



**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PERIODONTALES Y NIVELES DE
CITOQUINAS IL-10, IL-6, IL-17 EN PLASMA DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES SANOS**

AUTORES:

MARÍA ALEJANDRA GUTIÉRREZ URIBE

MARÍA ALEJANDRA HINCAPIÉ GIRALDO

JACOBO GONZÁLEZ ARANGO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

POSGRADO EN PERIODONCIA

MANIZALES

2019

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PERIODONTALES Y NIVELES DE
CITOQUINAS IL-10, IL-6, IL-17 EN PLASMA DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES SANOS**

MARÍA ALEJANDRA GUTIÉRREZ URIBE

MARÍA ALEJANDRA HINCAPIÉ GIRALDO

JACOBO GONZÁLEZ ARANGO

TUTOR:

CARLOS ANDRÉS NARANJO GALVIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

POSGRADO EN PERIODONCIA

MANIZALES

2019

RESUMEN

Objetivo: relacionar las características clínicas periodontales y los niveles de las citoquinas IL-10, IL-6, IL-17 en plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos.

Metodología: Se incluyeron pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer de la clínica de memoria de la ciudad de Manizales, con un rango de edad \geq a 65 años, de ambos sexos. La muestra fue intencional, con un total de 49 pacientes (13 casos y 36 controles), se registraron datos sociodemográficos, factores de riesgo ambientales, se realizó la evaluación del estado periodontal y la medición de los niveles de citoquinas (IL-10, IL-6, IL-17) en plasma de los pacientes de ambos grupos, posteriormente se realizó un análisis estadístico descriptivo para determinar el comportamiento de las variables de los niveles de citoquinas en plasma, los índices periodontales y su relación con ambas enfermedades.

Resultados: en la evaluación del estado periodontal, de todos los pacientes diagnosticados con algún tipo de enfermedad periodontal se encontraron porcentajes menores en los pacientes con enfermedad de Alzheimer que los pacientes que no presentaban esta enfermedad, por otro lado no hay diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de citoquinas presentes en pacientes con Alzheimer y pacientes sanos.

Conclusión: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al relacionar el estado periodontal de pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes sanos, con los niveles de citoquinas estudiadas.

PALABRAS CLAVES: *enfermedad periodontal, enfermedad de Alzheimer, citoquinas.*

ABSTRACT

Objective: to relate the periodontal clinical characteristics and the levels of the cytokines IL-10, IL-6, IL-17 in plasma of patients with Alzheimer's disease and healthy controls.

Methodology: Patients diagnosed with Alzheimer's disease were included in the memory clinic of the city of Manizales, with an age range ≥ 65 years, of both sexes. The sample was intentional, with a total of 49 patients (13 cases and 36 controls), sociodemographic data, environmental risk factors were recorded, evaluation of the periodontal status and measurement of cytokine levels was performed (IL-10, IL -6, IL-17) in the plasma of the patients of both groups, then a descriptive statistical analysis was carried out to determine the behavior of the plasma cytokine levels variables, the periodontal indices and their relationship with both diseases.

Results: in the evaluation of the periodontal status, all patients diagnosed with some type of periodontal disease found lower percentages in patients with Alzheimer's disease than patients who did not have this disease, on the other hand there are no statistically significant differences between the patients. Cytokine levels present in Alzheimer's patients and healthy patients.

Conclusion: no statistically significant differences were found when relating the periodontal status of patients with Alzheimer's disease and healthy patients, with the cytokine levels studied.

KEY WORDS: *periodontal disease, Alzheimer's disease, cytokines.*

CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN	10
2. ANTECEDENTES	12
3. ÁREA PROBLEMÁTICA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. REFERENTE TEÓRICO	17
6. OBJETIVOS	29
6.1. Objetivo general	29
6.1.1. Objetivos específicos	29
7. METODOLOGÍA.....	30
8. RESULTADOS	40
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	53
10. CONCLUSIONES.....	60
11. RECOMENDACIONES	62
12. REFERENCIAS	63
13. ANEXOS.....	70

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Características generales de los pacientes con Alzheimer y controles sanos **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 2. Indicadores de salud oral en función de los grupos de pacientes estudiados **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3. Características: enfermedad periodontal, uso de prótesis, consumo de alcohol y tabaco en función del sexo..... 44
- Tabla 4. Indicadores de salud oral en función del sexo..... 44
- Tabla 5. Niveles de citoquinas en pacientes con Alzheimer y pacientes sanos..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 6. Niveles de citoquinas en función del nivel de severidad de enfermedad periodontal**¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 7. Niveles de citoquinas en función de la historia de periodontitis;**¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 8. Prueba de Hosmer y Lemeshow**¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 9. Estimación del modelo de regresión logística para la presencia/ausencia de Enfermedad de Alzheimer a través el método de selección Forward;**¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 10. Significancia del modelo de regresión logística ...;**¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Correlograma entre los indicadores periodontales y las citoquinas IL-6, IL-10 y IL-17A**¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Variación en el OR de acuerdo a la concentración de IL-6 pg/ml..... **¡Error!**
Marcador no definido.

Gráfica 2 Variación en el OR de acuerdo a la concentración de IL-10 pg/ml..... **¡Error!**
Marcador no definido.

Gráfica 3. Variación en el OR de acuerdo a la edad.....**¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	70
ANEXO 2	72

1 PRESENTACIÓN

La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta los tejidos de soporte de los dientes en los que la interacción de bacterias específicas y la respuesta inmune del hospedero desempeñan un papel fundamental, esta patología está asociada principalmente con bacterias anaerobias gramnegativas, las cuales son una fuente de inflamación sistémica, ya que tienen la capacidad de entrar en la circulación durante las tareas cotidianas, como cepillarse los dientes y masticar los alimentos, generando así una bacteremia generalizada (1). Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente del 5 al 20% de los adultos mayores (con edades ≥ 65 años) padecen formas severas de enfermedad periodontal, que si no se tratan pueden ocasionar la pérdida dental. La periodontitis se ha visto implicada en diversas afecciones sistémicas como enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, diabetes mellitus y, más recientemente, enfermedad de Alzheimer. Es posible que la inflamación resultante a causa de las enfermedades periodontales pueda exacerbar este proceso, contribuyendo con la aparición de varios mediadores proinflamatorios que preceden al deterioro cognitivo (2).

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por un declive progresivo en la memoria, el pensamiento, el lenguaje y la capacidad de aprendizaje, que finalmente termina en la muerte, se cree que la inflamación juega un papel clave en su patogénesis y factores como la edad, aumentan el riesgo de desarrollar este tipo de patología neurodegenerativa. La etiología exacta de la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío es desconocida, pero las infecciones periféricas como la enfermedad periodontal están siendo consideradas como un factor de riesgo potencial (3).

Se ha propuesto una relación bidireccional entre la enfermedad periodontal y la enfermedad de Alzheimer. Según esta hipótesis, la enfermedad de Alzheimer puede predisponer al desarrollo de la periodontitis crónica, esto puede explicar el hecho por el cual los pacientes con patologías neurodegenerativas tienen una higiene oral más deficiente, ya sea debido a la disminución o ausencia de motricidad necesaria para realizar el control mecánico de la placa en el hogar, o porque el paciente no puede visitar a un odontólogo para recibir una

atención profesional, estos factores conducirían al desarrollo de la enfermedad periodontal, que en última instancia puede causar la pérdida dental (4).

Wu Z y colaboradores en 2014 realizaron un estudio donde propusieron dos mecanismos fisiopatológicos que pueden explicar la participación de la periodontitis en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, uno de estos mecanismos es el paso de agentes patógenos y mediadores inflamatorios desde la cavidad oral a la circulación sistémica, cuando las barreras físicas, químicas o inmunológicas de la cavidad oral se ven afectadas, los pacientes pueden desarrollar bacteremia, pues durante las actividades cotidianas como masticar, cepillarse los dientes o usar la seda dental, los patógenos periodontales y sus productos pueden inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 y la IL-6, sometidos a una exposición bacteriana repetida, los receptores de estas citoquinas pueden saturarse y alcanzar la circulación sistémica, el otro mecanismo que los autores sugieren que puede vincular las 2 condiciones involucra a los microorganismos presentes en la placa dental que acceden al tejido cerebral, ya sea a través de la invasión directa, del flujo sanguíneo o los nervios periféricos (5).

2 ANTECEDENTES

Goncalves TO y colaboradores en el año 2010 realizaron un estudio en el que evaluaron los niveles de IL-8, TNF- α , IL-6 e IL-10 liberados por las células mononucleares de sangre periférica estimulada por lipopolisacárido de *Escherichia coli*, obtenidos de la sangre de pacientes con periodontitis crónica. En este estudio se aislaron muestras de células mononucleares de sangre periférica de 19 donantes sistémicamente sanos, de los cuales 10 pacientes presentaban periodontitis crónica generalizada y 9 se encontraban sanos, se demostró que las células mononucleares de sangre periférica estimuladas con lipopolisacáridos de *E.coli* de pacientes con periodontitis presentan un patrón diferente de liberación de citoquinas en comparación con las células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos. Este fenómeno podría tener implicaciones locales en la periodontitis, así como en las enfermedades sistémicas (6).

Swardfager W y colaboradores en el año 2010, realizaron un meta-análisis que buscaba resumir cuantitativamente los datos clínicos de citoquinas encontradas en pacientes con enfermedad de Alzheimer, en esta revisión se incluyeron 40 estudios que midieron las concentraciones de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica y 14 estudios que midieron las concentraciones de citoquinas en líquido cefalorraquídeo, se reportaron concentraciones significativamente mayores de las citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-18 en sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con los controles sanos. La evidencia fue altamente significativa para la IL-6, IL-12 e IL-18, que a su vez coincidían con las concentraciones de los controles según la edad (adulto mayor) los cuales no tenían evidencia de patologías inflamatorias. Estos resultados refuerzan la evidencia clínica de que la enfermedad de Alzheimer se acompaña de una respuesta inflamatoria, particularmente de concentraciones periféricas de IL-6, TNF- α , IL-1, TGF- β , IL-12 e IL-18 (7).

A pesar de la variabilidad en los resultados de algunos estudios, un meta-análisis realizado en el 2014 por Vineet Kumar Khemka y colaboradores, demostró un aumento general en los niveles de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL-6 y TNF- α . Los motivos de

la variabilidad en estos resultados pueden ser diversos, pero aparentemente uno de los principales factores que podría modificar los niveles de citoquinas sería la inclusión o exclusión de comorbilidades como la obesidad, la diabetes, entre otras.

Además, en esta investigación se encontró que los niveles en suero de la de IL-6 y TNF- α aumentaron significativamente en individuos que presentaban únicamente depresión, en comparación con individuos sanos o con pacientes con enfermedad de Alzheimer, pero que no presentaban depresión, esto indica que la activación del sistema inmune periférico en pacientes con enfermedad de Alzheimer y con depresión altera la capacidad cognitiva. Por otro lado, hay numerosos informes que muestran que los trastornos depresivos mayores están asociados con los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en circulación periférica, posiblemente porque el estrés psicológico y físico que desencadena la enfermedad depresiva también activa el sistema inmune periférico, lo que conduce a una mayor liberación de estas citoquinas. La enfermedad depresiva puede ser considerada entonces como un factor predisponente para la enfermedad de Alzheimer (8).

3 ÁREA PROBLEMÁTICA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una búsqueda en las bases de datos: Ebscohost, PubMed, Science Direct, Scopus, Embase y se encontró un solo estudio de revisión, realizado por Sumit Gaur y Rupali Agnihotri en el año 2014 que intenta encontrar la relación que existe entre los niveles de citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y enfermedad periodontal (2).

No obstante, la literatura reporta otras investigaciones como la de T. L. Cerajewska y colaboradores en 2015 (9) y Sophie Poole y colaboradores en 2014 (10), que indican que la enfermedad de Alzheimer tiene una relación con la periodontitis, como bien se sabe las enfermedades periodontales están ampliamente relacionadas con diferentes patologías sistémicas como la diabetes, la hipertensión, el bajo peso al nacer, la enfermedad renal crónica, entre otras, debido a la capacidad que tienen los patógenos periodontales y sus productos bacterianos de inducir citoquinas pro-inflamatorias que si persisten en los tejidos periodontales, tienen la capacidad de diseminarse por vía sistémica hasta llegar a colonizar otros tejidos y órganos del cuerpo. En las patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, una vez estas citoquinas proinflamatorias viajan por vía sistémica y se instalan en el tejido cerebral, tienen la capacidad de desencadenar una serie de eventos que conducen a una mayor degeneración del mismo, por estas razones se ha investigado el posible vínculo entre las patologías como lo es la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad periodontal a través de la medición de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. En el presente estudio se evaluaron específicamente las citoquinas IL-6, IL-10 e IL-17 en plasma de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer y controles sanos, con el fin de relacionar las características clínicas periodontales con los niveles de las citoquinas mencionadas anteriormente, tanto en el grupo de casos, como en el grupo control (10).

De acuerdo a lo anterior con este proyecto se logró determinar ¿cuál es la relación entre los parámetros clínicos periodontales y los niveles de citoquinas de respuesta inmune en plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos?

4 JUSTIFICACIÓN

Actualmente se sabe que los mediadores inflamatorios periféricos y los factores de virulencia de los patógenos periodontales exacerbaban las reacciones inflamatorias innatas en el cerebro (11). Aunque los complejos mecanismos implicados en la enfermedad de Alzheimer han sido bien explicados, los agentes etiológicos que desencadenan estas reacciones son todavía cuestionables, pudiendo estar relacionados con el envejecimiento, la degeneración de las vías neurotransmisoras, factores ambientales y genéticos, el compromiso de la disfunción del sistema inmune y los agentes infecciosos (12).

Se conoce también que la edad avanzada aumenta la susceptibilidad a presentar una serie de patologías inflamatorias o degenerativas, además se ha asociado al envejecimiento con el aumento de la prevalencia y la severidad de la enfermedad periodontal. Entre los posibles mecanismos mediante los cuales el envejecimiento podría contribuir a una mayor susceptibilidad a presentar periodontitis, están: las alteraciones dependientes de la edad (inmunidad innata y adquirida) y las células inmunes innatas en personas de edad avanzada que presentan defectos que podrían predisponer o aumentar el riesgo a presentar enfermedad periodontal (13).

De acuerdo a lo anterior surgen dos hipótesis que intentan relacionar el envejecimiento con la enfermedad periodontal, la primera plantea que el aumento de la prevalencia y la severidad de la periodontitis en la vejez simplemente refleja el efecto acumulativo de la exposición prolongada al microbioma periodontal, en consecuencia, la razón de que en los adultos mayores aumente la prevalencia y la severidad de la periodontitis está relacionada con la exposición prolongada y por lo tanto el acúmulo del daño tisular. La segunda hipótesis se da por la “susceptibilidad alterada a la edad”, el envejecimiento contribuye a la patogénesis periodontal a través de alteraciones dependientes de la edad en el estado inmuno-inflamatorio del hospedero, esta es una hipótesis productiva que busca identificar cambios en la inmunología y/o fisiología del tejido periodontal y el envejecimiento que hacen que las personas mayores sean más susceptibles a presentar periodontitis que los jóvenes (14).

Evidencia reciente indica que la neurodegeneración podría desencadenarse por condiciones inmunoinflamatorias periféricas sostenidas, incluida la periodontitis crónica, este proceso inflamatorio local puede inducir un estado inflamatorio sistémico a través de mecanismos que incluyen la diseminación de citoquinas proinflamatorias desde sitios orales a sitios extra-orales (15). Por lo tanto, la periodontitis podría desencadenar y/o exacerbar una afección inflamatoria, especialmente en ancianos, que llevaría a presentar alteraciones de la memoria, contribuyendo a acelerar la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (16).

Sin embargo, a pesar de que la literatura de los últimos 10 años muestra algunas investigaciones acerca de un posible vínculo entre estas dos entidades (5,11,17-22), no se han reportado estudios que evalúen los niveles de algunas citoquinas específicas en el plasma de pacientes que presenten tanto enfermedad de Alzheimer como índices clínicos de enfermedad periodontal.

Por lo tanto, esta investigación logró identificar los niveles en plasma de las citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-17) y anti-inflamatoria (IL-10), en pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos, que permitió establecer si la enfermedad periodontal puede exacerbar esta patología neurodegenerativa, dando paso a futuras investigaciones en donde se busque controlar o prevenir la enfermedad de Alzheimer por medio del mantenimiento de la salud periodontal.

5 REFERENTE TEÓRICO

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada principalmente a los microorganismos periodontopatógenos que se encuentran presentes en la placa dental y se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dental. Esta patología es un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia, puesto que puede provocar la pérdida dental, afectando negativamente la función masticatoria, fonética y estética (23). Afecta entre el 10 al 15% de la población mundial y es una de las principales causas de pérdida dental. La prevalencia de enfermedad periodontal aumenta con la edad, afectando alrededor del 50% de las personas mayores de 55 años. Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente del 5 al 20% de los adultos mayores (mayores de 65 años) padecen algún tipo de enfermedad periodontal que, si no se trata, puede dar lugar a pérdida dental (2). En Colombia, según el cuarto Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV) realizado en el año 2013–2014, las personas entre 65 a 79 años presentan un porcentaje de 25.99% de periodontitis en general, sin embargo, la prevalencia de la misma varía según su severidad, por ejemplo la prevalencia de la periodontitis moderada fue más del 45% en edades comprendidas entre 65 a 70 años de edad y la prevalencia de periodontitis avanzada se ubicó por encima del 32.8% en edades comprendidas entre los 60 y 69 años de edad (24).

La periodontitis afecta a los tejidos de soporte de los dientes, en los que la interacción de bacterias específicas y la respuesta inmune del hospedero juegan un papel fundamental. La respuesta del hospedero frente a las bacterias y sus factores de virulencia es un factor importante en la determinación de la extensión y severidad de la enfermedad periodontal. Los desafíos bacterianos agudos estimulan a las células epiteliales para que produzcan una serie de citoquinas y mediadores inflamatorios que ayudarán a protegerlas contra el daño del tejido gingival (25).

La respuesta inmunológica inicial a la periodontitis crónica se produce después de la colonización de bacterias periodontopatógenas en el surco gingival. La presencia de la bacteria induce la producción de citoquinas y quimiocinas en el epitelio gingival, dando

como resultado la expresión de moléculas de adhesión, aumento de la permeabilidad de los capilares gingivales y quimiotaxis de polimorfonucleares neutrófilos a través del epitelio de unión (26). Las citoquinas y quimiocinas específicas producidas por esta respuesta inicial conducen a la formación de un infiltrado inflamatorio de células T perivasculares dominadas por macrófagos en los tejidos conectivos. Si esta respuesta inmune mediada por células no controla la exposición bacteriana, se produce la progresión a una lesión de células B / células plasmáticas. Los anticuerpos producidos posteriormente pueden ser protectores y controlar la infección, o pueden ser no protectores con la consiguiente destrucción del tejido conectivo y la pérdida de hueso alveolar. La efectividad de esta respuesta varía entre los individuos y parece ser importante para determinar la susceptibilidad a la enfermedad (27).

La progresión de la periodontitis crónica requiere una serie de factores, como: presencia de bacterias periodontopatógenas, altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-17 y TNF- α , metaloproteinasas y prostaglandina E2 y niveles bajos de citoquinas inhibitorias de la inflamación tales como la IL-10, el TGF- β y los TIMPs. Por lo tanto, la susceptibilidad y la extensión de la destrucción tisular parecen estar determinadas por el complejo de citoquinas inducidas por la presencia de los patógenos periodontales (27-28).

Esta importante carga bacteriana da como resultado una pérdida inicial de fibras colágenas, pérdida de adherencia de fibras gingivales a la superficie del cemento, migración apical del epitelio de unión, formación de bolsas periodontales profundas y reabsorción del hueso alveolar (29).

Por otro lado, la saliva contiene una serie de moléculas inmunes innatas y adaptativas diseñadas para minimizar la adherencia y la supervivencia de organismos que pueden establecerse en el tejido gingival. Los factores químicos tales como los péptidos antimicrobianos, específicamente las α -defensinas expresadas en los neutrófilos y las β -defensinas de la mucosa gingival, son un ejemplo de los mecanismos inmunes innatos que están implicados en el control de la colonización bacteriana patógena (30). Las medidas que controlan la respuesta inmune adaptativa incluyen inmunoglobulinas (IgA) específicas para

las mucosas y diversas enzimas (lactoferrina y lisozima) diseñadas para prevenir procesos metabólicos bacterianos esenciales para su colonización y lisis (29).

La respuesta inmune del hospedero frente a las bacterias periodontopatógenas incluye el reclutamiento de leucocitos y la subsiguiente liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas, que parecen jugar un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad periodontal (31).

Las citoquinas son pequeñas proteínas solubles producidas por una célula, estas tienen la capacidad de alterar el comportamiento o las propiedades de otra célula o sistema. Se incluyen en el grupo de moléculas de citoquinas, interleuquinas, interferones, factores de crecimiento, factores citotóxicos, factores activadores o inhibidores, factores estimuladores de colonias e intracinas (31). Las citoquinas juegan un papel importante en numerosas actividades biológicas incluyendo proliferación, desarrollo, diferenciación, homeostasis, regeneración, reparación e inflamación de células y tejidos (31).

Las células activadas apropiadamente suelen sintetizar muchas citoquinas diferentes al mismo tiempo. La mayoría de estas células también expresan receptores específicos inducibles o constitutivos, para que puedan reaccionar a un amplio espectro de citoquinas. Muchas citoquinas se clasificaron originalmente en función de su origen celular, sin embargo actualmente se sabe que las citoquinas son multifuncionales, producidas por diversos tipos celulares y que sus actividades biológicas están sobrecargadas. Los mecanismos mediante los cuales las citoquinas actúan sobre las células diana se clasifican en cuatro tipos: autocrino, intracrino, yuxtacrino y paracrino (31).

Cuando un tejido se encuentra en estado de homeostasis se puede atribuir un papel primario a las citoquinas que son secretadas constitutivamente por las células residuales que componen dicho tejido. Por otra parte, cuando un tejido no se encuentra sano, las citoquinas presentes en este pueden ser secretadas no sólo por las células residentes, sino también por las células inmunocompetentes infiltradas localmente (31).

La regulación de la migración, proliferación y diferenciación de las células residuales y de la producción de la matriz tisular, son aspectos importantes en la homeostasis de los tejidos periodontales. Hay abundantes pruebas de que las citoquinas secretadas por los fibroblastos y las células endoteliales y epiteliales, juegan un papel crucial en esta homeostasis tisular (31).

Algunas citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6 y TNF- α han sido detectadas en los tejidos gingivales clínicamente sanos (32), aunque su densidad es relativamente baja comparada con la de los sitios inflamados. Esto sugiere que una gran cantidad de citoquinas pueden estar involucradas en el mantenimiento de la integridad del tejido periodontal. Además, se ha demostrado que el aumento en la producción de citoquinas puede conducir al inicio de la enfermedad y/o al daño tisular (31).

Una citoquina pro-inflamatoria se define como una citoquina que se induce durante el curso de una respuesta inflamatoria y está estrechamente asociada con su inicio y/o progresión. Hasta ahora, la IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 y el TNF- α se clasifican generalmente como citoquinas inflamatorias en el proceso de patogénesis de la enfermedad periodontal, debido a su aumento en el proceso de la reabsorción ósea (31).

Las citoquinas pro-inflamatorias se consideran importantes marcadores de enfermedades sistémicas crónicas como lo es la enfermedad cardiovascular, se ha encontrado la relación de la IL-6 con estos desordenes del sistema cardiovascular, esta citoquina es producida por monocitos y células B y estimula los hepatocitos (células del hígado) para producir reactantes de fase aguda (33).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que influye en las respuestas inmunes y las reacciones inflamatorias, es producida por diversos tipos de células. Las principales fuentes in vivo son monocitos estimulados, fibroblastos y células endoteliales, aunque también puede ser producida por macrófagos, células T y B y queratinocitos, después de su estimulación. La IL-6 se produce también en lesiones de tipo periodontal, cuando estas bacterias periodontopatógenas penetran en la circulación, los monocitos, neutrófilos y células

endoteliales empiezan a producirla. Una de las funciones principales de esta citoquina es la inducción de la maduración final de las células B en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina (31).

Dado que la IL-6 es de particular importancia en las respuestas de células B humanas, se ha especulado que la expansión de células B / células plasmáticas observadas en lesiones de periodontitis puede resultar de un aumento de la producción de IL-6 en sitios afectados. Además, se sugiere que la IL-6 juega un papel importante en la regulación local del recambio óseo y parece ser esencial en la pérdida ósea causada por la deficiencia de estrógenos. Asimismo, se ha sugerido también que la IL-6 puede actuar como un factor autocrino y/o paracrino en la reabsorción ósea en estados patológicos estimulando la formación de osteoclastos y su activación. Estos hallazgos implican la participación de la IL-6 en la patogénesis de la enfermedad periodontal (31).

Bruno G. Loos, y colaboradores en el año 2006, realizaron una investigación en pacientes con periodontitis agresiva y pacientes sanos, estos informaron un aumento significativo de IL-6 en los niveles de plasma de los pacientes del grupo caso en comparación con los pacientes del grupo control. Es de suma importancia tener en cuenta que la medición de las citoquinas en plasma es un proceso de alta complejidad, debido a que estas se encuentran a menudo en niveles relativamente bajos en el límite de los ensayos, en especial la IL-1 y la IL-6 (34).

En otro estudio del Centro Dental Eastman, se demostró que cuando se trata a los pacientes con periodontitis agresiva se obtiene una disminución de los niveles de IL-6, esto demuestra de nuevo que la elevación de la IL-6 está relacionada con el proceso de la enfermedad periodontal (33).

Thais Oliveira y colaboradores en un estudio realizado en el año 2010, investigaron el comportamiento de las células mononucleares de sangre periférica en pacientes con periodontitis en comparación con el grupo sano. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de IL-8, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-6 e IL-10 liberados por el

lipopolisacárido de la *Escherichia coli*, en células mononucleares de sangre periférica estimuladas obtenidas de pacientes que presentaban periodontitis crónica. El resultado de este estudio fue que las células de sangre periférica estimuladas liberaron niveles más altos de TNF- α e IL-6 en pacientes con periodontitis que los controles sanos (6).

La expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-6 y la L-17, es relativamente baja en suero, cuando no existe presencia de ningún tipo de inflamación. Sin embargo, a medida que la edad avanza, los niveles séricos de estos marcadores pueden ser detectables, e incluso encontrarse en cantidades elevadas, sin necesidad de que esté presente un proceso inflamatorio (35). El aumento de los niveles séricos de IL-6 es una característica del envejecimiento, incluso en pacientes sanos (36).

La IL-6 tiene efectos negativos en el envejecimiento y ha sido propuesta como un marcador confiable para determinar el deterioro funcional, así como un predictor de morbilidad y mortalidad en la vejez (37). El aumento en los niveles séricos de la IL-6 influyen en el inicio de la fragilidad, el pobre rendimiento físico, la pérdida de la fuerza muscular, el desgaste cognitivo, además del declive cardiológico, neurológico, y vascular, estos niveles elevados también están estrechamente vinculados en procesos cancerígenos. Por el contrario, la alta producción de IL-10 parece ser un factor protector contra algunas de las patologías ya mencionadas y un posible biomarcador para la longevidad (35).

La participación de la IL-6 en la enfermedad de Alzheimer ha sido ampliamente demostrada. Las células dendríticas derivadas de monocitos inmaduros de pacientes con enfermedad de Alzheimer producen cantidades significativamente mayores de IL-6, de hecho, se describió que esta citoquina está sobreexpresada en placas β -amiloide, siendo sus niveles significativamente más altos en pacientes con enfermedad de Alzheimer (38). Además, un estudio realizado por Magaki S y colaboradores en el 2007 demostró una producción aumentada de IL-6, junto con la IL-8 y la IL-10, en individuos con deterioro cognitivo leve que sugiere que la alteración de los parámetros inmunes son eventos tempranos en la enfermedad de Alzheimer. Además, existe un mecanismo de amplificación interesante entre la expresión de ICAM-1 y la producción de IL-6. De hecho, con la

estimulación apropiada (ej: infección), las células dendríticas producen IL-6 que a su vez induce la expresión de ICAM-1. Al mismo tiempo, el compromiso de ICAM-1 puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 (39).

Sin embargo, es importante saber que no solo la IL-6 juega un papel importante en la aparición y progresión de las enfermedades periodontales, sino que existen también otro tipo de citoquinas de efecto antiinflamatorio como lo es la IL-10, esta participa en procesos de remodelación ósea, ha sido utilizada para inhibir la reabsorción ósea y para reducir la inflamación, siendo benéfica en los tratamientos realizados para contrarrestar las enfermedades periodontales (40).

Como una citoquina antiinflamatoria importante, la IL-10 juega un papel vital en las enfermedades periodontales, su bloqueo puede resultar en la aceleración de la reabsorción ósea alveolar y la disminución de la formación ósea (40).

Por otro lado, la IL-17 es una citoquina proinflamatoria con diversas funciones biológicas secretada por varios subtipos de células T activadas. Su receptor se encuentra en los distintos tipos celulares de un amplio rango de tejidos, esta se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, rechazo de aloinjertos, cáncer, respuestas de hipersensibilidad inmediata y tardía y control de infecciones, entre ellas la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* (41).

La IL-17 está implicada también en la osteoclastogénesis induciendo la expresión de RANKL en células osteoblásticas. La función principal de esta citoquina es mediar en los procesos inflamatorios estimulando a las células residentes para que secreten citoquinas proinflamatorias potentes como la IL-1, IL-6, IL-8 y la prostaglandina E2 (PGE2) que exacerban la reacción inflamatoria y la destrucción tisular. Se han encontrado niveles elevados de IL-17 en fluido crevicular gingival en pacientes con periodontitis agresiva (42).

Se ha demostrado también que las células T auxiliares 17 activadas (Th17) son las células principales que secretan la IL-17, además de los macrófagos, las células dendríticas, los

mastocitos y las células Natural Killer que se pueden encontrar en la patogénesis de la periodontitis crónica. Así pues la IL-17 está asociada con diversas enfermedades sistémicas tales como la artritis reumatoidea y la esclerosis múltiple, por lo cual es posible asociar también la participación de esta citoquina a enfermedades neurodegenerativas (43).

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas se encuentra comúnmente la demencia, definida como un trastorno que presentan principalmente los adultos mayores, que se vuelve más frecuente con el avance de la edad. Dado al rápido aumento que ha habido en la población mundial, siendo el segmento de mayor edad el de más rápido crecimiento, la demencia se ha convertido en un problema creciente de salud pública (44).

La demencia comprende un grupo de enfermedades neurodegenerativas en las que los síntomas incluyen una disminución de la función cognitiva e intelectual, junto con pérdida de la memoria, pérdida de atención y de habilidades para resolver problemas cotidianos. El Alzheimer es considerado como la causa más común de demencia, representando entre el 68 al 80% de todos los casos. La causa exacta del desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer esporádica sigue siendo investigada, sin embargo se cree que la inflamación juega un papel vital (45).

Las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer son una acumulación de enredos neurofibrilares intracelulares (NFT) y depósitos extracelulares de β -amiloide fibrilar (A β). A lo largo de los años, estas proteínas han sido directamente relacionadas con los procesos patológicos que generan la inflamación intracerebral. Ahora se entiende que los órganos circunventriculares (CVO) no están protegidos por la barrera hematoencefálica y que las infecciones periféricas y los mediadores inflamatorios pueden acceder al cerebro. Esto implica que las infecciones microbianas y el sistema inmune innato pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la inflamación dentro del cerebro, contribuyendo a la patogénesis del déficit cognitivo en los individuos (10).

Algunos investigadores han demostrado que los pacientes con enfermedad de Alzheimer expresan niveles elevados en plasma de anticuerpos frente a los patógenos periodontales,

junto con unos niveles más elevados del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que los pacientes sanos con la misma edad (46).

Aunque estos marcadores permiten controlar la función inmune general, pueden no ser necesariamente específicos de la enfermedad periodontal. Queda por determinar si el vínculo potencial entre las dos enfermedades es directo (a través de la propia bacteria que invade el órgano) o indirecto (a través de la inflamación sistémica causada por la presencia de bacterias periodontales). La evidencia se está acumulando a favor de los mecanismos inflamatorios periféricos que pueden alterar la inflamación cerebral, con la opinión actual que indica que esto es el resultado de mediadores pro-inflamatorios. Los mismos investigadores han demostrado que múltiples infecciones sistémicas pueden exacerbar el estado cognitivo premórbido en pacientes con enfermedad de Alzheimer (46).

Hay estudios que demuestran la presencia de bacterias en los tejidos cerebrales, lo que sugiere que la asociación entre la mala salud oral y la enfermedad de Alzheimer, puede resultar de la invasión directa al SNC por bacterias orales o por sus factores de virulencia. La demostración del LPS sistémico (de origen oral) es relevante porque es un potente estimulador de la actividad innata del sistema inmune. Una vez en el cerebro activará la glía local para montar una respuesta inmune innata. La microglia hipersensibilizada del LPS incrementa la síntesis de mediadores inflamatorios, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6, factores de complemento, TLRs 2 y 4 y óxido nítrico, que liberan radicales libres y especies de oxígeno reactivo y aumentan el daño tisular (47).

Por el contrario, han surgido estudios metodológicos que demuestran la presencia de bacterias en los tejidos cerebrales, lo que sugiere que la asociación entre la mala salud oral y la enfermedad de Alzheimer puede ser consecuencia de la invasión directa en el SNC por bacterias orales o sus factores de virulencia (10).

En la enfermedad de Alzheimer, la microglia y los astrocitos son sin duda la principal fuente de citoquinas, estas contribuyen a casi todos los aspectos de la neuroinflamación, incluidos los procesos proinflamatorios y antiinflamatorios, la lesión neuronal, la

quimioatracción y la respuesta de la microglia a los depósitos de β -amiloide. La activación de la microglia se caracteriza y modula por las citoquinas. La acumulación patológica de β -Amiloide es un factor clave que impulsa la respuesta neuroinflamatoria en la enfermedad de Alzheimer. Además, la exposición de la microglia al β -Amiloide preagregado aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias (IL1 β , IL-6 y TNF α). Además, las concentraciones de M-CSF en el plasma y el SNC de los pacientes en la etapa de demencia de la enfermedad de Alzheimer aumentan sustancialmente en comparación con los controles sanos de la misma edad o los pacientes con deterioro cognitivo leve (48).

La evidencia sugiere que el entorno proinflamatorio presente en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer alcanzan niveles nocivos. Por ejemplo, el riesgo de conversión del deterioro cognitivo leve a la etapa de demencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta en pacientes con concentraciones elevadas de la citoquina proinflamatoria TNF- α y concentraciones reducidas de TGF- β antiinflamatorio en la CSF. IL-1 β , TNF- α y otras citoquinas podrían alterar la función neuronal incluso antes de conducir a cambios estructurales, como se muestra mediante la supresión de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica. Varias interacciones y una mayor expresión de citoquinas adicionales, quimiocinas y receptores inmunes innatos favorecen un estado de activación tipo macrófagos en la enfermedad de Alzheimer (49).

La unión del β -Amiloide a la superficie de la célula microglial induce la expresión génica pro-inflamatoria y da como resultado la elevación de citoquinas tales como el TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18, que conducen a hiperfosforilación de las proteínas tau y a la pérdida neuronal.

La expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer por células no neuronales, incluidas las células endoteliales, probablemente desempeña un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Los microvasos cerebrales en la enfermedad de Alzheimer liberan niveles significativamente más elevados de citoquinas pro-inflamatorias que incluyen el TNF- α , IL-1 β y la IL-6 que los microvasos presentes en los pacientes sanos de la misma edad (50).

Como ya se mencionó anteriormente, la IL-6 es una citoquina inflamatoria pleiotrópica producida principalmente por la microglia activada y los astrocitos en diferentes regiones del cerebro. Además, la IL-6 podría estimular la microglía y los astrocitos para liberar una cascada de otros tipos de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR). Se han encontrado niveles significativamente elevados de IL-6 en los cerebros, el fluido cerebroespinal y el plasma, especialmente alrededor de las placas β -Amiloides en pacientes con enfermedad de Alzheimer y modelos animales. Por lo tanto, se ha propuesto que la IL-6 está implicada en la etiopatogenia de esta enfermedad con componentes inflamatorios agudos o crónicos (50).

Una serie de estudios han investigado el mecanismo molecular que subyace a la asociación de la IL-6 con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo las proteínas tau y las placas de β -Amiloide. Según los informes, la producción de IL-6 por las neuronas humanas se estimula mediante la proteína tau y el β -Amiloide modificado en el producto final de la glicación. A su vez, se ha informado que el β -Amiloide puede activar la microglia, lo que conduce a aumentar la síntesis y la liberación de la IL-6, está también desempeña un papel complejo en la regulación de la función cognitiva en los procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos (50).

La IL-10 se encuentra dentro del grupo de citoquinas antiinflamatorias, con potentes efectos supresores en la prevención de enfermedades autoinmunes. La función principal de la IL-10 parece ser, limitar y terminar la señal inflamatoria en células como los monocitos y los macrófagos (40). Diversos estudios han demostrado que esta citoquina se asocia con enfermedades como el cáncer, la Enfermedad de Alzheimer, la esclerosis sistémica, la diabetes tipo 2, los accidentes cerebrovasculares isquémicos, la aterosclerosis, la enfermedad cardiovascular, el asma, la artritis reumatoide y la hiperplasia prostática. Aunque se considera que tiene una función inmunosupresora, el uso de la IL-10 como potencial terapéutico ha dado resultados controversiales, lo que sugiere un papel más complejo en la regulación inmune. El efecto de la IL-10 en las células B puede ser estimulante en lugar de supresor.

En el estudio realizado por Chen JM y colaboradores en 2014, se observaron concentraciones significativamente más altas de IL-18 e IL-17 en mujeres, mientras que en hombres se encontraron concentraciones más elevadas de IL-23, en comparación con pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos. Tales diferencias entre los pacientes masculinos y femeninos pueden indicar los diferentes roles de las citoquinas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer dependiendo del sexo, pero también puede deberse al pequeño número de casos masculinos (30% de todos los casos) incluidos en el estudio. Se observó una correlación significativa entre la IL-23 y la IL-17 en todos los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los resultados de recientes estudios in vitro sugieren que la IL-23 podría promover el desarrollo de Th17, estimulando la expansión de Th17 y prolongando la producción de la IL-17. Además, los resultados de los estudios in vitro proporcionaron evidencia de que la IL-17 aumentada tanto en el líquido cefalorraquídeo como en el suero estaba directamente relacionada con la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, la IL-23 junto con la acción de la IL-1 β o la IL-18 podría inducir una producción altamente significativa de IL-17 y promover la autoinmunidad al estimular la producción de la misma, mediada por las células T. En resumen, las tres citoquinas (IL-17, IL-18 e IL-23) parecen tener un efecto sinérgico en la patogénesis y/o progresión de la enfermedad de Alzheimer, aunque se pueden informar diferentes hallazgos de cada una (51).

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Relacionar las características clínicas periodontales y los niveles de las citoquinas IL-10, IL-6, IL-17 en plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el estado periodontal de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y los pacientes del grupo control, de acuerdo a los parámetros clínicos periodontales evaluados.
- Evaluar los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-17) y antiinflamatoria (IL-10) en plasma de los pacientes objeto de estudio.

7 METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Investigación cuantitativa con alcance descriptivo e inferencial.

Población: Pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos que fueron diagnosticados por la Clínica de Memoria de la ciudad de Manizales

Muestra y muestreo: Se determinó la muestra a partir de la fórmula “*muestreo para comparaciones de dos grupos*” dado que se realizó una comparación del comportamiento de variables entre pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos. Para ello se realizó una revisión de antecedentes de literatura científica sobre el comportamiento de todas las variables del estudio, y se tuvo en cuenta aquella variable en la que se evidenció más especificidad del dato considerándola como variable estrella: el nivel del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ1). En este estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a los controles, quienes tuvieron una media de $20,2 \pm 4,14$ ng/ml. De acuerdo a lo anterior, y teniendo en cuenta un nivel de confianza del 95% y un poder estadístico del 80%, se obtuvieron los datos para aplicar la fórmula y determinar la muestra mínima final; la cual, para llegar a ser significativa en función de determinar una adecuada caracterización y correlación de variables, se aumentó a n=49.

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Criterios de exclusión:

- Presencia de patología neurológica o psiquiátrica que explique los cambios cognitivos o del comportamiento del paciente con enfermedad de Alzheimer.
- Pacientes con presencia de dificultades auditivas o visuales
- Pacientes que consuman corticosteroides sistémicos
- Pacientes gestantes.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes que no consuman sustancias psicoactivas ni alcohol.
- Pacientes que no presenten enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias sistémicas o condiciones médicas inestables no controladas.

Grupo Casos:

Edad > o igual a 65 años, ambos sexos, escolaridad mínima quinto de primaria, consentimiento informado, diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer CDR 1-3

Grupo Control:

Edad > o igual a 65 años, ambos sexos, escolaridad mínima quinto de primaria, consentimiento informado, ausencia de: deterioro cognitivo, enfermedad psiquiátrica, enfermedad neurológica, hipertensión arterial no controlada

Consideraciones éticas

La investigación según la resolución 008430 de 1993 se clasifica como un estudio “DE RIESGO MAYOR AL MÍNIMO”, por tratarse de una población adulta mayor a la cual además se le realizó una toma muestra de sangre. Se contó con protocolos para: obtención de muestras por venopunción, control de evolución clínica por la venopunción y prevención de riesgos y manejo de material de desechos.

Procedimientos

- Los pacientes evaluados en el estudio, pertenecían a la clínica de memoria de la ciudad de Manizales, en donde se solicitó una previa autorización para que estos fueran incluidos en la muestra.
- Una vez obtenidas las autorizaciones, se procedió a contactar los pacientes, estos fueron seleccionados según los criterios de inclusión y se citaron para realizar el examen clínico periodontal.

- El examen periodontal se realizó utilizando sondas periodontales y espejos intraorales Hu Friedy®, se registraron los siguientes parámetros clínicos: sangrado al sondaje, profundidad al sondaje y nivel de inserción clínica en cada diente, exceptuando los terceros molares, estos parámetros se registraron en seis sitios por diente: mesio-vestibular, medio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatino, medio-lingual/palatino y disto-lingual/palatino, el número de sitios con sangrado al sondaje se registró con una evaluación dicotómica, donde 0 indicaba ausencia y 1 indicaba presencia y posteriormente se determinó un porcentaje total de los sitios que presentaban sangrado al sondaje.

Pautas generales de seguridad:

- La toma de muestras de sangre debe realizarse siempre por personal calificado para tal actividad (enfermera, auxiliar de enfermería).
- Es obligatorio utilizar la bata dentro de las instalaciones del laboratorio.
- Es requisito el uso de guantes a la hora de tomar la muestra, se debe utilizar un par de guantes diferente para atender a cada paciente.
- Es recomendable el uso de gafas de protección.
- No se permite consumir alimentos, bebidas o fumar en el laboratorio.
- Se recomienda el uso de gorro y tapabocas.
- Se debe realizar lavado de manos frecuente durante el día, además es obligatorio realizar el lavado de manos antes y después del contacto con el paciente y al salir o llegar al laboratorio.

Preparación del paciente:

- **Identificación del paciente**

La identificación correcta del paciente es indispensable, pregunte por el nombre y documento de identificación del paciente, y el grupo de estudio al que pertenece (si es caso

o control), si el paciente es incapaz de darle ésta información, pídale al acompañante o acudiente del paciente.

- **Explicación del procedimiento**

Trate siempre al paciente de manera cordial, explique a éste el procedimiento que le va a realizar en forma clara y sencilla, si el paciente no puede comprenderle explique el procedimiento a su acompañante o acudiente, si el paciente o acompañante tienen dudas, trate de responder a sus inquietudes de manera cordial y clara. Pida siempre la autorización del paciente y/o acudiente para la realización del procedimiento, aun cuando el consentimiento informado ya haya sido firmado pida una autorización verbal, si el paciente o el acudiente se niegan a la realización del procedimiento trate de ser comprensivo y no lo fuerce, pida asistencia a un miembro del grupo de investigación a cargo del proyecto.

- **Preparación del equipo para la toma de la muestra**

“Se debe preparar el equipo necesario para la obtención, la conservación y el transporte correctos de la muestra. Las propiedades biológicas de esta pueden ser alteradas por variables medioambientales como: tiempo, contenedor, contaminación externa” (Secretaría distrital de salud de Bogotá, 2008)

Equipo para la recolección de la muestra

- Tubos PAXgene™ Blood RNA System: que permiten la estabilización y purificación del RNA intracelular.
- Agujas: Están numeradas dependiendo de su calibre. Las agujas de 0.9 mm a 1.1 mm de diámetro se utilizan normalmente para punción venosa en adultos.
- Adaptador para tubos-Vacutainer: Se utilizan para tubos al vacío.
- Torniquete para adulto

Equipo de asepsia y antisepsia

- Guantes estériles
- Gasas estériles
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%
- Curita o venda adhesiva
- Yodopovidona
- Procedimiento para la toma de la muestra

Preparación de la persona encargada de tomar la muestra

El profesional que va a realizar el procedimiento de toma de la muestra de sangre debe realizar el correcto lavado de manos (es recomendable seguir el método de lavado de manos sugerido por la Organización mundial de la salud - OMS), debe utilizar los elementos de protección personal como: bata, tapabocas y guantes.

Acomodación del paciente

“La muestra debe tomarse correctamente y bajo las condiciones más favorables para evitar errores. Esto incluye la absoluta identificación del paciente, el sitio a puncionar y el volumen a colectar. El paciente debe estar en posición cómoda, de preferencia en una silla especial para venopunción con descanso para los brazos.”(Demar, 2015)

Selección del área de recolección de la muestra

Al momento de elegir el sitio donde se realizará la punción para la toma de la muestra, se deben evitar las zonas heridas, laceradas o con alergias. El área de preferencia para la toma de la muestra es en la región cubital anterior de uno de los miembros superiores.

Palpación de la vena a punzar

Previo a la punción, se debe escoger la vena. La mejor manera es realizando una palpación con la yema de los dedos tratando de seguir el recorrido de las venas. Para ello coloque el

torniquete 3 a 4 pulgadas por encima del sitio seleccionado, para visualizarlas mejor. Debe tener presente el no mantener el torniquete por más de 3 minutos, para evitar la hemoconcentración. Las venas más utilizadas para la venopunción, están localizadas en el área antecubital, entre éstas: la vena mediana cubital, la vena cefálica y la vena basílica.

Limpieza y desinfección de la piel

Con una gasa estéril o algodón impregnado de alcohol al 70% o yodopovidona, se debe limpiar el área donde está ubicada la vena elegida para la punción, con movimientos circulares desde el centro hacia la periferia, posteriormente, debe dejarse secar el área de manera natural, una vez realizada la desinfección no se debe volver a tocar el área de la vena elegida.

Extracción de la muestra de sangre

- Pida al paciente que posicione el brazo en forma horizontal y luego que cierre y abra el puño continuamente para bombear la sangre, luego pídale que deje el puño cerrado.
- Coloque la punta de la aguja en un ángulo de 15 a 30 grados sobre la superficie de la vena escogida y atravesese la piel con un movimiento firme y seguro, hasta el lumen de la vena.
- Sostenga firmemente el vacutainer con una mano y con la otra inserte, llene y retire el tubo.
- Afloje el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de coleccionar, sin apretar el área de la punción con el algodón.
- Presione el algodón sobre el sitio de la punción aplicando una presión adecuada y no excesiva para evitar la formación de hematoma.
- Descarte la aguja en el contenedor para elementos cortopunzantes (guardián)
- Coloque una curita o venda adhesiva en el sitio de la punción.

Rotulado de la muestra

El rotulado de la muestra debe realizarse inmediatamente después de la recolección de la muestra de sangre. Dentro de los datos que se deben incluir para la identificación de la muestra se encuentran:

- Nombre del paciente
- Número de identificación del paciente
- Fecha de toma de la muestra
- Grupo al que pertenece el paciente: caso o control
- Iniciales del profesional que realizó la toma de la muestra

Cuidados del paciente posterior a la extracción

Una vez finalizado el proceso de extracción de la muestra de sangre, quien realizó la toma de la muestra debe verificar el estado en el que se encuentra el paciente y si éste puede retirarse por sus propios medios y de inmediato, ya que, algunos pacientes pueden sufrir mareo o desmayo posterior a la extracción de sangre, por lo que es indispensable preguntar al paciente si se siente bien.

Si el paciente presenta sudoración, palidez o temblor, pudiera necesitar nuestra ayuda, le podemos ofrecer un estímulo olfativo fuerte como alcohol; si además ocurre un desmayo se le deben elevar sus piernas, para favorecer la llegada de sangre al cerebro.

Transporte de la muestra

Cuando el proceso de recolección de muestras termina, éstas deben ser trasladadas lo antes posible al laboratorio para su análisis y procesamiento,” se recomienda transportar las muestras al laboratorio en los primeros 15 minutos de la recolección a temperatura ambiente” (Secretaría distrital de salud de Bogotá, 2008)

Manejo y disposición de los residuos

Finalizado el proceso de toma de muestras de sangre los residuos generados del procedimiento deben descartarse según el Plan de gestión integral de los residuos de la Universidad Autónoma de Manizales.

- Los residuos generados de la realización de procedimientos asistenciales son considerados residuos peligrosos de riesgo biológico y deben desecharse así:
- Los residuos biosanitarios como: gasas, algodones y guantes utilizados para la toma de las muestras deben desecharse en la caneca roja rotulada como riesgo biológico biosanitario
- Las agujas utilizadas para la extracción de la sangre deben desecharse en el recipiente para residuos cortopunzantes de color rojo (guardián)
- La mesa o espacio donde se dispusieron los materiales para la toma de la muestra de sangre debe ser desinfectada con hipoclorito
- Los residuos son recolectados diariamente en la ronda del personal de servicios generales de la universidad Autónoma de Manizales, verifique que dicho personal realice siempre el procedimiento utilizando los elementos de protección personal y de acuerdo al protocolo para la recolección interna de residuos de la fundación IPS.

Colección de muestras y almacenamiento:

- **Preparación de muestras de plasma:** Se recomendó la recolección de plasma utilizando EDTA como anti-coagulante. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000xg dentro de los 30 minutos de la recolección de sangre. Se eliminó inmediatamente el plasma y el ensayo o alícuota y se almacenaron las muestras a -20 ° C.
- **Precauciones de seguridad:** Todos los componentes de la sangre y materiales biológicos se manejaron como potencialmente peligrosos. Se siguieron las instrucciones establecidas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional al manejar y desechar agentes infecciosos

Evaluación del perfil de citoquinas

- Se realizó por medio del panel MILLIPLEX® MAP Human Citoquinas / Quimiocinas. Esta metodología tiene la ventaja de una alta velocidad y sensibilidad, que mejora drásticamente su productividad. El kit MILLIPLEX MAP de Citoquinas / Quimiocinas de EMD Millipore se utilizó para la cuantificación simultánea de las siguientes citoquinas humanas: IL-6, IL-17 e IL-10.
- El Principio del MILLIPLEX MAP se basa en la tecnología xMAP® de Luminex®, una de las tecnologías de más rápido crecimiento y más respetadas que ofrece aplicaciones a lo largo de las ciencias de la vida y es capaz de realizar una variedad de bioensayos incluyendo inmunoensayos en la superficie de perlas magnéticas codificadas fluorescentemente conocidas como microesferas MagPlex™-C.
- El almacenamiento recomendado para los componentes del kit es de 2 - 8 ° C. Para el almacenamiento a largo plazo. Se deben evitar múltiples ciclos de descongelación (> 2).
- Previa a la firma del consentimiento informado, se tomaron 10 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante para aislar el plasma. Posterior a ello se centrifugó durante 10 minutos a 1000 x g dentro de los 30 minutos de la recolección. Las muestras se almacenaron ≤ -20 ° C Evitando repetir ciclos de congelación y descongelación.
- Para la medición de las citoquinas IL-10, IL-6, IL-17 se utilizó el kit Milliplex Human Cytokine/Chemokine Magnetic Panel I kit (Cat. # HCYTOMAG-60K) a través del sistema MAGPIX con tecnología Luminex.

Recomendaciones:

- No usar más allá de la fecha de vencimiento en la etiqueta.
- No mezclar ni sustituir los reactivos con los de otros lotes o fuentes.
- Es importante permitir que todos los reactivos se calienten a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su uso en el ensayo.

- El lavado incompleto puede afectar adversamente el resultado del ensayo. Todo el lavado debe realizarse con el tampón de lavado proporcionado.

8 RESULTADOS

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó a partir del programa estadístico IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 24, en el cual se aplicaron diferentes técnicas estadísticas para dar cumplimiento a los objetivos y alcances propuestos. Entre las técnicas estadísticas que se aplicaron, se encuentran: tablas de frecuencia y contingencia, que muestren frecuencias y porcentajes, gráficos de barras, para el resumen de las variables cualitativas, medidas de tendencia central y dispersión, como el mínimo, el máximo, la media y la desviación típica o estándar, para variables cuantitativas.

En el análisis bivariado, se hizo uso de la prueba Chi-cuadrado de Pearson, para identificar si factores personales como el sexo, estrato y consumo de tabaco y alcohol se encuentran relacionados la evaluación clínica periodontal y los niveles de citoquinas de respuesta inmune en plasma. 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 el modelo de regresión logística con el objetivo de modelar cómo influye en la probabilidad de enfermedad de periodontal con la enfermedad de Alzheimer y los niveles de citoquinas IL-6, IL-10 y IL17A. Este modelo permitirá identificar los factores de riesgo y las citoquinas de respuesta inmune asociados a la enfermedad de periodontal (Silva, 1994).

La regresión logística es un instrumento estadístico de análisis multivariado, de uso tanto explicativo como predictivo. Resulta útil su empleo cuando se tiene una variable dependiente dicotómica (un atributo cuya ausencia o presencia se ha puntuado con los valores cero y uno, respectivamente) y un conjunto de m variables predictoras o independientes, que pueden ser cuantitativas (que se denominan covariables o covariadas) o categóricas. La expresión estadística del modelo es:

$$\textit{logit} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p$$

En este modelo la variable dependiente será dicotómica que representará: 0= sin enfermedad periodontal y 1= con enfermedad periodontal. En todos los casos se utilizará el procedimiento Forward (hacia delante) como método de selección de variables en el modelo utilizando como criterio la significancia estadística de los coeficientes β de las variables introducidas usando el estadístico W de Wald. Se utilizará 0.10 como probabilidad de entrada para el método por pasos, es decir, que el modelo será menos estricto para la entrada de una variable en la modelación. La laxitud de esta recomendación se debe a que un criterio tan restrictivo como un $p < 0.05$ puede llevarnos a dejar de incluir en el modelo variables con una débil asociación a la variable dependiente en solitario pero que podrían demostrar ser fuertes predictores de la misma al tomarlas en conjunto con el resto de variables explicativas. De igual forma se entenderá que para la significancia estadística de los parámetros se contrastará a través de un nivel de significación del 10%. Se incluirá además en el modelo el término de la constante.

A continuación, se muestran los principales resultados encontrados en la exploración de los datos recolectados en pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes sin la enfermedad de Alzheimer.

Características generales de los participantes

Se recolectó información de un total de 40 pacientes, de los cuales el 20% tienen enfermedad de Alzheimer y el 80% son pacientes sin la enfermedad. El 80% son mujeres y de los pacientes con Alzheimer, el 75% son mujeres y de los pacientes sanos el 81.25% también son mujeres. El rango de edad estuvo comprendido entre 41 y 97 años, con un promedio de 69.3 +/- 12 años. La edad promedio de los pacientes con Alzheimer fue de 85 +/- 7 años y de los pacientes sanos fue de 64 +/- 10 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 controles sanos

		Control		Caso		Total		P*
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Femenino	26	81.25%	6	75.00%	32	80.00%	0.692
	Masculino	6	18.75%	2	25.00%	8	20.00%	
Diagnóstico Periodontal	Sin enfermedad periodontal	7	21.88%	3	37.5%	10	25.00%	0.30
	Leve	8	25.00%	0	0.00%	8	20.00%	–
	Moderada	6	18.75%	2	25.00%	8	20.00%	0.424
	Severa	11	34.38%	3	37.5%	14	35.00%	0.46
Prótesis	No	20	62.5%	1	12.5%	21	52.5%	0.0057
	Si	12	37.5%	7	87.5%	19	47.5%	
Tipo Prótesis	No Tiene	19	59.38%	1	12.50%	20	50.00%	0.178
	Parcial	11	34.37%	4	50.00%	15	37.50%	0.2911
	Total	2	6.25%	3	37.50%	5	12.50%	0.21
Historia de Periodontitis	No	4	12.5%	2	25.00%	6	15.00%	0.187
	Si	28	87.5%	6	75.00%	34	85.00%	
Tabaco	No	22	68.75%	6	75.00%	28	70.00%	0.365
	Si	10	31.25%	2	25.00%	12	30.00%	
Alcohol	No	27	84.37%	7	87.5%	34	85.00%	0.412
	Si	5	15.63%	1	12.5%	6	15.00%	
Estrato	Bajo	2	6.25%	0	0.00%	2	5.00%	–
	Medio	23	71.88%	6	75.00%	29	72.5%	0.439
	Alto	7	21.87%	2	25.00%	9	22.5%	0.5372

Prueba de hipótesis para comparación de proporciones

En la tabla 1, se observa que un poco menos de la mitad de los pacientes con Alzheimer no tienen enfermedad periodontal (37.5%), la mayoría por ser edentulos, mientras casi el 80% de los pacientes sanos presentan algún nivel de severidad de enfermedad periodontal, sin presentar valores estadísticamente significativos. Sin embargo, el 87.5% de los pacientes con Alzheimer y el 37.5% de los pacientes sanos tienen prótesis (total o parcial), por tanto, dentro de la muestra seleccionada es más probable que los pacientes con Alzheimer tengan prótesis que aquellos sanos con un valor de $p=0.0057$, siendo así una diferencia

significativa. Ahora, el 87.5% de los pacientes sanos tienen historia de enfermedad periodontal y un 75% de los pacientes con Alzheimer también presentaron historia periodontal ($p=0.187$). 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 en ambos grupos es del 30%, el de alcohol es del 15% y el estrato más frecuente es el estrato medio con un 72.5% 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	10	4	4	12	11	< 0.001
Índice de Sangrado	0.18	0.13	0.22	0.20	0.29	0.15	0.630
Índice de placa	0.20	0.15	0.42	0.29	0.31	0.20	0.025
Profundidad al Sondaje (mm)	2.3	0.5	2.6	0.6	2.45	0.5	0.197
Nivel de inserción (mm)	2.8	1.3	3.9	2.0	3.35	1.5	0.088

Prueba U de Mann-Whitney

La tabla 2 muestra algunos indicadores de salud oral de los pacientes seleccionados en la muestra. En la tabla se observa que los pacientes con Alzheimer cuentan con 4 +/- 4 dientes y los pacientes sanos con 20 +/- 10 dientes, muchos más dientes presentes que los pacientes sin Alzheimer ($p<0.001$), lo que es consecuente con la utilización de prótesis dentales en los pacientes con la enfermedad. También se evidenció que los pacientes con Alzheimer presentaron un porcentaje de índice de placa de 42%, mientras que en los pacientes sanos el porcentaje de placa bacteriana fue menor, de 20%, con diferencias significativas ($p=0.025$). El índice de sangrado, la profundidad de sondaje y el nivel de inserción fue muy similar entre ambos grupos de pacientes ($p>0.05$). El índice de sangrado promedio fue de 29 +/-

15%, la profundidad del sondaje fue de 2.45 +/- 0.5 mm y el nivel de inserción fue de 3.35 +/- 1.5 mm.

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

		Masculino		Femenino		Total		P*
		n	%	n	%	n	%	
Diagnóstico Periodontal	Sin enfermedad	8	20.0%	2	22.2%	10	20.4%	0.424
	Leve	14	35.0%	3	33.3%	17	34.7%	
	Moderada	8	20.0%	0	0.0%	8	16.3%	
	Severa	10	25.0%	4	44.4%	14	28.6%	
Prótesis	No	17	42.5%	5	55.6%	22	44.9%	0.477
	Si	23	57.5%	4	44.4%	27	55.1%	
Tipo de Prótesis	Total	16	40.0%	5	55.6%	21	42.9%	0.665
	Parcial	8	20.0%	1	11.1%	9	18.4%	
	No Tiene	16	40.0%	3	33.3%	19	38.8%	
Historia de Periodontitis	No	10	25.0%	1	11.1%	11	22.4%	0.367
	Si	30	75.0%	8	88.9%	38	77.6%	
Tabaco	No	31	77.5%	6	66.7%	37	75.5%	0.495
	Si	9	22.5%	3	33.3%	12	24.5%	
Alcohol	No	35	87.5%	7	77.8%	42	85.7%	0.451
	Si	5	12.5%	2	22.2%	7	14.3%	
Estrato	Bajo	2	5.0%	1	11.1%	3	6.1%	0.785
	Medio	29	72.5%	6	66.7%	35	71.4%	
	Alto	9	22.5%	2	22.2%	11	22.4%	

Prueba de hipótesis para comparación de proporciones

Al relacionar el sexo de los pacientes en función de algunas características como enfermedad periodontal, uso de prótesis y consumo de alcohol y tabaco (tabla 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en estos factores estudiados ($p > 0.05$).

Tabla 4 Indicadores de salud oral en función del sexo

	Masculino		Femenino		Total		P*
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
Número de Dientes Presentes	17.3	11	19.6	12	18.45	11	0.799
Índice de Sangrado	0.14	0.16	0.20	0.09	0.17	0.15	0.576
Índice de placa	0.19	0.21	0.25	0.16	0.22	0.20	0.52
Profundidad al Sondaje (mm)	2.6	0.5	2.3	0.5	2.45	0.5	0.35
Nivel de inserción (mm)	4.1	1.1	2.7	2.3	3.4	1.5	0.164

Prueba U 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 ($p > 0.05$). Por lo tanto, se puede argumentar que tanto hombres como mujeres presentan los mismos niveles de salud oral.

Niveles de citoquinas IL-10, IL-6 y IL-17 en plasma sobre la muestra de pacientes

A continuación, se describirán los resultados encontrados con relación a los niveles de citoquinas IL-10, IL-6 y IL17 en plasma que están presentes en pacientes con Alzheimer y controles sanos. Igualmente se relacionará los niveles de estas citoquinas con la severidad de enfermedad periodontal.

Tabla 5 Niveles de citoquinas en pacientes con Alzheimer y pacientes sanos

	Control		Caso		Total		p*
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
IL-6 pg/ml	68.2	106.5	24.7	33.5	46.45	93.4	0.218
IL-10 pg/ml	3.7	3.7	1.7	1.5	2.7	3.3	0.0195
IL-17A pg/ml	15.01	32.8	2.1	6.6	8.55	28.5	0.178

Prueba U Mann-Whitney

En la tabla 5 se relacionan los niveles de citoquinas en pacientes con Alzheimer y pacientes sanos. En esta tabla se encuentra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-17) presentes en pacientes con Alzheimer y pacientes sanos ($p > 0.05$). Sin embargo, se evidencia que los pacientes con Alzheimer presentan un nivel de la citoquina anti-inflamatoria (IL-10) mucho menor que aquellos pacientes sanos, con un valor $p = 0.0195$, siendo resultados estadísticamente significativos.

Tabla 6 Niveles de citoquinas en función del nivel de severidad de enfermedad periodontal

	Sin Enfermedad		Leve		Moderada		Severa		p*
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
IL-6 pg/ml	38.6	35.7	36.9	32.7	73.3	92.7	79.5	154.5	0.998
IL-10 pg/ml	2.5	2.2	2.2	1.3	4.4	4.7	3.9	4.5	0.909
IL-17 pg/ml	3.8	7.3	8.5	5.9	14.8	28.9	19.4	48.1	0.310

Prueba Kruskal-Wallis

De otro lado, tampoco se evidencian diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas entre la severidad de enfermedad periodontal de los pacientes (tabla 6). Por lo tanto, sin importar la severidad de enfermedad periodontal, los niveles de citoquinas IL6, IL10 y IL17 se mantienen igual.

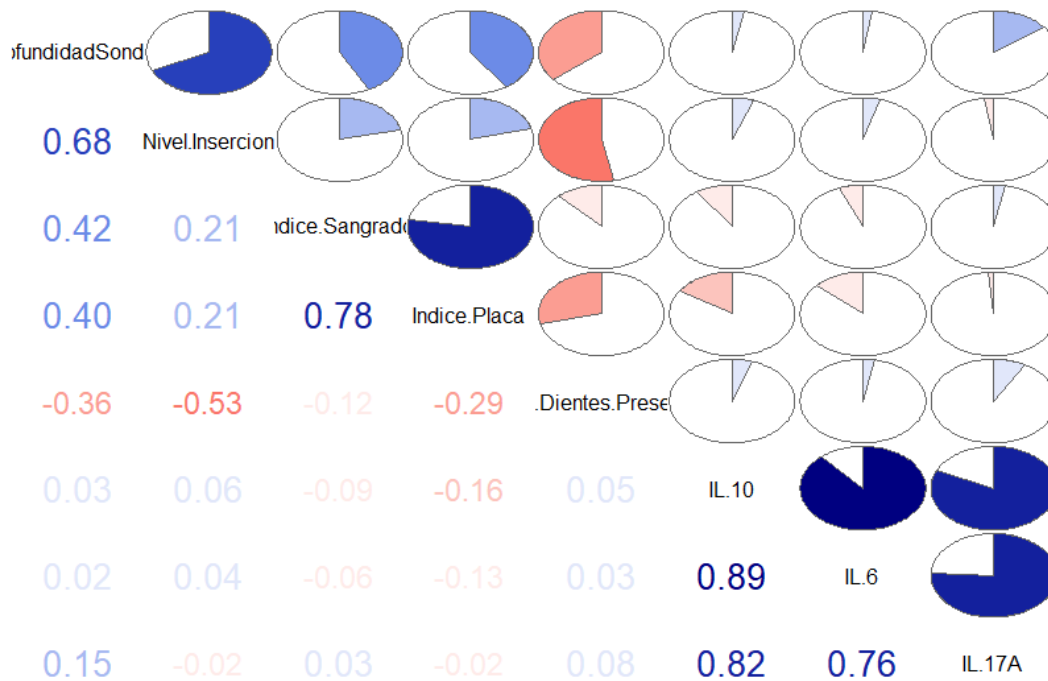
Tabla 7 Niveles de citoquinas en función de la historia de periodontitis

	No		Si		p*
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
IL-6 pg/ml	32.2	34,6	64.3	104,5	0.835
IL-10 pg/ml	2.08	1,9	3.5	3,6	0.197
IL-17A pg/ml	3.5	7,1	14.02	32,0	0.91

Prueba U Mann-Whitney

En la tabla 7, se muestra la relación de los niveles de citoquinas con la historia de periodontitis de los pacientes con Alzheimer y sanos. En ella se evidencia nuevamente, que no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas entre los pacientes que tienen y no tienen historia de periodontitis.

Figura 1 Correlograma entre los indicadores periodontales y las citoquinas IL-6, IL-10 y IL-17A



La figura 4, muestra la relación entre algunos indicadores periodontales como la profundidad de sondaje, nivel de inserción, índice de sangrado e índice de placa con los niveles de citoquina IL-6, IL-10 y IL17A. Las correlaciones se definen por color e intensidad del gráfico, el grado de relación se muestra en los diagramas circulares que aparecen en la parte superior derecha de la figura. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). Se evidencia que las relaciones más fuertes se encuentran entre el índice de sangrado y el índice de placa ($\rho=0.78$, $p=0.000$), la citoquina IL-6 y la IL-10 ($\rho=0.89$, $p=0.000$), la citoquina IL-10 y la IL-17^a ($\rho=0.82$) y la citoquina IL-6 y la IL-17^a ($\rho=0.76$, $p=0.000$). Cabe destacar que ninguna de las variables o indicadores periodontales se relaciona significativamente con los niveles de citoquina IL-6, IL-10 y IL17A ($p>0.05$).

Factores de riesgo para enfermedad periodontal

Tabla 8 Prueba de Hosmer y Lemeshow

Chi cuadrado	p-valor
7.262	0.509

La tabla 8 muestra la prueba de ajuste global del modelo que permite identificar cómo influyen los factores relacionados como el Alzheimer y las citoquinas IL-6, IL-10 y IL-17^a en la probabilidad de presentar enfermedad periodontal. Ésta es una prueba para evaluar la bondad del ajuste de un modelo de regresión logística, en el sentido que la hipótesis que se contrasta es que no existen diferencias entre las frecuencias de los casos observados y las frecuencias de los casos pronosticados. Puesto que el p-valor es mayor a un nivel de significación del 5%, no se rechaza la hipótesis de que el modelo tiene un buen ajuste.

Tabla 9 Estimación del modelo de regresión logística para la presencia/ausencia de Enfermedad de Alzheimer a través el método de selección Forward

Variables seleccionadas	B	E.T.	Wald	gl	p
Edad	-0,256	0,086	8,798	1	0,003
IL-6pg ml	0,042	0,023	3,315	1	0,069
IL-10pg ml	-0,955	0,464	4,237	1	0,040
Constante	21,91	7,270	9,083	1	0,003

La tabla 9 presenta el parámetro estimado para cada una de las variables independientes (B), su error estándar (E.T.), y su significancia con la prueba de Wald. En éste primer modelo se involucran las variables clínicas periodontales, las características sociodemográficas y los niveles de citoquinas y se realiza la selección de variables por el método de selección Forward. Se observa que los niveles de citoquina que más se relacionan con la enfermedad de Alzheimer son: IL-6 (p=0.069) y IL-10 (p=0.040). Las demás variables no se encuentran asociadas a dicha patología.

Del modelo se puede extraer que los pacientes con niveles altos de citoquina IL-6 (p=0.069) son quienes con más frecuencia se exponen a tener una enfermedad de Alzheimer (odds=1,042). Con relación al nivel de citoquina IL-10pg ml (p=0.040), los

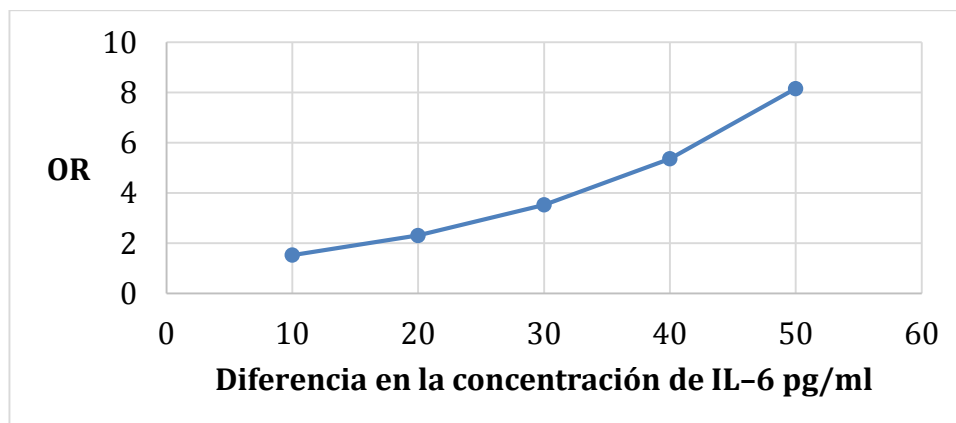
pacientes con mayor nivel disminuyen el riesgo de presentar una enfermedad de Alzheimer, al igual que la edad, a medida que esta aumenta, disminuye el riesgo de presentar una enfermedad de Alzheimer, siendo así factores protectores para la probabilidad de ser un caso.

Tabla 10 Significancia del modelo de regresión logística

Pseudo R²	Chi cuadrado	p*
0.825	33.04	< 0.001

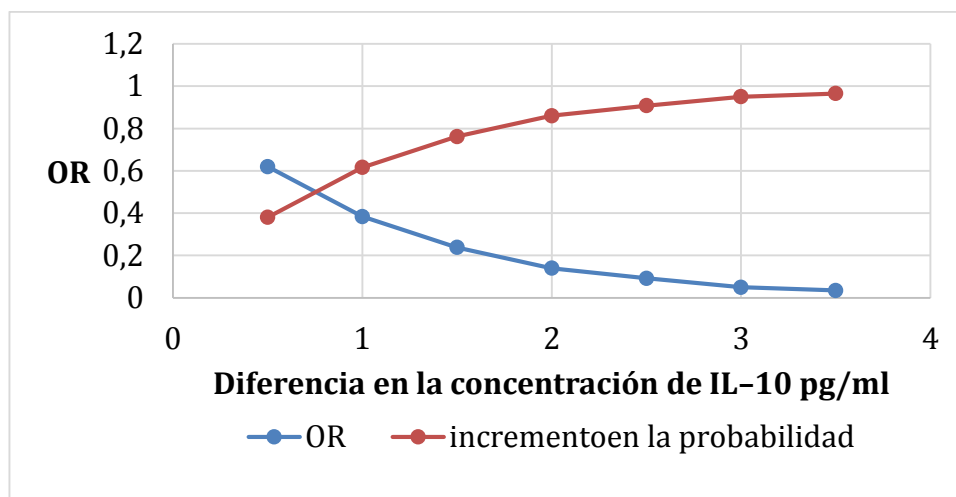
El Pseudo R² explica que el 82.5% del 100% de los casos se pueden predecir con base en las tres variables independientes del método de selección de Forward (edad, IL-10 e IL-6), y el Chi cuadrado brinda la significancia del modelo en p.

Gráfico 1 Variación en el OR de acuerdo a la concentración de IL-6 pg/ml



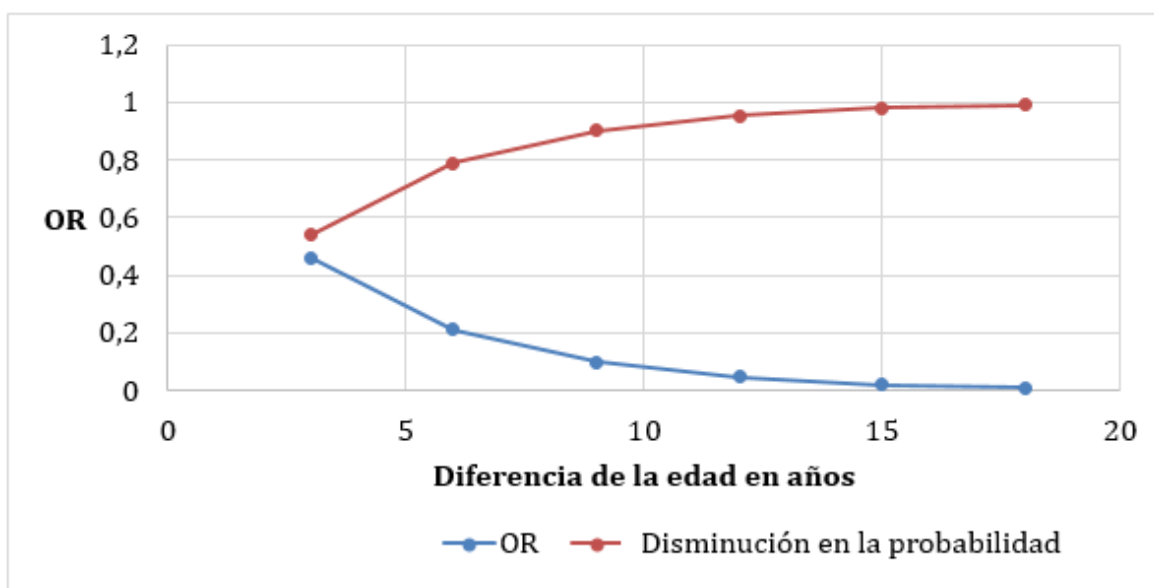
En la gráfica 1 se observa que a mayor concentración de IL-6 con respecto al promedio, es mayor la probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer, siendo así la IL-6 un factor de riesgo para ser un caso.

Gráfico 2 Variación en el OR de acuerdo a la concentración de IL-10 pg/ml



En la gráfica 2 se observa que a mayor concentración de IL-10 con respecto al promedio, es menor la probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer, siendo así la IL-10 un factor protector para ser un caso.

Gráfico 3 Variación en el OR de acuerdo a la edad



En la gráfica 3 se observa que a mayor edad con respecto al promedio, es menor la probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer, siendo así la edad un factor protector para ser un caso.

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los hallazgos encontrados en la presente investigación, demuestran que de los 40 pacientes incluidos en la muestra, el 20% tienen enfermedad de Alzheimer y el 80% son pacientes sanos, de los cuales el 37.5% de los pacientes que presentan Alzheimer no tienen enfermedad periodontal, la mayoría por ser edentulos, sin embargo presentan mayor cantidad de placa bacteriana que los controles sanos, siendo esta una diferencia estadísticamente significativa, lo anterior debido a que los pacientes que presentan patologías neurodegenerativas no poseen capacidades motrices adecuadas para realizar una buena higiene oral, también es importante resaltar que los pacientes incluidos en el grupo de casos, presentan mayor probabilidad de perder los dientes y una mayor prevalencia del uso de prótesis; éstos hallazgos son consistentes con lo reportado por Stein y col en el 2007 (52s), quiénes en su investigación reportaron que la pérdida de dientes estaba asociada directamente con una mayor incidencia de enfermedades neurodegenerativas como lo es el Alzheimer, otro estudio realizado por Hatipoğlu y colaboradores en el 2011 (53), en 31 pacientes con Alzheimer, demostró que el cepillado dental y la limpieza de la prótesis fueron irregulares en 22 de 31 (70%) de los pacientes, corroborando que la disminución de las funciones cognitivas en pacientes con Alzheimer produce un deterioro del cuidado de la prótesis y un aumento de las lesiones de la mucosa relacionadas con la misma.

En este estudio, algunas variables como el sexo, el consumo de tabaco, de alcohol y el estrato socioeconómico, son similares entre los pacientes con Alzheimer y pacientes sanos, al relacionar el sexo de los pacientes con algunas de las características mencionadas anteriormente como la enfermedad periodontal, el uso de prótesis y el consumo de alcohol y tabaco, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con relación a estos factores, sin embargo otros artículos demuestran resultados variados en cuanto a la correlación de estos indicadores, por ejemplo Al-Shammari y colaboradores en 2005 (54) con su publicación, llegaron a la conclusión que la pérdida de dientes debida a la enfermedad periodontal se asocia con los indicadores de riesgo de edad, sexo masculino, tabaquismo, falta de mantenimiento profesional e higiene oral inadecuada, otro artículo realizado por Johnson y colaboradores en el 2007 (55), demuestra que fumar

se asocia con un aumento de dos a ocho veces en la pérdida de inserción periodontal y pérdida ósea, sin embargo en nuestro estudio no se relacionó el hecho de ser fumador, con la pérdida del nivel de inserción, ni con ninguno de los otros parámetros periodontales. Por otro lado, Prince, M. J, en su estudio realizado en el 2015 (56) documenta que el 58% de todas las personas con demencia viven en países actualmente clasificados por el Banco Mundial como países de ingresos bajos o medios y se estima que la proporción de personas con demencia que viven en estos mismos países aumentará a 63% en 2030 y 68% en 2050, teniendo así estas personas un mayor riesgo de tener una salud oral deficiente, que exacerbe el proceso de enfermedades como el Alzheimer.

En el IV Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB), realizado en el 2013 (57), se demuestra que la pérdida del nivel de inserción clínica, tanto en extensión como en severidad son mayores en hombres que en mujeres con unos porcentajes de pérdida del nivel de inserción clínica mayor a 5 mm en 2.59% de los hombres y 1.68% de las mujeres, estos resultados concuerdan con los encontrados en el presente estudio, puesto que se observa que los hombres presentan mayor pérdida del nivel de inserción clínica que las mujeres, sin embargo es importante tener en cuenta que debido a que la muestra fue intencional, estos resultados no son estadísticamente significativos y se necesita un mayor número de personas para poder comparar los resultados de otras investigaciones.

Amaral y colaboradores en 2008 (58), realizaron un estudio con pacientes alcohólicos y controles sanos, para evaluar índices periodontales como sangrado al sondaje, severidad de enfermedad periodontal y nivel de inserción clínica, encontrando que quienes consumían alcohol frecuentemente presentaban una relación significativa con la pérdida del nivel de inserción y una mayor severidad de periodontitis, estos parámetros también fueron documentados en el presente estudio, pero no se relacionaron con el hábito del alcoholismo.

Por otro lado, Reynolds, en el 2014 (59), investigó El impacto general del consumo de alcohol en las enfermedades infecciosas, como lo es la periodontitis, este parece ser atribuible en gran parte a los efectos adversos del alcohol en el sistema inmunológico, siendo mayor su efecto nocivo para las personas que consumen más de 40 grados de

alcohol puro por día, no obstante, el autor llega a la conclusión de que hay pruebas limitadas que indican que el consumo de alcohol puede estar asociado con una mayor severidad de la pérdida de inserción clínica, en el mismo artículo se documenta la relación del consumo de tabaco con la respuesta local y sistémica del hospedero, concluyendo que el hábito del cigarrillo modifica ambas respuestas, las cuales se caracterizan por una reacción inflamatoria más fuerte, con niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y colagenasas, en el presente estudio, sin embargo, no se relacionó ningún hábito, como el tabaquismo o el alcohol con el aumento o disminución de las interleuquinas estudiadas.

Como se ha venido mencionando durante la realización de este trabajo de investigación, varios estudios han determinado los niveles de diversas citoquinas en fluido crevicular gingival en pacientes con periodontitis crónica, pero se dispone de datos limitados sobre el nivel de citoquinas en plasma y saliva, por lo tanto Batool H y colaboradores en el 2018, realizaron un estudio para determinar los niveles de IL-6 e IL-17 en la saliva de pacientes con periodontitis crónica, se incluyeron 41 pacientes sanos y 41 pacientes con la enfermedad, de acuerdo con el grado de pérdida del nivel de inserción clínica, el grupo de casos se subcategorizó en formas de periodontitis leve, moderada y severa, los resultados encontrados demostraron que entre los controles sanos y los pacientes con enfermedad periodontal, se observó una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de IL-6 e IL-17, llegando a la conclusión, que los niveles de IL-6 e IL-17 en saliva aumentaron significativamente en los pacientes con periodontitis crónica en comparación con los controles sanos y estos niveles aumentaron con la progresión de la misma, así mismo, los niveles se encontraron mucho más aumentados en las formas severas de la enfermedad, en comparación con la moderada y la leve, estos resultados difieren con lo encontrado en el presente estudio, pues no fue posible evidenciar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas, hallados en plasma entre la severidad de enfermedad periodontal de los pacientes, por lo tanto, sin importar la severidad de enfermedad periodontal los niveles de la IL6, la IL17 y la IL10, se mantienen

iguales, esta última citoquina aunque no fue evaluada en el estudio que realizaron Batool H y colaboradores, si ha sido estudiada en otras publicaciones.

Es sabido que en la destrucción del tejido periodontal, las citoquinas parecen tener un papel importante, y existe una compleja red de citoquinas pro y antiinflamatorias que actúan en los tejidos periodontales inflamados, el estudio realizado por Al-Ghurabei BH y colaboradores en 2013 (60), fue diseñado para evaluar la relación entre citoquinas pro y antiinflamatorias (IL-1 β \ IL-10 y TNF- α \ IL-10) en pacientes con periodontitis crónica, se estudiaron un total de 50 pacientes que presentaban la enfermedad y 25 controles sanos, los parámetros periodontales utilizados en este estudio fueron el índice de placa, el índice de sangrado al sondaje, la profundidad al sondaje y el nivel de inserción clínica, las concentraciones de IL-1 β , TNF- α e IL-10 en suero se evaluaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, los resultados revelaron que los niveles séricos de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) fueron significativamente bajos en los pacientes con periodontitis en comparación con los controles, estos datos concuerdan con los presentados en la actual investigación, que a pesar de no ser estadísticamente significativos, demuestran que los niveles de la citoquina antiinflamatoria (IL-10) se encuentran más disminuidos que los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-17), siendo resultados esperados, debido a que la enfermedad periodontal, al ser una enfermedad crónica, supone el aumento en inflamación tanto local como sistémica. Estos resultados pueden proporcionar evidencia para demostrar que el desequilibrio entre las citoquinas pro y antiinflamatorias podría estar involucrado en el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal y es indicativo de un estado proinflamatorio sistémico más fuerte en dicha patología.

En la estimación del modelo de regresión logística para la presencia o ausencia de enfermedad periodontal a través del método de selección Forward que se realizó en el presente estudio, se puede extraer que los pacientes con niveles altos de IL-6 son quienes con más frecuencia se exponen a tener enfermedad periodontal y con relación al nivel de la IL-10, los pacientes con mayor nivel disminuyen el riesgo de presentar una enfermedad periodontal.

Por otro lado, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-17) presentes en plasma de pacientes con Alzheimer y pacientes sanos. Sin embargo, al evaluar los niveles de la citoquina anti-inflamatoria (IL-10), entre el grupo de casos y el grupo control se evidencia una diferencia estadísticamente significativa, con valor p de 0.0195, demostrando que los pacientes con Alzheimer presentan un nivel de IL-10 mucho menor que aquellos pacientes sanos.

Pese a que en la presente investigación no fue posible hallar diferencias estadísticamente significativas entre los niveles principalmente de las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas (IL-6 e IL-17), existen algunos artículos que muestran la relación entre estos marcadores y la enfermedad de Alzheimer.

Wu Y.Y y colaboradores en 2015 (61), buscaron identificar biomarcadores presentes en la enfermedad de Alzheimer, para mejorar la precisión diagnóstica en la etapa leve, en este estudio se incluyeron pacientes con edades mayores a 50 años en el grupo de los casos, se midieron los biomarcadores inflamatorios, incluidos los niveles de IL-6, se estudiaron 41 pacientes con Alzheimer y 40 pacientes sanos, la mayoría (88.9%) de los pacientes que estaban en el grupo de casos, tenían enfermedad de Alzheimer leve, se observaron niveles elevados de IL-6 en el plasma del grupo que presentaba la enfermedad, llegando a la conclusión que en plasma, el aumento de la IL-6 se identificó como un biomarcador potencial de enfermedad de Alzheimer en una etapa temprana.

Hamdan y colaboradores en el 2014 (62), evaluaron el nivel de IL-1 α , IL-10 e IL-17A en el suero de pacientes con Alzheimer, demencia vascular y síndrome de Down, comparándolos con pacientes sanos, los resultados mostraron que el nivel sérico de IL-10 fue significativamente mayor en pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con los pacientes que presentaban las otras patologías y los del grupo control, sin embargo siendo el nivel de esta citoquina menor que el encontrado en las citoquinas pro-inflamatorias. El nivel sérico de IL-17A aumentó significativamente en pacientes con enfermedad de Alzheimer y demencia vascular en comparación con pacientes con síndrome de Down y controles.

En la literatura documentada previamente, se observa que relacionan tanto parámetros periodontales como niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias con enfermedades inflamatorias crónicas, como lo son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad periodontal, individualmente, sin embargo, un artículo realizado por Santosh S. M y colaboradores en el 2014 (63), relaciona todas estas variables, estos autores encontraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los individuos con Alzheimer y los controles sanos con respecto al sexo, resultados similares a los del presente estudio, también demostraron que los individuos con Alzheimer presentaban valores más altos de parámetros periodontales como el sangrado al sondaje y el índice de placa, y un valor menor en el nivel de inserción clínica, en comparación con los controles sanos, mientras que la condición periodontal empeoró a medida que el nivel de la enfermedad de Alzheimer progresó de leve a severa, finalmente, los autores de esta publicación, concluyeron que el estado de salud periodontal de los individuos con Alzheimer está estrechamente relacionado con su función cognitiva, las deficiencias cognitivas y motoras se acompañan de una incapacidad gradual para realizar una higiene oral adecuada, mostrando así estos pacientes un mayor grado de destrucción periodontal que aumenta a medida que se produce la progresión de la enfermedad.

Cabe resaltar, que en la mayoría de los artículos encontrados y que fueron mencionados anteriormente en esta discusión, el índice periodontal que más fue estudiado y más se compara respecto a sexo, edad y hábitos, es el nivel de inserción clínica, posiblemente porque este puede ser el parámetro que más indique tanto la presencia como la historia de enfermedad periodontal, así pues es importante que en futuras investigaciones se realice un enfoque en cuanto a este punto, que permita tener información más detallada para entender qué está causando la presencia de la enfermedad y su relación con otras enfermedades sistémicas, en este caso como lo es el Alzheimer.

Martorana A y colaboradores (2012) (64), argumentan que el envejecimiento tiene un impacto negativo en el desarrollo del sistema inmunológico y en su capacidad para combatir patógenos, los cambios asociados con la edad en la competencia inmunológica se denominan inmunosenescencia que se caracteriza por cambios en los que la inmunidad

adaptativa se deteriora, mientras que la inmunidad innata se conserva en gran medida o incluso se regula con el progreso de la edad.

Por lo anterior, es importante tener en cuenta que los pacientes que no presentan ningún tipo de patología neurodegenerativa como el Alzheimer, pueden presentar niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias, que no tendrían relación con el desarrollo de un proceso inflamatorio patológico, sino que estarían directamente relacionadas con el proceso natural de inmunosenescencia que se presenta con la edad.

10 CONCLUSIONES

- Se evidenció una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IL-10 entre el grupo casos y el grupo control, siendo estos menores en los pacientes que presentan enfermedad de Alzheimer.
- El componente genético y el acúmulo de procesos inflamatorios a lo largo de la vida, son factores de riesgo para presentar una enfermedad neurodegenerativa.
- El aumento de la concentración de IL-6 es un factor de riesgo para el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa.
- El aumento de la concentración de IL-10 y el aumento de la edad, son factores protectores para el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa.
- Este estudio fue el primero realizado en Colombia que relacionó las características clínicas periodontales y los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-17) y antiinflamatoria (IL-10), en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos.
- Se encontró que los niveles de la citoquina antiinflamatoria (IL-10) se encuentran más disminuidos que los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-17), siendo resultados esperados, debido a que la enfermedad periodontal, al ser una enfermedad crónica, supone el aumento en inflamación tanto local como sistémica.
- Los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentaron menor prevalencia de enfermedad periodontal que los controles sanos, esto debido a que tenían un menor número de dientes y por lo tanto presentaban mayor uso de prótesis que los pacientes que no tenían la enfermedad, sin embargo es importante resaltar que a pesar de esto, el índice de placa fue mayor en el grupo de casos de la población estudiada.
- Las variables como el sexo, el consumo de tabaco, de alcohol y el estrato socioeconómico, fueron similares entre los pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes sanos.
- Al comparar los sexos de los pacientes de ambos grupos, tanto del grupo de casos como del grupo control con algunas de las características estudiadas como la

presencia y severidad de la enfermedad periodontal, el uso de prótesis y el consumo de alcohol y tabaco, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con relación a estos factores.

- No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas halladas en plasma de la población estudiada, comparándolos con la severidad de la enfermedad periodontal.

11 RECOMENDACIONES

- Es necesario aumentar el tamaño de la muestra para futuras investigaciones, pues esto permitirá realizar análisis que tengan mayor probabilidad de ser estadísticamente significativos y contribuyan al conocimiento científico.
- Se debe hacer énfasis en la prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento de la enfermedad periodontal, en pacientes que presenten factores de riesgo para desarrollar enfermedad de Alzheimer, pues esto puede influir en la progresión de este tipo de patologías neurodegenerativas.
- Los familiares y/o encargados de cuidar a las personas con enfermedad de Alzheimer deben adquirir una adecuada educación en salud oral, que les permita mantener los índices periodontales bajos, para que así la progresión de ambas enfermedades no sea tan rápida.
- La prevención y/o tratamiento oportuno de la periodontitis podría contribuir a la disminución de tener un factor de riesgo potencial para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.
- Se necesitan más estudios que relacionen las características clínicas periodontales y los niveles de citoquinas en plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y enfermedad periodontal, para que así sea posible establecer un vínculo exacto entre la aparición y relación bidireccional de ambas patologías.
- En futuras investigaciones, se recomienda relacionar los factores epigenéticos con el desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad periodontal con respecto a los niveles de citoquinas presentes en plasma.

12 REFERENCIAS

1. Tonetti M, Greenwell H, Kornman K. Staging and Grading of Periodontitis: Framework and Proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S149-S161.
2. Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's Disease and Chronic Periodontitis: Is there an association?. *Geriatr Gerontol Int*. 2015;15(4):391-404.
3. Singhrao S, Harding A, Simmons T, Robinson S, Kesavalu L, Crean S. Oral Inflammation, Tooth Loss, Risk Factors, and Association with Progression of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2014:1-15.
4. Pazos P, Leira Y, Domínguez C, Pías-Peleteiro J, Blanco J, Aldrey J. Association between Periodontal Disease and Dementia: A literature review. *Neurología*. 2018;33(9):1-12.
5. Wu Z, Nakanishi H. Connection between Periodontitis and Alzheimer's Disease: Possible Roles of Microglia and Leptomeningeal Cells. *J Pharmacol Sci*. 2014;126(1):8-13.
6. Oliveira T, Costa D, Brodskyn C, Mendes P, Batista J, Nogueira-Filho G. Release of Cytokines by Stimulated Peripheral blood Mononuclear cells in Chronic Periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2010;55:975-980.
7. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry*. 2010;68:930-941.
8. Khemka V, Ganguly A, Bagchi D, Ghosh A, Bir A, Biswas A, et al. Raised Serum Proinflammatory Cytokines in Alzheimer's Disease with Depression. *Aging Dis*. 2014;5(3):170-176.
9. Cerajewska T, Davies M, West N. Periodontitis: a Potential risk factor for Alzheimer's Disease. *Br Dental J*. 2015:6-12.

10. Poole S, Singhrao S, Crean J. Emerging Evidence for associations between Periodontitis and the Development of Alzheimer's Disease. *Faculty Dental J.* 2014;5(1):39-42.
11. Watts A, Crimmins E, Gatz M. Inflammation as a Potential Mediator for the association between Periodontal Disease and Alzheimer's Disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(5):865-876.
12. Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(5):865-876.
13. Fransson C, Berglundh T, Lindhe J. The effect of age on the Development of Gingivitis. Clinical, Microbiological and Histological Findings. *J Clin Periodontol.* 1996;23:379-385.
14. Hajishengallis G. Aging and its impact on innate Immunity and Inflammation: Implications for Periodontitis. *J Oral Biosci.* 2014;56:30-37.
15. Hajishengallis G. Periodontitis: from Microbial immune Subversion to Systemic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15:30-44.
16. Teixeira F, Saito M, Matheus F, Prediger R, Yamada E, Maia C, et al. Periodontitis and Alzheimer's Disease: A Possible Comorbidity between Oral Chronic Inflammatory Condition and Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:327.
17. Silvestre F, Lauritano D, Carinci F, Silvestre-Rangil J, Martinez-Herrera M, Del Olmo A. Neuroinflammation, Alzheimer's Disease and Periodontal Disease: Is there an association between the two Processes?. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2017;31:189-196.
18. Ganesh P, Karthikeyan R, A. M, Anand J. A Potential Role of Periodontal Inflammation in Alzheimer's Disease: A Review. *Oral Health Prev Dent.* 2017;15(1):7-12.

19. Ramya V, Bhuvaneshwarri P. Alziemer's disease and Periodontal disease Bidirectional interrelationships. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2014;11(1):259-261.
20. Abbayya K, Puthanakar N, Naduwinmani S, Chidambar Y. Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North Am J Medical Sci*. 2015;7(6):241-246.
21. Shaik M, Ahmad S, Gan S, Abuzenadah A, Ahmad E, et al. How do Periodontal Infections affect the Onset and Progression of Alzheimer's Disease?. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;1(3):460-466.
22. Kamer A, Craig R, Dasanayake A, Brys M, Glodzik-Sobanska L, de Leon M. Inflammation and Alzheimer's Disease: Possible role of Periodontal Diseases. *Alzheimer's Dement*. 2008;4(4):242-250.
23. Papapanou P, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(20):S162-S170.
24. Social. MdSyP, Consultoria. CNd. Estudio Nacional de Salud Bucal. Bogota; 2013.
25. Singhrao S, Harding A, Simmons T, Robinson S, Kesavalu L, Crean S. Oral Inflammation, Tooth Loss, Risk Factors, and Association with Progression of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2014;42:723-737.
26. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich Y, Vernal R, et al. Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases. *J Appl Oral Sci*. . 2015;23(3):329-355.
27. Ford P, Gamonal J, Seymour. Immunological differences and Similarities between Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis. *Periodontology 2000*. 2010;53:111-123.

28. Uppoor A, Lohi H, Nayak D. Periodontitis and Alzheimer's Disease: Oral Systemic link still on the rise?. *Gerodontology*. 2013;30(3):239-242.
29. Singhrao S, Harding A, Poole S, Kesavalu L, Crean J. Porphyromonas Gingivalis Periodontal Infection and Its Putative Links with Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm*. 2015.
30. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich K. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr Pharm Des*. 2009;15(21):2377-2392
31. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in Periodontal health and Disease. *Rev Oral Biol Med*. 1998;9:248-266.
32. Noh M, Jung M, Kim S, Lee S, Park K, Kim D, et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the Gingival tissue of Patients with Periodontitis. *Exp Ther Med*. 2013;6(3):847-851.
33. Loss B. Systemic effects of Periodontitis. *Int J Dent Hygiene*. 2006;4(1):34-38.
34. Mengel R, Bacher M, Flores-De-Jacoby L. Interactions between stress, Interleukin-1beta, Interleukin-6 and Cortisol in Periodontally Diseased Patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29:1012-1022.
35. Minciullo P, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch. Immunol. Ther. Exp*. 2015;64(2):111-126.
36. Palmeri M, Misiano G, Malaguarnera M, Forte G, et al. Cytokine Serum Profile in a Group of Sicilian Nonagenarians. *J Immunoassay Immunochem*. 2012;33(1):82-90.
37. Giovannini S, Onder G, Liperoti R, Russo A, Carter C, Capoluongo E, et al. Interleukin-6, C-reactive Protein, and Tumor Necrosis Factor-Alpha as Predictors of

Mortality in Frail, Community-living Elderly Individuals. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(9):1679-1685.

38. Ciaramella A, Bizzoni F, Salani F, Vanni D, Spalletta G, et al. Increased Pro-Inflammatory Response by Dendritic Cells from Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2010;19(2):559-572.

39. Magaki S, Mueller C, Dickson C, Kirsch W. Increased Production of Inflammatory Cytokines in mild Cognitive Impairment. *Exp Gerontol.* 2007;42(3):233-240.

40. Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, et al. Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014.

41. Vélez Marín V, Ángel P, Claudia S, García Moreno L. Interleukin-17: Characteristics, Differentiation pathways, Signaling and Biological functions. *Latreia.* 2007;20(2):186-195.

42. Yücel O. Inflammatory Cytokines and the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Immunome Res.* 2015;11(2):1.

43. Arief E, Mubin M, Zainuddin S, Abdullah N, Ahmad B. Serum interleukin-17 (IL-17) in chronic periodontitis patients. *Padjadjaran J Dent.* 2017;29(3):138-142.

44. Johnson I. Age-related Neurodegenerative Disease Research needs aging Models. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:168.

45. Tonsekar P, Jiang S, Yue G. Periodontal Disease, Tooth loss and Dementia: Is there a link? A systematic review. *Gerodontology.* 2017;34(2):1-13.

46. Olsen I, Singhrao S. Can Oral Infection be a risk factor for Alzheimer's Disease? *J Oral Microbiol.* 2015;17(7):29-143.

47. Ventura M, Casciaro M, Gangemi S, Buquicchio R. Immunosenescence in aging: between immune cells Depletion and Cytokines up-regulation?. *Clin Mol Allergy*. 2017;15:21.
48. Kamer A, Pirraglia E, Tsui W, Rusinek H, Vallabhajosula S, et al. Periodontal Disease Associates with higher brain Amyloid load in Normal Elderly. *Neurobiol Aging*. 2014:1-7.
49. Heneka M, Carson M, Khoury J, Landreth G, Brosseron F, Feinstein D, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
50. Wang W, Tan M, Yu J, Tan L. Papel de las Citoquinas Proinflamatorias liberadas de la Microglia en la Enfermedad de Alzheimer. *Ann Transl Med*. 2015;3(10):136.
51. Chen J, Jiang G, Li Q, Zhou Z, Cheng Q. Increased Serum Levels of Interleukin-18, -23 and -17 in Chinese Patients with Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2014;38:321-329.
52. Stein P, Desrosiers M, Donegan S, Yepes J, Kryscio R. Tooth loss, Dementia and Neuropathology in the Nun study. *J Am Dent Assoc*. 2007;138(10):1314-1322.
53. Hatipoglu M, Kabay S, Güven G. The Clinical Evaluation of the Oral Status in Alzheimer-type Dementia Patients. *Gerodontology*. 2011;28(4):302-306.
54. Al-Shammari K, Al-Khabbaz A, Al-Ansari J, Neiva R, Wang H. Risk indicators for Tooth loss due to Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2005;76(11):1910-1918.
55. Johnson G, Guthmiller J. The Impact of Cigarette Smoking on Periodontal disease and Treatment. *Periodontol 2000*. 2007;44(1):178-194.
56. Prince M. The Global Impact of Dementia: an Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. *World Alzheimer Report 2015*. 2015.

57. Social. MdSyP. IV Estudio Nacional de Salud bucal (ENSAB IV). 2013.
58. Amaral C, Luiz R, Leão A. The Relationship between Alcohol Dependence and Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2008;79(6):993-998.
59. Reynolds M. Modifiable risk factors in Periodontitis: at the intersection of aging and Disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):7-19.
60. Al-Ghurabei B, et al. Clinical Relevance of IL-1 β /IL-10 and TNF- α /IL-10 ratio in Chronic Periodontitis Patients. *Int J Recent Sci Res*. 2013;4(3):275 -277.
61. Wu Y, Hsu J, Wang H, Wu S, Hong C, Cheng I. Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2015;5(3):424-434.
62. Hamdan A, Melconian A, Adhia A, Alhaidary A. The level of IL-1 β , IL-10 and IL-17A in Alzheimer's Disease Patients: Comparative Study. *J Baghdad for Sci*. 2014;11:1486-1492.
63. Martande S, Pradeep A, Singh S, Kumari M, Suke D, et al. Periodontal Health Condition in Patients With Alzheimer's Disease. *Am J of Alzheimer's Dis Other Demen*. 2014;29(6):498-502.
64. Martorana A, Bulati M, Buffa S, Pellicanò M, Caruso C, et al. Immunosenescence, Inflammation and Alzheimer's Disease. *Longev Healthspan*. 2012.

13 ANEXOS

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 su grado de avance, para así poder 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 enfermedad de Alzheimer, con el fin de aportar al conocimiento que se tiene de la enfermedad y tener una referencia para futuras investigaciones.

Procedimiento a realizar: Si usted acepta participar, se le realizará una encuesta con algunos datos personales, posteriormente se hará una evaluación neurocognitiva por medio de una serie de pruebas que evalúan diferentes capacidades del cerebro a través de preguntas y ejercicios simples, después se realizará un examen del estado de sus encías y por último se extraerá una muestra de sangre de aproximadamente 10ml, para así, hacer un análisis genético de la muestra de sangre que permitirá 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
- 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.

ANEXO 2

Registro de periodontograma online. www.periotools.com Department of periodontology
 Periodontal chart Universitat Bern. Periodontal chart online

zmk bern
 Zahnmedizinische Klinik
 der Universität Bern

Department Of Periodontology
PERIODONTAL CHART

Date:

Patient Last Name: First Name: Date Of Birth:

Initial Exam Reevaluation Clinician:

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Mobility	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implant																
Furcation																
Bleeding on Probing																
Plaque	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Buccal

Lingual

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plaque																
Bleeding on Probing																
Furcation																
Note																

Mean Probing Depth = 0 mm Mean Attachment Level = 0 mm 0% Plaque 0% Bleeding on Probing

Note:

Furcation:

Bleeding on Probing:

Plaque:

Gingival Margin:

Probing Depth:

Lingual

Buccal

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plaque																
Bleeding on Probing																
Furcation																
Implant																
Mobility																

48 47 46 45 44 43 42 41 20 19 18 17 16 15 14 13

www.periotools.com Copyright © 2016 by Department of Periodontology, University of Bern, Switzerland