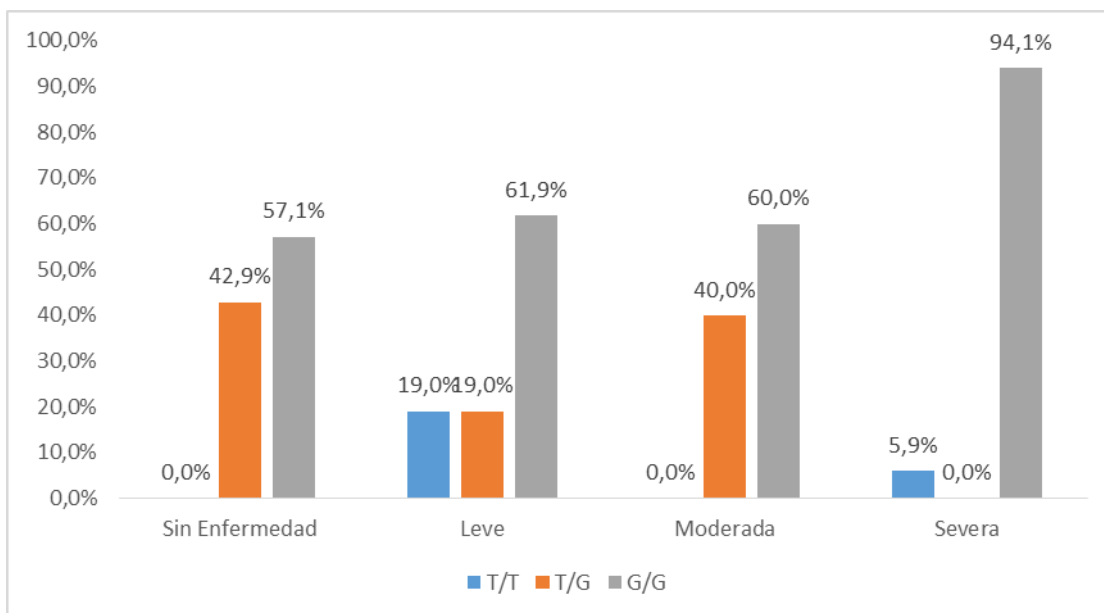
Marcadores		Sin enfermedad		Leve		Moderada		Severa		P*
		n	%	n	%	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ (rs1799724)	C/C	11	78,6%	12	66,7%	8	80,0%	11	64,7%	0,730
	T/T	1	7,1%	1	5,6%	0	0,0%	0	0,0%	
	T/C	2	14,3%	5	27,8%	2	20,0%	6	35,3%	
TNF- $\alpha$ (rs1800629)	A/A	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	6,3%	0,170
	G/G	12	85,7%	17	94,4%	8	80,0%	9	56,3%	
	G/A	2	14,3%	1	5,6%	2	20,0%	6	37,5%	
TNF- $\alpha$ (rs1800630)	C/C	9	69,2%	9	52,9%	8	80,0%	15	88,2%	0,323
	C/A	0	0,0%	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	
	A/A	4	30,8%	7	41,2%	2	20,0%	2	11,8%	
IL-6 (rs1800796)	G/G	8	57,1%	13	65,0%	7	70,0%	8	47,1%	0,611
	G/C	6	42,9%	7	35,0%	3	30,0%	9	52,9%	
IL-6 (rs2069827)	C/C	0	0,0%	4	19,0%	0	0,0%	1	5,9%	0,019
	C/G	6	42,9%	4	19,0%	4	40,0%	0	0,0%	
	G/G	8	57,1%	13	61,9%	6	60,0%	16	94,1%	
TLR-4 (rs4986790)	A/A	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	12,5%	0,235
	G/G	13	92,9%	13	72,2%	8	80,0%	10	62,5%	
	G/A	1	7,1%	5	27,8%	2	20,0%	4	25,0%	

\* Prueba Chi-cuadrado

En **la tabla 6** El marcador en el gen de la IL-6 (rs2069827) se asoció significativamente con la presencia y severidad a enfermedad periodontal en los pacientes estudiados. Aquellos pacientes con algún tipo de periodontitis (leve, moderada o severa), presentan el genotipo G/G de la IL-6 (rs2069827) en un (73%) en comparación con pacientes sin enfermedad periodontal (57.1%). Adicionalmente se encontró que el genotipo C/C no está presente en aquellos pacientes sin enfermedad periodontal, sin embargo, si está presente en pacientes con algún nivel de enfermedad periodontal, (p=0.019).

Al relacionar la presencia de marcadores genéticos con la severidad a enfermedad periodontal entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y pacientes sanos, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Por tanto, la presencia de marcadores genéticos en relación a la severidad de enfermedad periodontal es la misma en pacientes con Enfermedad de Alzheimer y pacientes sanos.

**Figura 1 Presencia del marcador genético de la IL-6 (rs2069827) según el nivel de severidad a la enfermedad periodontal. Nótese la presencia del 84 % del genotipo G/G en pacientes con periodontitis crónica severa.**



**Fuente: elaboración propia**

**Tabla 7 Presencia de polimorfismos genéticos según la historia de periodontitis**

Marcadores		No		Si		Total		P*
		n	%	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ (rs1799724)	C/C	11	84,6%	31	67,4%	42	71,2%	0,439
	T/T	0	0,0%	2	4,3%	2	3,4%	
	T/C	2	15,4%	13	28,3%	15	25,4%	
TNF- $\alpha$ (rs1800629)	A/A	0	0,0%	1	2,2%	1	1,7%	0,413
	G/G	12	92,3%	34	75,6%	46	79,3%	
	G/A	1	7,7%	10	22,2%	11	19,0%	
TNF- $\alpha$ (rs1800630)	C/C	6	46,2%	35	79,5%	41	71,9%	0,024
	C/A	1	7,7%	0	0,0%	1	1,8%	
	A/A	6	46,2%	9	20,5%	15	26,3%	
IL-6 (rs1800796)	G/G	10	71,4%	26	55,3%	36	59,0%	0,282
	G/C	4	28,6%	21	44,7%	25	41,0%	
IL-6 (rs2069827)	C/C	2	14,3%	3	6,3%	5	8,1%	0,050
	C/G	6	42,9%	8	16,7%	14	22,6%	
	G/G	6	42,9%	37	77,1%	43	69,4%	
TLR-4 (rs4986790)	A/A	0	0,0%	2	4,4%	2	3,4%	0,614
	G/G	11	84,6%	33	73,3%	44	75,9%	
	G/A	2	15,4%	10	22,2%	12	20,7%	

\* Prueba Chi-cuadrado

**En la tabla 7** se muestra que la presencia del genotipo C/C para el gen TNF- $\alpha$  (rs1800630) se presenta en un 79,5% en pacientes con historia de periodontitis frente a un 46,2% en pacientes sin periodontitis, con un valor ( $p= 0.02$  ). Adicionalmente se encontró la presencia de genotipo homocigoto G/G del gen de la IL-6 (rs2069827) en un 77,1 % en pacientes con historia de periodontitis frente a un 42,9% en pacientes sin historia de periodontitis; en éste mismo gen se encontró que el genotipo heterocigoto C/G está presente en un 42.9% en pacientes sin historia de periodontitis frente a 16,7% de pacientes con periodontitis, con un valor ( $p=0.05$ ).



### Estimación de riesgo para enfermedad periodontal

En la tabla 8 se presenta el parámetro estimado para cada una de las variables dependientes (B), su error estándar (E.T.), su significación con la prueba de Wald y las estimaciones de las odds ratio (Exp B). En éste primer modelo se involucran la variable Alzheimer y la presencia de marcadores genéticos; se realizó la selección de variables por el método de selección Forward. Se encontró que el único polimorfismo relacionado con la presencia de enfermedad periodontal en este estudio fue la IL-6 (rs2069827), Las demás variables no se encuentran asociadas a la enfermedad periodontal.

**Tabla 8 Estimación del modelo de regresión logística para la presencia/ausencia de enfermedad periodontal a través el método de selección Forward**

VARIABLES SELECCIONADAS	B	E.T.	Wald	gl	p	Exp(B)
IL-6 - 174 (rs2069827)						
(Ref: alelo G/G)			5,285	4	,259	
C/C	19,661	40192,969	,000	1	1,000	345507904,9
C/G	-2,098	,959	4,782	1	,029	,123

En éste modelo se encontró que los pacientes con el genotipo C/G en el marcador de la IL-6 (rs2069827) están expuestos con menor frecuencia a presentar enfermedad periodontal (odds=0,123) (p=0.029) comparados con los pacientes que tienen el genotipo G/G en el mismo gen. Este resultado podría sugerir que en la población estudiada el ser heterocigoto C/G para el gen de la IL-6 sería un factor protector en cuanto a la presencia de enfermedad periodontal; y el ser homocigoto G/G sería un factor de riesgo para desarrollar enfermedad periodontal para el mismo gen.

## 9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enfermedad de Alzheimer comparte ciertas características con la enfermedad periodontal. Ambas son enfermedades inflamatorias crónicas que se caracterizan por la producción de citoquinas pro-inflamatorias comunes en el desarrollo de su patogenia como el TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  entre otras.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología inflamatoria neurodegenerativa; según el informe mundial sobre Alzheimer en el año 2015, se estimó que más de 9.9 millones de personas padecen algún tipo de demencia debido a esta enfermedad<sup>112</sup>, así mismo, la enfermedad Periodontal es una enfermedad inflamatoria que causa destrucción de los tejidos de soporte y protección de los dientes, según el Estudio nacional en salud bucal IV del 2012; se reportó que alrededor del 50% de la población presenta algún tipo de enfermedad periodontal de forma generalizada.

El proceso de envejecimiento ha sido asociado con el deterioro de la salud física y mental, a la presencia de enfermedades inflamatorias crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, demencias como la enfermedad de Alzheimer y junto con éstas, la enfermedad periodontal<sup>113</sup>; éstas condiciones crónicas tienen en común que presentan factores de riesgo asociados al estilo de vida como tabaquismo, dieta rica en carbohidratos, sedentarismo, obesidad, hipertensión arterial entre otros, generando aumento de los marcadores inflamatorios sistémicos.

Se ha documentado que la prevalencia y la severidad de la enfermedad periodontal incrementan con la edad<sup>114</sup>; en este estudio la edad promedio de los pacientes con Alzheimer fue de  $84 \pm 8$  años y de los pacientes sin enfermedad de Alzheimer fue de  $64 \pm 9$  años, mostrando una diferencia significativa entre ambos grupos, a partir de la prueba no paramétrica Mann-Whitney ( $p=0.000$ ).

En el presente estudio se encontró que los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan menor cantidad de dientes y al mismo tiempo mayor cantidad de placa

bacteriana, mayor probabilidad de perder los dientes y por lo tanto aumento en la presencia de prótesis; éstos hallazgos son consistentes con lo reportado por Stein <sup>115</sup> quien describió la pérdida de dientes como uno de los factores de riesgo asociados con una mayor incidencia de demencia, adicionalmente se ha descrito que la periodontitis es el principal factor de riesgo de pérdida de dientes y su progresión de moderada a severa puede influir en el estado de la demencia relacionada <sup>116</sup>.

En el presente estudio, se encontró un nivel de inserción de  $3.4 \pm 1.8$  mm en los pacientes con enfermedad de Alzheimer y un  $2.8 \pm 1.2$  mm de nivel de inserción en los pacientes sin enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que los individuos con enfermedad de Alzheimer presentan una mayor pérdida de nivel de inserción y posible mayor severidad de la enfermedad periodontal con respecto a los individuos sin EA. Para este estudio no se encontró un valor estadísticamente significativo.

Un hallazgo interesante encontrado en éste estudio es que los pacientes con EA presentaron un porcentaje de índice de placa bacteriana de 38.6%, mientras que los pacientes sin enfermedad de Alzheimer el porcentaje de placa bacteriana fue menor 20.1% con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.003$ ). Consistente con lo reportado por Gitto y colaboradores <sup>117</sup> quienes reportan el impacto que tiene el déficit cognitivo y motor acompañado de una incapacidad gradual para realizar una higiene oral adecuada en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Así mismo la alteración cognitiva, la apatía y la apraxia en las etapas intermedias la enfermedad de Alzheimer son responsables del desinterés y la incapacidad para ejecutar técnicas de higiene oral adecuadas, permitiendo que los restos de alimentos y biofilm permanezcan acumulados en las áreas interproximales y cervicales de la dentición residual<sup>118</sup>.

Ha sido documentado que el biofilm constituye el factor de riesgo etiológico más importante en la iniciación y progresión de la periodontitis, <sup>119</sup> así mismo se ha descrito que los microorganismos patógenos tienen capacidad de inducir enfermedad periodontal mediante la transformación de la microbiota normal en una microbiota disbiótica<sup>120</sup>. En el presente estudio, la edad promedio de los pacientes con Alzheimer fue de  $84 \pm 8$  años y de

los pacientes sin enfermedad de Alzheimer fue de  $64 \pm 9$  años, mostrando una diferencia significativa entre ambos grupos, a partir de la prueba no paramétrica Mann-Whitney ( $p=0.000$ ). Según lo anterior, se ha documentado que en el proceso de envejecimiento el número de Neutrófilos (PMNs) no cambia con el aumento de la edad, pero si se genera cambios en la estructura de la membrana lipídica que sirve como plataforma para la transducción de la señales generando disminución en la degranulación y fagocitosis, adicionalmente los Neutrófilos (PMNs) de personas ancianas muestran una actividad incrementada de proteínas supresoras de señalización (SOCS) y disminución de receptores (CD16)<sup>121</sup> lo que puede explicar la disminución de la expresión de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) que conlleva a una disminución en la quimiotaxis, fagocitosis y actividad microbica,<sup>122</sup> comprometiendo una respuesta inmune más lenta y una extensión de periodontitis en pacientes ancianos.<sup>123</sup>

Al relacionar el sexo de los pacientes con factores ambientales como el consumo de alcohol y tabaco, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el consumo de alcohol, donde los hombres presentan un mayor consumo (36.4%) comparado con las mujeres (11.8%) ( $p=0.044$ ). El consumo de alcohol de manera crónica podría considerarse un indicador de riesgo independiente y modificable para la periodontitis. Se ha demostrado que la ingesta de alcohol de manera abusiva está asociada a un incremento de enfermedades infecciosas como la tuberculosis, la neumonía y hepatitis virales atribuible a los efectos en el sistema inmune<sup>124</sup>; además existe evidencia que respalda que el consumo de alcohol de forma crónica puede incrementar los niveles de pérdida de inserción y estar relacionada con mayor severidad a la periodontitis<sup>125, 126</sup>.

Una ingesta crónica de alcohol se ha asociado de forma positiva con un aumento en los niveles de placa bacteriana y sangrado gingival, asociado adicionalmente al deficiente cuidado oral que se presenta. Adicionalmente se ha documentado que el consumo crónico de alcohol afecta el sistema inmunológico produciendo reducción de la capacidad fagocítica, alteración de la quimiotaxis, disminución en la respuesta de las células T y células NK, adicionalmente afectan el metabolismo óseo y calidad en la cicatrización<sup>127</sup>

En nuestro estudio, se observa que los hombres manifiestan mayor presencia y severidad de enfermedad periodontal con respecto a las mujeres, en relación a los índices periodontales se encontró mayor pérdida de nivel de inserción en hombres de  $(4,1 \pm 2.1)$  con respecto a mujeres  $(2.7 \pm 1.0)$ ; lo que sugiere que los hombres presentan una mayor pérdida de nivel de inserción y posible mayor severidad de la enfermedad periodontal que las mujeres, éste hallazgo es consistente con lo reportado en la literatura, pues los datos reportados en el IV estudio nacional en salud bucal en Colombia, la pérdida de nivel clínico de inserción, tanto en extensión como en severidad son mayores en hombres con respecto a las mujeres con una severidad de pérdida de nivel de inserción clínica mayor a 5 mm en 2.59% de los hombres y 1.68% de las mujeres.<sup>128</sup>

Se ha descrito que los hombres acceden menos que las mujeres los servicios de salud, así mismo brindan menor información en cuanto a signos y síntomas de una enfermedad<sup>129</sup>. En la enfermedad periodontal, la preponderancia de los datos sugiere fuertemente que es el comportamiento de los hombres frente a su enfermedad y presencia de factores de riesgo modificables como el tabaquismo, calidad de higiene oral y no los déficits biológicos per se en cuanto al sexo es lo que los pone en mayor riesgo de formas más graves de enfermedad periodontal en comparación con mujeres<sup>130</sup>.

En nuestro estudio se encontró que el 36.4 % de los hombres son fumadores frente al 19.6 % en mujeres; consistente con lo descrito por Khan y colaboradores en 2016, en el que encontró que fumar estaba relacionado significativamente con el sexo masculino ( $p < 0.001$ )<sup>131</sup>. Es bien conocido que el tabaquismo es un factor de riesgo que se encuentra relacionado con mayor severidad y extensión en enfermedad periodontal, puesto que afecta la respuesta inmune del hospedero alterando la función de los neutrófilos, producción de anticuerpos, disminuyendo la actividad de los fibroblastos y los factores vasculares y aumento en la producción de mediadores inflamatorios<sup>132</sup>

En los últimos años, la epigenética ha jugado un papel importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas<sup>133</sup>; se ha documentado la relación que existe entre la severidad de la respuesta inflamatoria y la presencia de polimorfismos en genes de citoquinas inflamatorias y su relación con diversas enfermedades inflamatorias sistémicas;<sup>134 135</sup>. En la literatura se ha reportado que la presencia de polimorfismos en la región promotora en el gen de la IL-6 puede influir en la transcripción del gen y de ésta manera la cantidad circulante de esta potente citoquina proinflamatoria;<sup>136</sup> así mismo puede influir en el incremento de la proteína tau y placas beta amiloide en el cerebro, jugando un papel clave en la activación de la cascada neuroinflamatoria presente en la enfermedad de Alzheimer<sup>137</sup>.

En éste estudio se encontró que el genotipo G/G del gen de la IL-6 en la posición (-174) está presente con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad de Alzheimer comparados con los controles, presentando una diferencia estadísticamente significativa, lo que podría representar para la población estudiada que el ser homocigoto G/G en gen de la IL-6 en dicha posición podría constituir un factor protector para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Éste hallazgo es consistente con el resultado publicado por Licastro y colaboradores<sup>138</sup>, quienes reportaron niveles más bajos de IL-6 en plasma y en fragmentos tisulares cerebrales de pacientes italianos con enfermedad de Alzheimer homocigotos G/G comparados con pacientes sin enfermedad de Alzheimer. En nuestro estudio también se encontró que el genotipo G/C del gen de la citoquina IL-6 en la posición (-174) se presentó con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentando diferencia estadísticamente significativa comparado con los controles; lo que podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población estudiada; éste hallazgo también coincide con el informe de Licastro y colaboradores<sup>139</sup> quienes reportaron la presencia del Alelo C en la posición -174 en la región promotora del gen de la IL-6 un mayor riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

En un estudio de casos y controles publicado por Rasmussen y colaboradores<sup>140</sup> se evaluaron 200 casos y 165 controles con un 95% de población de origen caucásica, 2.5 % población japonesa y el restante 2.5 % no especificada. No encontraron relación estadísticamente significativa entre la presencia de polimorfismos en el gen de la IL-6 y enfermedad de Alzheimer de forma directa, sin embargo indicaron que la presencia del haplotipo compuesto por el alelo -174 G y el alelo -597 A presentaba una diferencia estadísticamente significativa con un valor de  $p= 0.0021$ , lo cual implicaría la posibilidad de sinergia de diferentes polimorfismos en diferentes regiones de un mismo gen que permite que se aumente o disminuya el riesgo de presentar una enfermedad.

En la revisión de la literatura se han encontrado resultados ambiguos en diferentes poblaciones; Han X y <sup>141</sup> realizaron una revisión sistemática con metanálisis donde incluyeron 14 estudios con 3769 casos y 9431 controles en población Caucásica, no encontraron una relación significativa de la presencia del polimorfismo en la IL-6 y el riesgo de presentar enfermedad de Alzheimer; sin embargo éste estudio sólo revisó la posición -174 del gen.

En el metanálisis realizado por Qi H y colaboradores <sup>142</sup> incluyeron también la posición -572 del gen de la IL-6; se analizaron 27 estudios con un total de 6.632 pacientes con Alzheimer y 12,503 Controles con población, caucásica y asiática, encontraron que la presencia del genotipo CC o GG en la posición -174 con genotipo CG en la posición -572 podría ser factores protectores en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Este estudio está en concordancia con nuestros resultados al evaluar la posición -174, dado que el genotipo G/G está asociado como un factor protector para el desarrollo de EA, sin embargo al evaluar la posición -572 no se encontraron hallazgos similares, pues en nuestro estudio el ser homocigoto G/G podría ser factor protector para el desarrollo de EA, mientras que ser heterocigoto G/C podría ser un factor de riesgo; por tanto es posible que al analizar los haplotipos se puedan encontrar más hallazgos diferenciales en la población colombiana con respecto a otras. Estos resultados contrarios pueden surgir a partir de los diferentes orígenes genéticos de las poblaciones estudiadas, por ejemplo, el alelo G del

polimorfismo de la IL-6 -572 C/G también tiene efectos protectores en el riesgo de EA en poblaciones chinas<sup>143</sup>, similar a lo encontrado en nuestro estudio, mientras que los resultados diferentes han sido informado en otras poblaciones.<sup>144</sup>

Con respecto a la presencia de enfermedad periodontal, en nuestro estudio se encontró que el 94.1% de pacientes con periodontitis crónica severa presentaron el genotipo homocigoto G/G en la IL-6 (rs2069827); éste hallazgo ha sido descrito por diversos estudios siendo consistente por lo descrito por Nibali y colaboradores<sup>145</sup>; quienes evaluaron genes en la región promotora de la IL-6 en 763 sujetos con periodontitis y 231 controles sanos de población Caucásica, Asiática y Negra; encontrando una asociación estadísticamente significativa ( $p= 0.044$ ) en sujetos de Origen Caucásico diagnosticados con periodontitis con presencia del genotipo G/G en la región -174 de la IL-6; sin embargo no encontraron asociación significativa en población Asiática y Negra.

Así mismo Brett y colaboradores evaluaron población caucásica de 57 casos con periodontitis crónica y 100 controles sin periodontitis, encontrando una asociación estadísticamente significativa ( $p= 0.008$ ) con la presencia de genotipo G/G en el gen la IL-6 en la posición -174; confirmado también por Trevilatto y colaboradores, quienes evaluaron 48 pacientes con periodontitis y 36 controles encontrando relación significativa en el gen de la IL-6 -174 en población Brasileña de origen caucásico;<sup>146</sup>

Por otro lado en un estudio de población brasileña publicado por Moreira y colaboradores<sup>147</sup> al evaluar 155 pacientes con periodontitis y 54 controles reportaron que la presencia del genotipo G/G en el gen de la IL-6 – 174 sería un factor protector para esta población ;estos reportes de la literatura establecen una asociación de riesgo positivo para el desarrollo de la enfermedad periodontal y la presencia del genotipo G/G de la IL-6 -174 en poblaciones caucásicas, confirmado en la población de éste estudio.

En el análisis de los genes (IL-6 -572, TNF- $\alpha$  -308, TLR-4) no se encontraron asociaciones significativas, excepto en el gen del TNF-  $\alpha$  en la posición -863, donde se encontró que el



genotipo C/C presenta relación estadísticamente significativa con la presencia de historia de periodontitis en los pacientes de este estudio. En un estudio realizado en población Japonesa se encontró la presencia del polimorfismo de este gen asociado a la presencia de periodontitis severa<sup>148</sup>, por otro lado en otro estudio de población japonesa no encontraron asociación significativa con la presencia de polimorfismos de éste gen relacionada con la periodontitis de aparición temprana<sup>149</sup>

## 10 CONCLUSIONES

- Primer estudio en Colombia en relacionar la presencia de polimorfismos en los genes de citoquinas y receptores de respuesta inmune TNF- $\alpha$ , IL-6 y TLR-4 con la severidad de la enfermedad periodontal en pacientes con enfermedad de Alzheimer.
- Pacientes con Enfermedad de Alzheimer presentan menor número de dientes al mismo tiempo mayor índice de placa bacteriana y mayor pérdida de inserción que los pacientes sin enfermedad de Alzheimer en la población estudiada.
- Los hombres incluidos en este estudio presentan mayor consumo de alcohol y tabaco, mayor pérdida de inserción y severidad de periodontitis comparados con las mujeres.
- El genotipo G/G del gen de la IL-6 en la posición (-174) se presentó con mayor frecuencia en los pacientes sin enfermedad de Alzheimer; lo cual podría ser un factor protector para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población incluida en éste estudio.
- El genotipo G/C del gen de la IL-6 en la posición (-174) se presentó con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad de Alzheimer lo que podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población estudiada.
- La presencia de genotipo heterocigoto C/G en el gen de la IL-6 -174 se encontró con mayor frecuencia en pacientes sin periodontitis, lo que podría sugerir ser un factor protector para el desarrollo de enfermedad periodontal en la población estudiada.

- La presencia del genotipo homocigoto G/G en el gen de la IL-6 -174 se encontró con mayor frecuencia en pacientes con periodontitis, lo que podría sugerir ser un factor riesgo para el desarrollo de enfermedad periodontal en la población estudiada.
- El genotipo C/C del gen TNF- $\alpha$  en la posición -863 se encontró una relación estadísticamente significativa con la presencia de historia de periodontitis en la población estudiada.
- Los genes de TNF- $\alpha$  en las posiciones -857, -308, el gen de la IL-6 -572 y TLR -4 no presentaron relaciones estadísticamente significativas en los pacientes evaluados en éste estudio.
- La evaluación de marcadores genéticos podrían ayudar a estimar el riesgo del desarrollo de enfermedad periodontal y enfermedad de Alzheimer en la población colombiana.
- La prevención y/o el tratamiento oportuno de la Periodontitis podrían controlar un factor de riesgo potencial para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

## 11 RECOMENDACIONES

- La utilización de marcadores genéticos en la población estudiada puede ser una herramienta para establecer el riesgo de presentar susceptibilidad, y a su vez poder generar estrategias de prevención.
- Es importante aumentar el tamaño de la muestra para ratificar o rechazar los resultados que fueron cercanos a la diferencia significativa
- El tratamiento y la prevención de la enfermedad periodontal es muy importante en pacientes con enfermedad de Alzheimer puesto que puede influir en su salud y calidad de vida.
- Los familiares y cuidadores de los individuos con enfermedad de Alzheimer requieren educación en salud oral continua para mantener los niveles de higiene oral óptimos que impidan la presencia y progresión de la periodontitis.
- Conocer el estado de salud oral de los adultos mayores son importantes para mejorar las políticas públicas de calidad de vida en esa población.

**12 EVIDENCIA DE RESULTADOS EN GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO, FORTALECIMIENTO DE LA CAPACIDAD CIENTÍFICA Y APROPIACIÓN SOCIAL DEL CONOCIMIENTO.**

<b>Aspecto</b>	<b>Resultado / Producto</b>	<b>Indicador</b>	<b>Beneficiario</b>
<b>Generación de nuevo conocimiento</b>	Relacionar la presencia de polimorfismos genéticos en los genes de respuesta inmune (IL-6, TNF- $\alpha$ TLR-4) con la severidad de la enfermedad periodontal en pacientes con enfermedad de Alzheimer	Elaboración de artículo científico que analice polimorfismos en genes de citoquinas asociadas a respuesta inmune presentes en ambas patologías comparados con la respuesta en la población estudiada sana.	Comunidad académica.
	Conocer el estado de salud oral de los adultos mayores para mejorar las políticas públicas de calidad de vida en esa población	Elaboración de Estudio Nacional de Salud Oral enfocado en la población adulta mayor.	Comunidad académica.
	Generar nuevo conocimiento en la determinación de prevalencia de riesgo o protección para las dos enfermedades en la población Colombiana	Elaboración de artículo científico que analice polimorfismos en genes de citoquinas asociadas a respuesta inmune presentes en ambas patologías comparados con la respuesta en la población estudiada sana en Colombia.	Comunidad académica.

<b>Fortalecimiento de la comunidad científica</b>	Formación de recurso humano en el posgrado de periodoncia mediante la realización del proyecto de grado para el fortalecimiento de comunidad científica nacional	Trabajo de grado para obtención del título de especialista en Periodoncia.	Residente de especialización clínica en Periodoncia.  Comunidad universitaria
	Divulgación del proyecto de grado en eventos como el Seminario Anual de la Asociación Colombiana de Periodoncia y Oseointegración (ACPO) y en el foro investigación de la UAM	Socialización de los resultados en la ACPO y en el foro de investigación de la UAM	Profesionales en periodoncia  Comunidad universitaria
<b>Apropiación social del conocimiento</b>	Divulgación y apropiación del conocimiento para la comunidad en general que contribuya a la adquisición de hábitos de vida permitiendo la prevención de la enfermedad periodontal.		Población que pueda ser susceptible a desarrollar enfermedad de Alzheimer.
	Creación de protocolos y guías de manejo periodontal para los pacientes con enfermedad de Alzheimer o con riesgo a padecerla		Profesionales de la salud.  Población con enfermedad de Alzheimer y población que pueda ser susceptible a desarrollar enfermedad de Alzheimer.

### 13 IMPACTOS LOGRADOS

<b>Impacto logrado</b>	<b>Plazo (años)*</b>	<b>Identificador verificable</b>	<b>Supuestos **</b>
Ampliar el conocimiento etiológico de la relación que existe entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad periodontal y polimorfismos en genes y receptores de respuesta inmune.	1 – 4 años Corto Plazo	Publicación artículo científico. Revista nacional o internacional.	
Contribuir a la prevención de estados inflamatorios en pacientes con enfermedad de Alzheimer mediante la aplicación de guías de manejo interdisciplinario que involucre la terapia y el mantenimiento de la enfermedad periodontal.	5 – 9 años Mediano plazo		
Contribuir al desarrollo de la medicina personalizada mediante el hallazgo de posibles blancos terapéuticos	10 años Largo plazo		

## 14 ANEXOS

### 14.1 ANEXO 1

#### **Consentimiento informado.**

*“Patógenos periodontales y su asociación con los procesos inflamatorios en Enfermedad de Alzheimer (EA)”*

#### **OBJETIVO:**

Determinar la asociación entre la presencia de patógenos periodontales con procesos inflamatorios en una muestra de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos.

#### **JUSTIFICACIÓN:**

La evaluación neurocognitiva nos permitirá conocer si usted está sano o tiene la enfermedad de Alzheimer y que tan adelantada está y así podremos clasificarlo en alguno de los dos grupos de estudio que tenemos.

El examen periodontal nos permitirá conocer si usted está sano o presenta algún grado de enfermedad en sus encías.

Con el análisis genético de la muestra de sangre podremos identificar genes de respuesta inmune asociados a inflamación en EA, con el fin de aportar al conocimiento que se tiene de la enfermedad y tener una referencia para futuras investigaciones.



### **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:**

Si usted acepta participar, se le tomará una encuesta con algunos datos personales, se le realizará una evaluación neurocognitiva por medio de una serie de pruebas que evalúan diferentes capacidades del cerebro por medio de preguntas y ejercicios simples, posteriormente se realizará un examen del estado de sus encías y por último, se extraerá una muestra de sangre de aproximadamente 10ml, finalmente, haremos un análisis genético de la muestra de sangre para analizar la variación en la expresión de sus genes.

### **RIESGOS:**

El siguiente trabajo supone riesgo bajo para los participantes del estudio al momento de tomar la muestra de sangre.

- Sangrado excesivo
- Desmayo o sensación de mareo
- Inflamación local (flebitis)
- Infección local

### **BENEFICIOS:**

Con su participación, se busca conocer mejor la relación existente entre la enfermedad de las encías y la enfermedad de Alzheimer, ya que es posible que las bacterias que producen inflamación en la encía sean un factor de riesgo para sufrir enfermedad de Alzheimer.

No se trata de un estudio terapéutico, por lo tanto, no existe compromiso de realizar un tratamiento. Usted no recibirá beneficios económicos por la participación en esta investigación.

### **AUTORIZACIÓN PARA USO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO:**


Usted autoriza que los datos obtenidos en este estudio puedan ser utilizados en futuras comparaciones con nuevas bases de datos obtenidos en otros estudios; todo dentro de la

absoluta confidencialidad y previa Aprobación del Comité de Bioética de investigación de la Universidad Autónoma de Manizales para la realización de dichos estudios.

## 14.2 ANEXO 2

Registro de Periodontograma online. [www.periotools.com](http://www.periotools.com) Departmet of periodontology Periodontal chart Universitat Bern. Periodontal chart online.

**zmk bern**  
 Zahnmedizinische Kliniken  
 der Universität Bern

  
 UNIVERSITÄT  
 BERN

**Departamento de Periodoncia**  
**Periodontograma**

Fecha

Apellido del paciente 
 Nombre 
 Fecha de nacimiento

Examen inicial
  Reevaluación
  Clínico

	16	17	18	19	14	15	12	13	21	22	23	24	25	26	27	28
Moilidad																
Implante																
Furca																
Sangrado al sondaje																
Placa																
Margen gingival																
Profundidad de sondaje																

**Bucal**

**Palatino**

	16	17	18	19	14	15	12	13	21	22	23	24	25	26	27	28
Margen gingival																
Profundidad de sondaje																
Placa																
Sangrado al sondaje																
Furca																
Nota																

Medida de prof. de sondaje = 0 mm    Medida de nivel de inserción = 0 mm    0% Placa    0% Sangrado al sondaje

	16	17	18	19	14	15	12	13	21	22	23	24	25	26	27	28
Nota																
Furca																
Sangrado al sondaje																
Placa																
Margen gingival																
Profundidad de sondaje																

**Lingual**

**Bucal**

	16	17	18	19	14	15	12	13	21	22	23	24	25	26	27	28
Margen gingival																
Profundidad de sondaje																
Placa																
Sangrado al sondaje																
Furca																
Implante																
Moilidad																

www.periotools.com    Copyright © 2010 by Department of Periodontology, University of Bern, Switzerland

## 15 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup>Prince, M. J. (2015). World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends.
- <sup>2</sup>Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8), 523-532.
- <sup>3</sup>de Sánchez, C. R., Nariño, D., & Cerón, J. F. M. (2010). Epidemiología y carga de la Enfermedad de Alzheimer. vol, 26, 87-94.
- <sup>4</sup>Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... & Jorm, A. (2006). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet*, 366(9503), 2112-2117.
- <sup>5</sup>Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... & Jorm, A. (2006). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet*, 366(9503), 2112-2117.
- <sup>6</sup>Prada, S. I., Takeuchi, Y., & Ariza, Y. (2014). Monetary cost of treatment for Alzheimer's disease in Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(4), 247-255.
- <sup>7</sup>Ministerio de salud y protección Social (2013) IV Estudio Nacional de Salud bucal ENSAB IV .
- <sup>8</sup>Peñaloza, R.E., Suárez, E., Palacio Y. (2014). Estudio Nacional en Salud Bucal (ENSAB IV). Bogotá: Ministerio de Salud y Centro Nacional de Consultoría CNC.
- <sup>9</sup>Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease .*Biological psychiatry*, 68(10), 930-941.
- <sup>10</sup>Cerajewska, T. L., Davies, M., & West, N. X. (2015). Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. *British dental journal*, 218(1), 29-34.
- <sup>11</sup>Nakanishi, H., & Wu, Z. (2015). The downward spiral of periodontitis and diabetes in Alzheimer' s disease: Extending healthy life expectancy through oral health. *Journal of Oral Biosciences*, 57(3), 139-142.
- <sup>12</sup>Ritchie, C. S. (2007). Obesity and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 44(1), 154-163.
- <sup>13</sup>Scannapieco, F. A., Bush, R. B., & Paju, S. (2003). Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8(1), 38-53.
- <sup>14</sup>Kshirsagar, A. V., Moss, K. L., Elter, J. R., Beck, J. D., Offenbacher, S., & Falk, R. J. (2005). Periodontal disease is associated with renal insufficiency in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *American journal of kidney diseases*, 45(4), 650-657.
- <sup>15</sup>Cerajewska, T. L., Davies, M., & West, N. X. (2015). Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. *British dental journal*, 218(1), 29-34.
- <sup>17</sup>Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Zambon J, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*. 1995; 66:23–29. [PubMed: 7891246]

- 
- <sup>18</sup>Tanner, A., et al. "Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis." *Journal of clinical periodontology* 25.2 (1998): 85-98.
- <sup>19</sup>Amano, Atsuo. "Host–parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity." *Periodontology 2000* 54.1 (2010): 9-14.
- <sup>20</sup>Brown, L. Jackson, and HaraldLöe. "Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease." *Periodontology 2000* 2.1 (1993): 57-71.
- <sup>21</sup>IV Estudio Nacional de Salud Bucal - ENSAB IV. Ministerio de Salud Colombia. Situación en Salud Bucal. Bogotá, 2014.
- <sup>22</sup>ROY, C., and S. KORNMAN KENNETH. "The pathogenesis of human periodontitis: an introduction." *Periodontology* 14.1997 (2004): 9-11.
- <sup>23</sup>ROY, C., and S. KORNMAN KENNETH. "The pathogenesis of human periodontitis: an introduction." *Periodontology* 14.1997 (2004): 9-11.
- <sup>24</sup>Chung, H. Y., et al. "Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases." *Journal of dental research* 90.7 (2011): 830-840.
- <sup>25</sup>Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97: 1634–1658.
- <sup>26</sup>Closa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004; 56: 185– 191.
- <sup>27</sup>Chapple IL. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *ClinMolPathol* 1996; 49: M247–M255.
- <sup>28</sup>Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 2012; 91: 914–920.
- <sup>29</sup>Papapanou, Panos N. "Periodontal diseases: epidemiology." *Annals of Periodontology* 1.1 (1996): 1-36.
- <sup>30</sup>Ministerio de protección Social “IV estudio Nacional en Salud Bucal ENSAB-IV” (2013-2014).
- <sup>31</sup>Schafer I, von Leitner EC, Schon G, Koller D, Hansen H, Kolonko T, Kaduszkiewicz H, Wegscheider K, Glaeske G, van den Bussche H. Multimorbidity patterns in the elderly: a new approach of disease clustering identifies complex interrelations between chronic conditions. *PLoS ONE* 2010; 5: e15941.
- <sup>32</sup>Darveau, Richard P. "Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis." *Nature Reviews Microbiology* 8.7 (2010): 481-490.
- <sup>33</sup>Hajishengallis, George. "Aging and its impact on innate immunity and inflammation: implications for periodontitis." *Journal of Oral Biosciences* 56.1 (2014): 30-37.
- <sup>34</sup>Fransson, C., T. Berglundh, and J. Lindhe. "The effect of age on the development of gingivitis." *Journal of clinical periodontology* 23.4 (1996): 379-385.

- 
- <sup>35</sup>Tsalikis, L., Parapanisiou, E., Bata-Kyrkou, A., Polymenides, Z., & Konstantinidis, A. (2002). Crevicular fluid levels of interleukin-1alpha and interleukin-1beta during experimental gingivitis in young and old adults. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 4(1), 5.
- <sup>36</sup>Weng NP. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* (2006);24:495–9.
- <sup>37</sup> Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans.
- <sup>38</sup>Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, Stella I, Antonaci S. "Age-related impairment of GM-CSF induced signaling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins." *Ageing Res Rev* (2007);6:81–93.
- <sup>39</sup> Fortin CF, Lesur O, Fulop Jr. T. Effects of aging on triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1-induced PMN functions. *FEBS Lett* (2007) ;581: 1173–8.
- <sup>40</sup>Solana, Rafael, et al. "Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans." *Seminars in immunology*. (2012) Vol. 24. No. 5. Academic Press
- <sup>41</sup>Mahbub, Shegufta, Aleah L Brubaker, and Elizabeth J Kovacs. "Aging of the innate immune system: an update." *Current immunology reviews* 7.1 (2011): 104-115.
- <sup>42</sup> Singh T, Newman AB. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 319–329.
- <sup>43</sup>Agrawal, Anshu, et al. "Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA." *The Journal of Immunology* 182.2 (2009): 1138-1145.
- <sup>44</sup> Scannapieco, F. A. (1998). Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *Journal of periodontology*, 69(7), 841.
- <sup>45</sup> Grau, A. J., Becher, H., Ziegler, C. M., Lichy, C., Buggle, F., Kaiser, C., ... & Dörfer, C. E. (2004). Periodontal disease as a risk factor for ischemic stroke. *Stroke*, 35(2), 496-501.
- <sup>46</sup> Wu, T., Trevisan, M., Genco, R. J., Dorn, J. P., Falkner, K. L., & Sempos, C. T. (2000). Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Archives of Internal Medicine*, 160(18), 2749-2755.
- <sup>47</sup> Scher, J. U., Bretz, W. A., & Abramson, S. B. (2014). Periodontal Disease and Subgingival Microbiota as Contributors for RA Pathogenesis: Modifiable Risk Factors?. *Current opinion in rheumatology*, 26(4), 424.
- <sup>48</sup> Otomo-Corgel, J., Pucher, J. J., Rethman, M. P., & Reynolds, M. A. (2012). State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 12(3), 20-28.
- <sup>49</sup> Garcia, R. I., Henshaw, M. M., & Krall, E. A. (2001). Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontology* 2000, 25(1), 21-36.
- <sup>50</sup> Wehmeyer, M. M., Kshirsagar, A. V., Barros, S. P., Beck, J. D., Moss, K. L., Preisser, J. S., & Offenbacher, S. (2013). A randomized controlled trial of intensive periodontal therapy on metabolic and inflammatory markers in patients With ESRD: results of an exploratory study. *American Journal of Kidney Diseases*, 61(3), 450-458.

- 
- <sup>51</sup> Hasturk, H., & Kantarci, A. (2015). Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontology 2000*, 69(1), 255-273.
- <sup>52</sup> Stein, Pamela Sparks, et al. "Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease." *Alzheimer's & Dementia* 8.3 (2012): 196-203.
- <sup>53</sup> Querfurth H W, LaFerla F M. Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 2010; 362: 329–344.
- <sup>54</sup> Alzheimer's, A. (2015). 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 11(3), 332.
- <sup>55</sup> Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, 68(10), 930-941.
- <sup>56</sup> Cerajewska, T. L., Davies, M., & West, N. X. (2015). Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. *British dental journal*, 218(1), 29-34.
- <sup>57</sup> Gatz M, Mortimer J A, Fratiglioni L et al. Potentially modifiable risk factors for dementia in identical twins. *Alzheimers Dement* 2006; 2: 110–117.
- <sup>58</sup> Hamer M, Chida Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol Med* 2009; 39: 3–11.
- <sup>59</sup> Anstey K J, Mack H A, Cherbuin N. Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am J Geriatr Psychiatry* 2009; 17: 542–555.
- <sup>60</sup> Sundstrom A, Nilsson L G, Cruts M, Adolfsson R, Van Broeckhoven C, Nyberg L. Increased risk of dementia following mild head injury for carriers but not for non-carriers of the APOE epsilon4 allele. *Int Psychogeriatrics* 2007; 19: 159–165.
- <sup>61</sup> Cerajewska, T. L., M. Davies, and N. X. West. "Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease." *British dental journal* 218.1 (2015): 29-34.
- <sup>62</sup> Kamer, A. R., Pirraglia, E., Tsui, W., Rusinek, H., Vallabhajosula, S., Mosconi, L., ... & Linker, R. (2015). Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiology of aging*, 36(2), 627-633.
- <sup>63</sup> Kamer, A. R., Craig, R. G., Dasanayake, A. P., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L., & de Leon, M. J. (2008). Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's & Dementia*, 4(4), 242-250.
- <sup>64</sup> American Association of Periodontology. *Glossary of periodontal terms*. Chicago, Illinois, USA: American Academy of Periodontology, 2001.
- <sup>65</sup> Abbayya, K., Puthanakar, N. Y., Naduwinmani, S., & Chidambar, Y. S. (2015). Association between periodontitis and Alzheimer's disease. *North American journal of medical sciences*, 7(6), 241.
- <sup>66</sup> Wu, Z., & Nakanishi, H. (2014). Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *Journal of pharmacological sciences*, 126(1), 8-13.
- <sup>67</sup> Kaye, E. K., Valencia, A., Baba, N., Spiro, A., Dietrich, T., & Garcia, R. I. (2010). Tooth loss and

---

periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *Journal of the American Geriatrics Society*, 58(4), 713-718.

<sup>68</sup> Farhad, S. Z., Amini, S., Khalilian, A., Barekatin, M., Mafi, M., Barekatin, M., & Rafei, E. (2014). The effect of chronic periodontitis on serum levels of tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer disease. *Dental research journal*, 11(5), 549.

<sup>69</sup> Stein, P. S., Steffen, M. J., Smith, C., Jicha, G., Ebersole, J. L., Abner, E., & Dawson, D. (2012). Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 8(3), 196-203.

<sup>70</sup> Watts, A., Crimmins, E. M., & Gatz, M. (2008). Inflammation as a potential mediator for the association between periodontal disease and Alzheimer's disease.

<sup>71</sup> Cicciu M, Maticena G, Signorino F, Brugaletta A, Cicciu A, Bramanti E. Relationship between oral health and its impact on the quality life of Alzheimer's disease patients: a supportive care trial. *Int J ClinExp Med* 2013; 6: 766–772.

<sup>72</sup> Noble J M, Borrell L N, Papapanou P N, Elkind M S, Scarmeas N, Wright C B. Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J NeurolNeurosurg Psych* 2009; 80: 1206–1211.

<sup>73</sup> Tomas I, Diz P, Tobias A, Scully C, Donos N. Periodontal health status and bacteremia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 213–228.

<sup>74</sup> Zhang W, Daly C G, Mitchell D, Curtis B. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 41–52.

<sup>75</sup> Rivera M F, Lee J Y, Aneja M et al. Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE(null) mice. *PloS one* 2013; 8: e57178.

<sup>76</sup> Gurav, Abhijit N. "Alzheimer's disease and periodontitis-an elusive link." *Revista da Associação Médica Brasileira* 60.2 (2014): 173-180.

<sup>77</sup> Poole S, Singhrao S K, Kesavalu L, Curtis M A, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis* 2013; 36: 665–677.

<sup>78</sup> Riviere G R, Riviere K H, Smith K S. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 113–118.

<sup>79</sup> Loos B G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76: 2106–2115.

<sup>80</sup> Amar S, Han X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Int Med J Exp Clin Res* 2003; 9: RA291–299.

<sup>81</sup> Watts A, Crimmins E M, Gatz M. Inflammation as a potential mediator for the association between periodontal disease and Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008; 4: 865–876.

<sup>82</sup> Rioboo Crespo, M., and A. Bascones. "Factores de riesgo de la enfermedad periodontal: factores genéticos." *Avances en Periodoncia e Implantología Oral* 17.2 (2005): 69-77.

- 
- <sup>83</sup> Rocha D, Gut I, Jeffreys AJ, Kwok PY, Brookes AJ, Chanock SJ. Seventh international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis: \_ever bigger scans and an increasingly variable genome\_. *Hum Genet* 2006; 4: 451–456.
- <sup>84</sup> Zhang, J., Sun, X., Xiao, L., Xie, C., Xuan, D., & Luo, G. (2011). Gene polymorphisms and periodontitis. *Periodontology* 2000, 56(1), 102-124.
- <sup>85</sup> KornmaKS, diGiovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 327-38.
- <sup>86</sup> Zhang, J., Sun, X., Xiao, L., Xie, C., Xuan, D., & Luo, G. (2011). Gene polymorphisms and periodontitis. *Periodontology* 2000, 56(1), 102-124.
- <sup>87</sup> Mori Y, Yoshimura A, Ukai T et al. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 54–58.
- <sup>88</sup> Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987–995.
- <sup>89</sup> Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300: 1524–1525.
- <sup>90</sup> Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186:1522–1525.
- <sup>91</sup> Reismann, P., Lichy, C., Rudofsky, G., Nawroth, P. P., Staehle, H. J., Bierhaus, A., & Dorfer, C. E. (2007). TLR4-polymorphisms and the risk of chronic periodontitis. *Perio*, 4, 41-45.
- <sup>92</sup> Schröder, N. W. J., Meister, D., Wolff, V., Christan, C., Kaner, D., Haban, V., & Schumann, R. R. (2005). Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. *Genes and immunity*, 6(5), 448-451.
- <sup>93</sup> Lona, J. M. F., Martínez, M. S., Alarcón, G. V., Rodas, A. B., & Bello, J. R. (2013). El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 149(5), 521-530.
- <sup>94</sup> Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *ClinSci (Lond)*. 2009;116:219-30.
- <sup>95</sup> Kamer, A. R., Craig, R. G., Pirraglia, E., Dasanayake, A. P., Norman, R. G., Boylan, R. J., & de Leon, M. J. (2009). TNF- $\alpha$  and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *Journal of neuroimmunology*, 216(1), 92-97.
- <sup>96</sup> Koss, K., Satsangi, J., Fanning, G. C., Welsh, K. I. & Jewell, D. P. (2000) Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes and Immunity* 1, 185–190.
- <sup>97</sup> Ding, C., Ji, X., Chen, X., Xu, Y., & Zhong, L. (2014). TNF- $\alpha$  gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *Journal of clinical periodontology*, 41(8), 748-759.



- 
- <sup>98</sup>Schulz, S., Schlitt, A., Lutze, A., Lischewski, S., Seifert, T., Dudakliwa, T., ... & Schaller, H. G. (2012). The importance of genetic variants in TNF $\alpha$  for periodontal disease in a cohort of coronary patients. *Journal of clinical periodontology*, 39(8), 699-706.
- <sup>99</sup>Eriksson UK, Pedersen N, Reynolds CA, Hong MG, Prince JA, et al. (2011) Associations of gene sequence variation and serum levels of C-reactive protein and interleukin-6 with Alzheimer's disease and dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*. 23: 1-3.
- <sup>100</sup> Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *AdvImmunol*1993;54:1-78.
- <sup>101</sup> Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D\_Aiuto F, Tonetti M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005; 12: 1149-1153.
- <sup>102</sup>Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis *JPeriodontol* 2004; 1: 30-36.
- <sup>103</sup> Wang, T. (2015). TNF-alpha G308A Polymorphism and the Susceptibility to Alzheimer's Disease: An Updated Meta-analysis. *Archives of medical research*,46(1), 24-30.
- <sup>104</sup> Ding, C., Ji, X., Chen, X., Xu, Y., &Zhong, L. (2014). TNF- $\alpha$  gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *Journal of clinical periodontology*, 41(8), 748-759.
- <sup>105</sup>Smith, Joshua A., et al. "Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases." *Brain research bulletin* 87.1 (2012): 10-20.
- <sup>106</sup>Gemmell, Erica, Roderick I. Marshall, and Gregory J. Seymour. "Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease." *Periodontology* 2000 14.1 (1997): 112-143.
- <sup>107</sup> Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*, 4(1), 1-6
- <sup>108</sup> Armitage, Gary C. "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." *Annals of periodontology* 4.1 (1999): 1-6.
- <sup>109</sup> Armitage, Gary C. "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." *Annals of periodontology* 4.1 (1999): 1-6.
- <sup>110</sup> Armitage, Gary C. "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." *Annals of periodontology* 4.1 (1999): 1-6.
- <sup>111</sup> Ayçaguer, L. C. S. (1994). *Excursión a la regresión logística en ciencias de la salud*. Ediciones Díaz de Santos.
- <sup>112</sup>Prince, M. J. (2015). *World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends*.
- <sup>113</sup> Reynolds, M. A. (2014). Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontology* 2000, 64(1), 7-19.
- <sup>114</sup> Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Thornton-Evans, G. O., & Genco, R. J. (2012). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of dental research*, 91(10), 914-920.

- 
- <sup>115</sup> Stein, P. S., Desrosiers, M., Donegan, S. J., Yepes, J. F., & Kryscio, R. J. (2007). Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. *The Journal of the American Dental Association*, 138(10), 1314-1322.
- <sup>116</sup> Al-Shammari, K. F., Al-Khabbaz, A. K., Al-Ansari, J. M., Neiva, R., & Wang, H. L. (2005). Risk indicators for tooth loss due to periodontal disease. *Journal of periodontology*, 76(11), 1910-1918.
- <sup>117</sup> Gitto, C. A., Moroni, M. J., Terezhalmay, G. T., & Sandu, S. (2001). The patient with Alzheimer's disease. *Quintessence International*, 32(3).
- <sup>118</sup> Hatipoglu, M. G., Kabay, S. C., & Güven, G. (2011). The clinical evaluation of the oral status in Alzheimer-type dementia patients. *Gerodontology*, 28(4), 302-306.
- <sup>119</sup> Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2006). Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontology 2000*, 42(1), 7-12.
- <sup>120</sup> Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409-419.
- <sup>121</sup> Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phago- cytic capacity and CD16 expression in elderly humans.
- <sup>122</sup> Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, Stella I, Antonaci S. "Age- related impairment of GM-CSF induced signaling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins .Ageing Res Rev (2007);6:81–93.
- <sup>123</sup> Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Thornton-Evans, G. O., & Genco, R. J. (2012). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of dental research*, 91(10), 914-920.
- <sup>124</sup> Romeo, J., Wärnberg, J., & Marcos, A. (2010). Drinking pattern and socio-cultural aspects on immune response: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 341-346.
- <sup>125</sup> Amaral, C. D. S. F., Luiz, R. R., & Leão, A. T. T. (2008). The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *Journal of periodontology*, 79(6), 993-998.
- <sup>126</sup> Pitiphat, W., Merchant, A. T., Rimm, E. B., & Joshipura, K. J. (2003). Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of dental research*, 82(7), 509-513.
- <sup>127</sup> Ruiz-Magaz, V., Pascual, A., Violant, D., Bertos, N., & Santos, A. (2009). Efecto del alcohol en los tejidos de la cavidad oral. Relación con la periodontitis y periimplantitis: una revisión de la literatura. *Periodoncia y Osteointegración*, 19(2), 139-144.
- <sup>128</sup> Ministerio de salud y protección Social (2013) IV Estudio Nacional de Salud bucal ENSAB IV .
- <sup>129</sup> Galdas, P. M., Cheater, F., & Marshall, P. (2005). Men and health help-seeking behaviour: literature review. *Journal of advanced nursing*, 49(6), 616-623.
- <sup>130</sup> Haytac, M. C., Ozcelik, O., & Mariotti, A. (2013). Periodontal disease in men. *Periodontology 2000*, 61(1), 252-265
- <sup>131</sup> Khan, S., Khalid, T., & Awan, K. H. (2016). Chronic periodontitis and smoking Prevalence and dose-response relationship. *Saudi medical journal*, 37(8), 889.

- 
- <sup>132</sup> Johnson, G. K., & Guthmiller, J. M. (2007). The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontology* 2000, 44(1), 178-194.
- <sup>133</sup> Úbeda, F., & Wilkins, J. F. (2008). Imprinted genes and human disease: an evolutionary perspective. In *Genomic imprinting* (pp. 101-115). Springer, New York, NY.
- <sup>134</sup> Wielińska, J., Dratwa, M., Świerkot, J., Korman, L., Iwaszko, M., Wysoczańska, B., & Bogunia-Kubik, K. (2018). IL-6 gene polymorphism is associated with protein serum level and disease activity in Polish patients with rheumatoid arthritis. *HLA*.
- <sup>135</sup> Fathy, S. A., Mohamed, M. R., Ali, M. A., EL-Helaly, A. E., & Alattar, A. T. (2018). Influence of IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  genetic variants on susceptibility to diabetic kidney disease in type 2 diabetes mellitus patients. *Biomarkers*, (just-accepted), 1-38.
- <sup>136</sup> Kalburgi, N. B., Bhatia, A., Bilichodmath, S., Patil, S. R., Mangalekar, S. B., & Bhat, K. (2010). Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *Journal of oral science*, 52(3), 431-437.
- <sup>137</sup> Su, F., Bai, F., & Zhang, Z. (2016). Inflammatory cytokines and Alzheimer's disease: a review from the perspective of genetic polymorphisms. *Neuroscience bulletin*, 32(5), 469-480.
- <sup>138</sup> Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, Martina C, Olivieri F, L, et al. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging* 2003, 24: 921-926
- <sup>139</sup> Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, Martina C, Olivieri F, L, et al. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging* 2003, 24: 921-926
- <sup>140</sup> Rasmussen, L., Delabio, R., Horiguchi, L., Mizumoto, I., Terazaki, C. R., Mazzotti, D., ... & Kawamata, C. (2013). Association between interleukin 6 gene haplotype and Alzheimer's disease: a Brazilian case-control study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(4), 733-738.
- <sup>141</sup> Han XM, Wang CH, Sima X, Liu SY (2011) Interleukin-6-174G/C polymorphism and the risk of Alzheimer's disease in Caucasians: A metaanalysis. *Neurosci Lett*. 504(1): 4-8.
- <sup>142</sup> Qi, H. P., Qu, Z. Y., Duan, S. R., Wei, S. Q., Wen, S. R., & Bi, S. (2012). IL-6-174 G/C and-572 C/G polymorphisms and risk of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(6), e37858.
- <sup>143</sup> He MX, Yang WL, Zhang MM, Lian YJ, Hua HY, Zeng JS, et al. Association between interleukin-6 gene promoter -572C/G polymorphism and the risk of sporadic Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 2010, 31: 165-168
- <sup>144</sup> Eriksson UK, Pedersen NL, Reynolds CA, Hong MG, Prince JA, Gatz M, et al. Associations of gene sequence variation and serum levels of C-reactive protein and interleukin-6 with Alzheimer's disease and dementia. *J Alzheimers Dis* 2011, 23: 361-369.
- <sup>145</sup> Nibali, L., D'aiuto, F., Donos, N., Griffiths, G. S., Parkar, M., Tonetti, M. S., ... & Brett, P. M. (2009). Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine*, 45(1), 50-54.

---

<sup>146</sup> P. C. Trevilatto, R. M. Scarel-Caminaga, R. B. de Brito Jr., A. P. de Souza, and S. R. P. Line, "Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 30, no. 5, pp. 438–442, 2003

<sup>147</sup> Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, Gollob KJ, Dutra WO. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol* 2007; 1: 119–126

<sup>148</sup> Soga, Y., Nishimura, F., Ohya, H., Maeda, H., Takashiba, S., & Murayama, Y. (2003). Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF- $\alpha$ )- 1031/- 863,- 857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *Journal of clinical periodontology*, 30(6), 524-531.

<sup>149</sup> Endo, M., Tai, H., Tabeta, K., Kobayashi, T., Yamazaki, K., & Yoshie, H. (2001). Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology*, 72(11), 1554-1559.