



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Loïc Montaurier

A doença periodontal como um dos fatores de desenvolvimento da doença de Alzheimer

Revisão integrativa

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária
(Ciclo Integrado)


Trabalho realizado sob a Orientação de

Maria Cristina De Paiva-Manso Trigo Cabral

Declaração de Integridade:

Eu, Loïc Montaurier, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Comunicações Científicas em Congressos na Forma de Poster



Utilização da Fibrina Rica em Plaquetas na regeneração do tecido periodontal

Montaurier.L¹, Mahdaoui.S¹, Monteiro.L², Costa.R³, Salazar.F⁴

¹Aluno do 5º ano do MIMD do IUCS; ²Professor Auxiliar do IUCS; ³Monitor Clínico do IUCS; ⁴Professor Associado do IUCS

Introdução

Objetivo

Materiais e Métodos

Resultados

O principal objetivo do tratamento periodontal abrangente é eliminar a inflamação e evitar a destruição adicional do periodonto, bem como alcançar uma condição sustentável a longo prazo. Ao longo das últimas décadas, foram envidados esforços significativos para desenvolver tanto materiais como técnicas cirúrgicas que podem contribuir previsivelmente para a regeneração periodontal. Atualmente, a terapia periodontal regenerativa pode restaurar apenas uma parte do tecido original até certo ponto, enquanto a restauração periodontal completa permanece idealista. Os avanços na biologia celular e molecular contribuíram para uma maior compreensão da cicatrização de feridas. Há evidências de que o crescimento de polipeptídeos e fatores de diferenciação podem apoiar a cicatrização e regeneração de feridas através da regulação de quimiotaxia, diferenciação, proliferação de células e síntese de matriz. Introdução de concentrados de plaquetas autólogas como a Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) apresenta um novo período na aplicação periodontal de fatores químico-biológicos.

O objetivo deste poster é apresentar os FRP, perceber as suas utilizações e a sua mais-valia na perspectiva da regeneração dos tecidos periodontais.

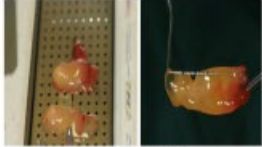
Assim foi efetuada uma pesquisa no Pubmed, usando os MeSH-terms ("Platelet-Rich Fibrin" AND "Guided Tissue Regeneration, Periodontal"). Foram encontrados 27 resultados. Após redução do período de publicação aos 2 últimos anos (2020-2021), este número foi reduzido a 9 artigos.

2 relatos de caso e 1 revisão foram excluídos, deixando 6 artigos de tipo ensaio clínico randomizado.

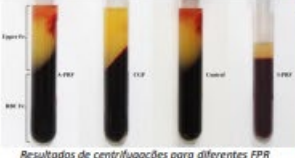
Discussão

Criação da FRP

O FRP é uma segunda geração de concentrados de plaquetas, introduzido por Choukroun et al. em 2001. É um produto natural e autogénico, obtido por centrifugação do sangue do paciente. Após a centrifugação, é recolhida a camada intermédia, um gel rico em fibrina com células agregadas, tais como plaquetas e leucócitos, e fatores de crescimento. Após a remoção da fracção restante de glóbulos vermelhos, coloca-se o coágulo numa gaze seca para remover o excesso de soro. Uma vez obtido o coágulo de PRF, este pode ser comprimido para formar uma membrana, utilizável como cobertura para a doença periodontal.



Preparo do coágulo de A-FRP




Resultados de centrifugações para diferentes FRP

Tipos de FRP

A FRP clássico foi centrifugado a 2700 rpm. Em 2014, reduzindo a velocidade de centrifugação para 1300 rpm é criado a Avançada- FRP, um coágulo mais suave contendo mais leucócitos e mais distribuídos. A A-FRP promove uma maior libertação de fatores de crescimento do que a FRP clássica, e assim pode influenciar diretamente a regeneração dos tecidos, aumentando a migração de fibroblastos, proliferação e nível do ARNm de colágeno. Descendo ainda a 700 rpm e centrifugando menos tempo (3 minutos) uma versão líquida de FRP pode ser obtida, a Injetável-FRP. Por outro lado, acelerando a centrifugação, alternando entre 2400 e 3000 rpm, obtém-se o Fator de Crescimento Concentrado (FCC), que é caracterizado pela presença de fatores de crescimento concentrados abundantes e a sua fibrina muito mais rígida.

Ação da FRP

A FRP promove a proliferação celular de osteoblastos, mas suprime o crescimento de células epiteliais orais. A FRP promove também a proliferação e migração de fibroblastos gengivais humanos, células-tronco do ligamento periodontal humano e células-tronco derivadas da medula óssea humana. É um produto autólogo e não induz uma reação inflamatória no local do enxerto. A FRP exibe uma libertação sustentada significativa de fatores-chave de crescimento derivado de plaquetas para pelo menos 1 semana e até 28 dias. Mecanicamente, a rede de fibrina promove não só a formação de coágulos sanguíneos, mas também mecanismos de reparação de tecidos adequados para uso como material bioativo para regeneração periodontal.



Comparação e eficácia das FRP

Baseando nos parâmetros de Profundidade de Sondagem (PS) e Perda de Aderência Clínica (PAC), o FRP foi julgado mais eficaz na regeneração óssea que só a incisão e limpeza, segundo Milutinovic et al. No entanto, os resultados não foram considerados estatisticamente significativos.

O Derivado da Matriz de Esmalte (DME) foi introduzido para melhorar a regeneração periodontal imitando a formação de tecidos de fixação periodontal há mais de 20 anos. Desempenha um papel importante como barreira química e mediadores biológicos na regeneração e cicatrização periodontais. O DME não é um tipo de FRP. Segundo Csifó-Nagy et al., a nova geração de FRP comporta-se de forma tão eficaz quanto o DME no tratamento cirúrgico de perda óssea periodontal. Com base nos resultados de 6 meses, ambos os métodos resultaram em resultados comparáveis.

Entre a A-FRP e o FCC, e segundo Lei, Yu et al., a matriz de fibrina altamente coesiva do FCC fornece proteção contra a degradação da plasmina, resultando em maior resistência à tração da fibrina e estabilidade. Por outro lado, a centrifugação de baixa velocidade recomendada para a preparação A-FRP não poderia fracionar claramente a parte dos eritrócitos, levando a uma estrutura mais frouxa com mais espaço interfibriloso, o que poderia ser melhor para o crescimento de células e tecidos. No entanto, não diferencia foi notada entre os resultados de tratamentos com FCC ou A-FRP, os dois foram considerados eficazes.

No tratamento cirúrgico da perda de tecido ósseo, o primeiro passo é uma incisão da gengiva na óptica de acesso ao espaço do osso reabsorvido (A e B). Retira-se então o tecido de granulação e o tartarço e, após uma limpeza, aplica-se o enxerto de FRP (C - aqui uma mistura FRP e bioosso). Dependendo da técnica, pode ser um coágulo de PRF ou uma mistura, por exemplo, com um mineral de osso bovino desprotegido. Neste último caso, adiciona-se então uma membrana de PRF por cima do enxerto e depois uma membrana de colágeno absorvível (D). Finalmente fazemos as suturas das papilas gengivais (E e F). Nas radiografias, vemos o controlo pré-operatório (G) e 6 meses depois (H).

Conclusão

A FRP, pelo seu acessibilidade e custo, apresenta uma oportunidade no contexto da regeneração periodontal. Mesmo se hoje em dia não apresenta características superiores aos outros materiais, a facilidade de criar derivados e seu mecanismo de ação é uma pista de pesquisa pelo futuro.

Bibliografia

Csifó-Nagy BK, Sölgem E, Bagán V, Nevelló A. (2017). Efficacy of a new-generation platelet-rich fibrin in the treatment of periodontal intrabony defects: a randomized clinical trial. BMC Oral Health. 2022 Nov 15;22(1):580. doi: 10.1186/s12903-022-02851-1. PMID: 36780915. PMC6809715.

Pham TAV. INSTABILITY OBSERVED TREATMENT WITH PLATELET-RICH FIBRIN, GUIDED TISSUE REGENERATION AND OPEN-FLAP DEBRIDEMENT: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL. J Endovasc Dent Pract. 2021 Sep 23(9):101-145. doi: 10.11607/jendod.2021.10145. PMID: 34479679.

Ustunoglu G, Ullal Arifin Z, Ozcelik F. Comparison of GTR, FRP and open-flap debridement in the treatment of intrabony defects with endo-gene lesions: a randomized controlled trial. Med Oral Patol Oral Cy Biocel. 2020 Jan 1;25(1):17-41. doi: 10.4317/medoral.2019.23231. PMID: 31880284. PMC6982960.

Lei L, Yu Y, Han L, Shi D, Sun W, Zhang Y, Chen L. Identification of growth factors in advanced platelet-rich fibrin and concentrated growth factors and their clinical efficacy as adjunctive to the GTR procedure in periodontal intrabony defects. J Periodontol. 2020 Apr 16;91(4):462-472. doi: 10.1002/JPER.19-0280. Epub 2019 Nov 17. PMID: 31471500.

Paolantonio M, Di Tullio M, Scattolon M, Spantano L, Scocardi L, Padellaro G, Graziani F, Pilloni A, De Nisi P, Ferrarelli B. Periodontal regeneration by leukocyte and platelet-rich fibrin with autogenous bone graft or autogenous bone matrix derivative with autogenous bone graft in the treatment of periodontal intrabony defects: A randomized non-inferiority trial. J Periodontol. 2020 Dec 1;91(12):1595-1606. doi: 10.1002/JPER.19-0532. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32294284.

Milutinovic L, Pucelj M, Kuzmanovic B, Nacivkovic M, Anastasicovski S, Ivancicova-Sajkovic M. Evaluation of PRF Efficiency in the Treatment of Infrabony Defects. JHJ (Maklodon Akad Nauk Univerzita Med Nauc). 2020; 1(1):11-15. doi: 10.2478/jhjhj-2020-0015. PMID: 32573874.



EVENTOS
CIENTÍFICOS
IUCS

JORNADAS
CIENTÍFICAS
AEIUCS

XXX
JORNADAS CIENTÍFICAS
DE CIÊNCIAS DENTÁRIAS

DIPLOMA

O Presidente das XXX Jornadas Científicas de Ciências Dentárias certifica que:

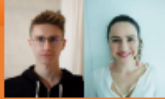
Montaurier.L, Mahdaoui.S, Monteiro.L, Costa.R, Salazar.F

apresentaram um trabalho científico sob a forma de E-poster intitulado, “**Utilização da Fibrina Rica em Plaquetas na regeneração do tecido periodontal**” no âmbito das XXX Jornadas subordinadas ao tema “Workflow digital nas distintas frentes de ação da Medicina Dentária”, que decorreram no dia 08 de abril de 2022, no Centro de Congressos da Alfândega do Porto.

PROF. DOUTOR JOAQUIM MOREIRA
PRESIDENTE DAS XXX JORNADAS CIENTÍFICAS DE CIÊNCIAS DENTÁRIAS



Porphyromonas gingivalis na doença de Alzheimer



Montaurier L.¹, Rocha C.¹, Cabral C.², Costa R.³, Reis C.²

¹Alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária

²Professora auxiliar do IUCS,

³Monitor clínico do IUCS



1-INTRODUÇÃO

A periodontite ativa é associada à presença da bactéria patogénica *Porphyromonas gingivalis* (Pg). A PG manifesta-se na doença de Alzheimer (DA) levando a altas concentrações de ferro que se correlacionam com a deterioração cognitiva derivada da deposição de placas beta amiloide, hiperfosforilação de proteínas Tau e a neurotoxicidade. Uma melhor compreensão dos mecanismos patogénicos da bactéria na periodontite e na DA permitiria uma melhor prevenção dos dois.

2-OBJETIVO

✓ Demonstrar a influência da bactéria Pg na periodontite e na DA.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

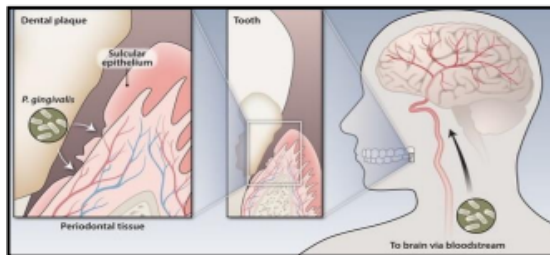
Utilizamos a base de dados Pubmed com as palavras-chaves: “periodontitis”, “Alzheimer”, “Porphyromonas gingivalis”, “dementia”, “mice”, “biofilm” nas últimas dez anos.

4-RESULTADOS

Obtivemos 150 artigos que após os critérios de exclusão, nomeadamente estudos in vitro ou em animais, tratamentos experimentais, artigos com outra língua além do inglês ou fora do âmbito deste tema selecionamos 11.

4-DISCUSSÃO

Imagem 1- Esquema da circulação do Pg do periodonto ate o cérebro passando pela circulação sanguínea



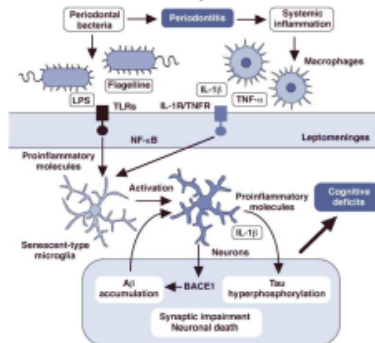
Fonte: Aydin, M. (2020). Porphyromonas Gingivalis and Alzheimer's Disease: Recent findings and potential therapies. Journal of Periodontology. doi:10.1002/jper.20.008

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa ainda incurável do tecido cerebral que provoca a perda progressiva e irreversível das funções mentais e, nomeadamente, da memória, e é bem conhecida por ser a primeira causa de demência em todo o mundo, enquanto a Pg, uma bactéria gram-negativa oportunista anaeróbia, é o principal responsável da periodontite.

Esta bactéria devido à cápsula de carboidrato que possui na superfície externa e da presença de lipopolissacarídeos (LPS), impede a opsonização pelo complemento e inibe a fagocitose e a morte pelos neutrófilos. Através dos lipopolissacarídeos a Pg induz a produção de citocinas inflamatórias pelo hospedeiro, tais como as interleucinas IL-1β, IL-6 e IL-8.

Estas interleucinas promovem a destruição do tecido periodontal e a reabsorção de osso alveolar. A bactéria nutre-se do ferro que permite a estabilização da infeção e modifica a microbiota oral.

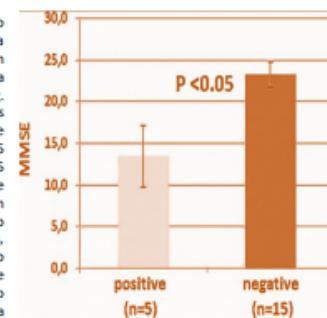
Imagem 2- Esquema da cascata de sinais inflamatórios provocada pelas bactérias periodontais através das leptemeninges e da sua influência na doença de Alzheimer



Fonte: Wu, Z., Nakashiki H. Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptemeningeal cells. J Pharmacol Sci. 2004;194(1):1-11. doi: 10.1002/jps.10000

Segundo a imagem 2, durante a periodontite crónica, as LPS, a flagelina das bactérias periodontais, os IL-1β e a TNF-α produzidos pelos macrófagos vão ativar os recetores das leptemeninges que, por sua vez vão ativar as células da microglia. Estas células ativadas produzem IL-1β que promove a acumulação de Aβ através da estimulação da proteína BACE1 levando à hiperfosforilação das proteínas Tau, dois mecanismos bem conhecidos da DA. Isto leva à morte dos neurónios e assim uma perda das capacidades cognitivas.

Gráfico 1- Resultados dos testes cognitivos “Mini Mental Test Examination”- MMSE realizados em pacientes com Alzheimer correlacionado a presença da bactéria P.Gingivalis na saliva



Num estudo conduzido por Leblhuber et al., a saliva de pacientes com Alzheimer foi analisada para a presença de Pg. Depois da deteção, os dois grupos de pacientes, com (5 pacientes) e sem (15 pacientes) presença de Pg na saliva, foram testados para avaliação das funções cognitivas, o MMSE teste. O grupo não atingido por Pg teve melhor resultados, o que leva a concluir que a presença de Pg agrava os sintomas clínicos da deficiência mental na DA.

5-CONCLUSÃO

Podemos concluir que a bactéria Pg manifesta-se na periodontite e na DA com evidências clínicas e bioquímicas da sua ação de deterioração cognitiva no paciente com DA, uma vez que, esta bactéria atravessa o periodonto até o cérebro do paciente. Através de uma prevenção adequada da periodontite, é possível retardar ou melhorar a progressão exponencial da DA. Os quelantes são a medicação de eleição dos pacientes com DA, pois removem o excesso de ferro no sangue que serve de nutriente à bactéria. A proteína BACE1 também poderia ser um alvo terapêutico no futuro, uma vez que, é responsável pela formação de placa Aβ e demonstrou uma ausência de sintomas patológicos em ratos saudáveis sem o gene da proteína.

6-BIBLIOGRAFIA

1. Fiorillo L, Gnanini G, Laine M, d'Amico F, Messori R, Tacchini F, et al. Porphyromonas Gingivalis, Periodontitis and Systemic Implications: A Systematic Review. Dent J (2018). doi: 10.3390/dj1802018
2. Guo Y, Nguyen H-A, Potempa L. Disruption of Gingipain Action at Virulence Factors: From Cleaving Substrate With the Precision of a Surgeon's Knife to a Meat Chopper-Like Brutal Degradation of Protein. Periodontol 2000 (2020) 64:20-44. doi: 10.1111/j.1600-0757.2020.02877.x
3. de Diego I, Villalón F, Szulcowski MN, Guevara T, Potempa R, et al. Structure and Mechanism of Cysteine Peptidase Gingipain R (Gp). A Major Virulence Factor of Porphyromonas Gingivalis Periodontitis. J Biol Chem (2014) 289:32290-302. doi: 10.1074/jbc.M114.002912
4. Bostanci N, Bellackas GN. Porphyromonas Gingivalis: An Invasive and Invasive Opportunistic Oral Pathogen. FEMS Microbiol Lett (2012) 333:3-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x
5. Jiang M, Zhang X, Yu X, Mizutani S, Kubozaki N, Wu L, Wu Z. (2002) is involved in promoting Alzheimer's disease pathologies following chronic systemic exposure to Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in amyloid precursor protein²³ knock-in mice. Brain Behav Immun. 2021 Nov;93:1-13. doi: 10.1016/j.bbi.2021.08.013. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34390446; PMCID: PMC8484864
6. Sadravani M, Bafna P, Abeni L. Linking mechanisms of periodontitis to Alzheimer's disease. Curr Opin Neurol. 2020 Apr;32(2):240-248. doi: 10.1097/WCO.0000000000000097. PMID: 32097126
7. Tsou YTA, Tang YJ, Kim HK, Kim HK, Cho H. Oral Pathogenic Bacterium-Induced Neurodegenerative Microglia in Human Neural Cell Platform. Int J Mol Sci. 2021 Jun 28;22(13):6825. doi: 10.3390/ijms22136825. PMID: 34252236; PMCID: 84252236
8. Olsen I. Porphyromonas Gingivalis May Seek the Alzheimer's Disease Brain to Acquire Iron from Its Sargurus. J Alzheimers Dis Rep. 2021 Jan 20;5(1):79-86. doi: 10.3233/JADR-202072. PMID: 33881719; PMCID: PMC7950507
9. Wu Z, Nakashiki H. Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptemeningeal cells. J Pharmacol Sci. 2004;194(1):9-13. doi: 10.1046/jps.10000. Epub 2004 Aug 28. PMID: 20148886
10. Leblhuber F, Mueller J, Steiner K, Gostner JM, Fuchs D. Knock-on effect of periodontitis to the pathogenesis of Alzheimer's disease? Wien Klin Wochenschr. 2020 Sep;132(17-18):699-698. doi: 10.1007/s00508-020-03689-5. Epub 2020 Mar 25. Brain Res. doi: 10.1016/j.brres.2020.04.014. PMID: 32215721; PMCID: PMC7190002
11. Rydel M. I. (2020). Porphyromonas Gingivalis and Alzheimer's Disease: Recent findings and potential therapies. Journal of Periodontology. doi:10.1002/jper.20-0104



EVENTOS
CIENTÍFICOS
IUCS

JORNADAS
CIENTÍFICAS
AEIUCS

XXX
JORNADAS CIENTÍFICAS
DE CIÊNCIAS DENTÁRIAS

DIPLOMA

O Presidente das XXX Jornadas Científicas de Ciências Dentárias certifica que:

Montaurier.L, Rocha.C Cabral.C, Costa.R, Reis.C

apresentaram um trabalho científico sob a forma de E-poster intitulado, **"Porphyromonas gingivalis na doença de Alzheimer"** no âmbito das XXX Jornadas subordinadas ao tema "Workflow digital nas distintas frentes de ação da Medicina Dentária", que decorreram no dia 08 de abril de 2022, no Centro de Congressos da Alfândega do Porto.

PROF. DOUTOR JOAQUIM MOREIRA
PRESIDENTE DAS XXX JORNADAS CIENTÍFICAS DE CIÊNCIAS DENTÁRIAS



Resumo:

Introdução: A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa com uma forte prevalência em todo o mundo, e para a qual não existe cura. A doença periodontal, uma das doenças crónicas humanas mais prevalentes, consiste na invasão e destruição das estruturas periodontais por microrganismos patogénicos.

Achados recentes identificaram a doença periodontal como um fator de risco no desencadeamento da doença de Alzheimer, com *Porphyromonas gingivalis* como a ligação entre essas doenças.

Objetivo: O objetivo desta revisão integrativa é reunir os achados científicos destes cinco últimos anos, a fim de avaliar a correlação entre as duas doenças, em que medida a doença periodontal é um fator etiológico da doença de Alzheimer e para compreender os mecanismos desta ligação.

Material e métodos: A pesquisa foi realizada no PubMed, utilizando os MeSH-terms "Periodontite", "Doença de Alzheimer" e "Porphyromonas gingivalis". Foram excluídos artigos anteriores ao período 2017-2022 e artigos de revisão. Foram selecionados 24 artigos para este estudo.

Resultados: A associação das duas doenças em humanos é estatisticamente significativa, com provas de que a doença periodontal exacerba os sintomas da doença de Alzheimer.

O fator de associação é a *Porphyromonas gingivalis*, que pode migrar dos tecidos gengivais para o cérebro, onde segrega metabólitos tóxicos como lipopolissacarídeos, *gingipains* e ceramidas.

Conclusão: Mesmo que os estudos considerados apresentem muitas divergências nas metodologias, a doença periodontal pode ser considerada como um fator de desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer, Doença periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, *Gingipains*

Abstract:

Introduction: Alzheimer disease is a neurodegenerative affliction with a strong prevalence worldwide, and for which it exists no cure.

The periodontal disease, one of the most prevalent of the human chronic illnesses, consists in the invasion and destruction of the periodontal structures by pathogenic microorganisms.

Recent findings identified the periodontal disease as a risk factor in the triggering of the Alzheimer disease, with *Porphyromonas gingivalis* as the link between those diseases.

Objective: The point of this integrative revision is to gather the scientific findings of this five last years in order to assess the correlation between the two diseases, to what extend is the periodontal disease an etiological factor of the Alzheimer disease and to understand the mechanisms of this link.

Material and methods: The research was conducted on PubMed, using the MeSH-terms “Periodontitis”, “Alzheimer Disease” and “Porphyromonas gingivalis”. Articles out of the 2017-2022 period and revision articles were excluded. 24 articles were selected for this study.

Results: The association of the two diseases in human is statistically significant, with proofs that the periodontal disease exacerbates the symptoms of the Alzheimer disease.

The factor of association is *Porphyromonas gingivalis*, which can migrate from the gingival tissues to the brain, where it secretes toxic metabolites like lipopolysaccharides, *gingipains* and ceramides.

Conclusion: Even if the considered studies present a lot of divergences in the methodologies, the periodontal disease can be considered a factor of development of the Alzheimer disease.

Keywords: Alzheimer disease, Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, *Gingipains*



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



Índice:

Introdução:	1
Objetivo:	4
Materiais e métodos:	6
Fluxograma das pesquisas.....	9
Resultados	11
Tabela dos resultados	14
Discussão:	27
1. Expressão genética na DA	28
2. Efeito da doença periodontal nos tecidos cerebrais.....	29
3. Efeito da <i>Pg</i> nos tecidos cerebrais	32
a. Efeito específico dos lipopolissacarídeos da <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33
b. Efeito específico das <i>gingipains</i>	36
c. Efeito específico da ceramida produzida pela <i>Porphyromonas gingivalis</i>	37
d. Influência do serotipo da <i>Porphyromonas gingivalis</i> na sua patogenicidade.....	38
4. Via da migração bacteriana até os tecidos cerebrais.....	39
Conclusão:	40
Bibliografia:	42



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



Glossário e abreviaturas:

A β : Amiloide- β

APP: Amiloide- β Precursor Proteína

CatB: Cathepsin B

DA: Doença de Alzheimer

DP: Doença Periodontal

ENF: Emaranhados neurofibrilares

IL: interleucinas

Kgp: lisina-gingipain

LCR: líquido cefalorraquidiano

LPS: Lipopolissacarídeos

MMSE: Mini Mental State Examination

NEP: Neprilisina

Pg: Porphyromonas gingivalis

PGDHC: PhosphoGlycerol DiHydroCeramide

PgLPS: Lipopolissacarídeos produzidos pela *Porphyromonas gingivalis*

PP2A: proteínas fosfatase 2A

pTau: proteínas Tau fosforiladas

Rgp: arginina-gingipain

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

Introdução:

A demência é uma patologia em que há deterioração na função cognitiva além do que se poderia esperar das consequências habituais do envelhecimento biológico. Atualmente, mais de 55 milhões de pessoas vivem com demência em todo o mundo, e há quase 10 milhões de novos casos por ano. A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e pode contribuir para 60-70% dos casos [1].

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada por duas lesões microscópicas: as placas amiloide- β ($A\beta$) e os emaranhados neurofibrilares (ENF) [2, 3]. As placas $A\beta$ são formações insolúveis de péptidos $A\beta$, enquanto os ENF são agregações intracelulares de proteínas Tau híperfosforiladas. As proteínas Tau são proteínas associadas aos microtúbulos do neurónio e são naturalmente presentes no citoplasma dele. A híperfosforilação conduz à agregação das proteínas Tau, formando os ENF [4]. Os pacientes com DA também apresentam uma neuroinflamação associada à ativação da microglia e astrócitos. Esta neuroinflamação tem uma ligação direta com o desenvolvimento das placas $A\beta$ e ENF, e é assim parte integrante das características da DA [2].

Os mecanismos de união destes fatos ainda não são completamente conhecidos. A hipótese da “cascada amilóides” começa com o acúmulo de peptídeos $A\beta$, que induz uma resposta inflamatória da microglia que ativa astrócitos, desencadeando um desequilíbrio molecular que leva à hiperfosforilação das proteínas Tau nos neurónios [3]. Uma outra hipótese mais recente coloca a “neuroinflamação crónica” como origem da produção de peptídeos $A\beta$ [3]. Esta hipótese sugere que a neuroinflamação, através da ativação da glia (astrócitos + microglia), se situa no centro do mecanismo de desencadeamento da DA. A neuroinflamação pode ser detetado com a presença de fatores quimiotáticas tais como as interleucinas (IL) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF α) [4].

Aproximadamente, 98% de todos os casos de DA são esporádicos, ou seja, aparecem em indivíduos de maneira isolada considerando o histórico de doenças na família, sugerindo que os fatores ambientais desempenham um papel crítico em causar a DA [5]. De acordo com esta constatação e a hipótese da “neuroinflamação crónica”, convém orientar estudos e tratamentos para perceber e prevenir causas ambientais desta neuroinflamação.

As doenças periodontais (DP) afetam os tecidos que circundam e sustentam os dentes. Manifestam-se por sangramento e/ou edema das gengivas e, por vezes, mau hálito. Nas formas mais graves, a reabsorção óssea e a destruição do ligamento periodontal criam bolsas que provocam a mobilidade dos dentes e posteriormente a sua perda. As principais causas são a má higiene oral, o tabagismo e o diabetes. [6]

A DP é uma das doenças crónicas humanas mais prevalentes, que afeta a resposta imunológica do hospedeiro e dos tecidos periodontais [2]. Esta doença tem como origem uma microbiota subgingival disbiótica. A *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), uma bactéria anaeróbia Gram-negativa, tem sido identificado como um patógeno chave nesta microbiota disbiótica. A *Pg* apresenta uma grande variedade de fatores de virulência, que têm papéis importantes na adesão bacteriana, colonização e invasão. Entre os fatores de virulência descritos para *Pg*, os mais importantes são as *gingipains*, que são proteases, e os lipopolissacarídeos (LPS) [3, 7].

A *Pg* pode destruir os tecidos periodontais e distribuir-se em diferentes órgãos e tecidos onde por ter uma influência patológica [3]. Por exemplo, enquanto *Pg* pode se encontrar em pequena quantidade em 25% dos humanos saudáveis, por outro lado 100% dos pacientes com doença cardiovasculares têm colonização arterial por *Pg* [7].

Se o risco de desenvolver cardiopatias por causa da má saúde oral é hoje bem conhecido na comunidade científica, a influência da periodontite sobre o desenvolvimento da DA é uma descoberta relativamente recente. Com efeito, a periodontite e a infeção por *Pg* foram identificadas como fatores de risco significativos para o desenvolvimento dos marcadores associados à DA [7].

Atualmente não existe tratamento para curar a demência. Os medicamentos contra a demência e as terapias até hoje têm eficácia limitada [1]. Neste contexto, a prevenção fica a ser a melhor solução contra a DA, e se estudos acertam a ligação entre DP e DA, a importância dos cuidados orais e periodontais para prevenir o aparecimento da DA aumentará. Além disso, perceber os mecanismos da ligação entre essas duas doenças fornece novas pistas de tratamento e de prevenção para ambos.



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Objetivo:

O objetivo principal desta dissertação é verificar, através da revisão integrativa da literatura científica, se a doença periodontal é verdadeiramente um fator de influência no desenvolvimento da doença de Alzheimer.

No caso que se verifica a ligação entre as duas doenças, se a DP é um fator etiológico que provoca a DA ou se é só um fator de agravamento numa DA já existente.

Para atingir esses objetivos, veremos os mecanismos, nomeadamente bacteriológicos e químicos, que são responsáveis desta ligação.



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Materiais e métodos:

A pesquisa bibliográfica foi realizada de acordo com a metodologia PICO para estudos quantitativas (População, Interesse, Contexto), com finalidade de responder à seguinte questão:

“Qual é a influência da doença periodontal no desenvolvimento da doença de Alzheimer?”

PICO	
População	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes com DP, com ou sem DA • Ratos saudáveis e/ou ratos “modelos da DA”
Interesse	<ul style="list-style-type: none"> • Aparecimento de lesões características da DA • Agravamento dos sintomas da DA • Fatores etiológicos dos sintomas da DA
Contexto	<ul style="list-style-type: none"> • Achados recentes identificaram a doença periodontal como um fator de risco no desencadeamento da DA • Por razões éticas as populações da maioria dos estudos são em ratos • A <i>Pg</i> é a bactéria responsável da ligação entre as duas doenças.

Critérios de exclusão:

- Artigos publicados antes de 2017
- Artigos de revisões
- Meta-análises
- Dissertações e teses
- Artigos num idioma diferente do inglês, francês ou português
- Artigos não disponíveis na íntegra
- Artigos que não abordam a DP
- Artigos que só abordam a problemática no sentido da DA como fator de risco da DP
- Artigos só tratando dos fatores de risco genéticos das duas doenças

Critérios de inclusão:

- Artigos publicados entre 2017 e 2022
- Artigos de tipos caso-controlo, estudos de coorte, estudos de prevalência e testes laboratórios
- Artigos em francês, inglês ou português
- Artigos disponíveis na íntegra
- Artigos abordando a problemática da DP ou da *Pg* como fator de desenvolvimento da DA

As pesquisas foram realizadas no PubMed, usando MeSH terms de acordo com o nosso assunto:

- Periodontitis
- Alzheimer Disease
- Porphyromonas gingivalis

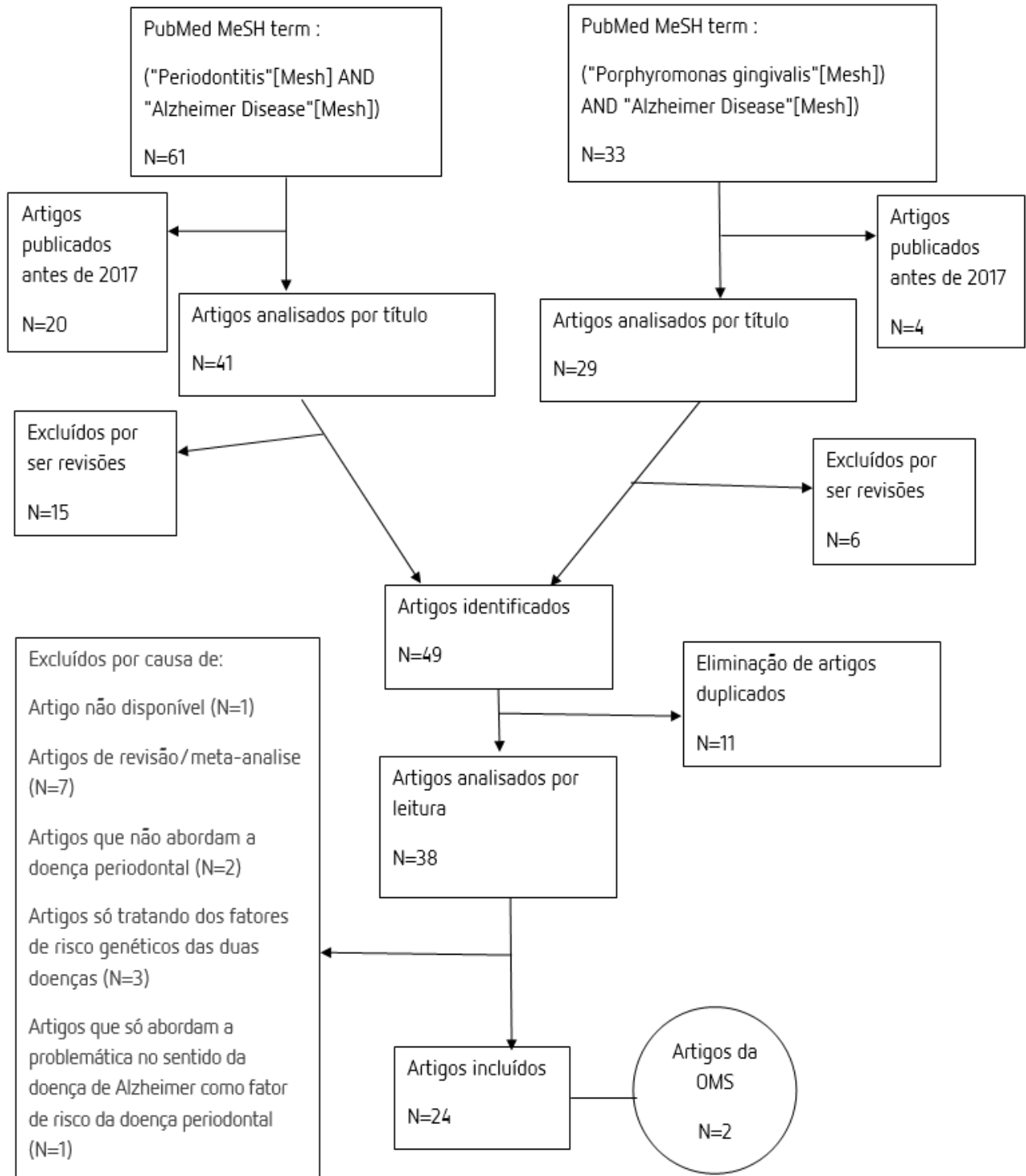
No PubMed usando os MeSH-terms «Periodontitis» e «Alzheimer Disease»: 61 artigos foram encontrados, 41 publicados a partir de 2017. 15 artigos foram excluídos por serem de revisão.

Na leitura destes artigos, a *Porphyromonas gingivalis* foi identificada como o fator patogénico em causa na ligação das doenças. Foi assim efetuada uma nova pesquisa, sempre no PubMed, usando os MeSH-terms «Porphyromonas gingivalis» e «Alzheimer Disease»: 33 artigos foram encontrados, 29 publicados a partir de 2017. 6 artigos foram excluídos por serem de revisão.

No conjunto dos 49 artigos assim identificados, 11 duplicados foram identificados, deixando 38 artigos a ser analisados por leitura.

Após aplicação dos critérios de exclusão, foram selecionados 24 artigos de tipos caso-controlo, estudos de coorte, estudos de prevalência e testes laboratórios. Também, 2 artigos da Organização Mundial da Saúde foram utilizados na introdução para definir as doenças.

Fluxograma das pesquisas:





Resultados

Os artigos incluídos neste estudo consistem em:

- 13 estudos experimentais
- 1 estudo longitudinal
- 2 estudos de coorte retrospectivas
- 1 estudo caso-controlo e experimental
- 4 estudos caso-controlo
- 2 estudos transversais
- 1 estudo transversal e experimental

A maioria dos resultados são artigos de tipo estudo experimentais. Nestes casos, a população estudada são ratos laboratórios, que podem ser saudáveis, modelos da doença de Alzheimer (através de modificação genética que provoca a produção de péptidos A β), diabéticos ou geneticamente modificados para não produzir Cathepsin-B (CatB). Os ratos também são diferenciados segundo a idade deles, nomeadamente entre “jovens” ou de “meia-idade”.

Nestes ratos é induzida a periodontite, ou os ratos são expostos diretamente ou indiretamente (através da injeção de produtos patogénicos de *Pg*) à bactéria *Pg*.

Depois os ratos são submetidos à testes cognitivos para avaliar clinicamente a influência da exposição na DA. Para uma análise histológica, química e/ou morfologia, os ratos são sacrificados e cortes dos seus tecidos a estudar são realizados.

Os estudos de caso-controlo, coorte e prevalência tentam de determinar se a periodontite ou a presença de *Pg* tem uma influência no desenvolvimento da DA. Assim, numa população humana de paciente com a DA é analisada a presença de periodontite ou de *Pg*, ou após o aparecimento da DA ou antes da DA graças a registos médicos no caso de estudos de *coorte* retrospectivas. Após a deteção da presença ou não deste fator de risco pode ser efetuada testes cognitivos para avaliar se o fator de risco tem uma influência negativa na DA.

Para a elaboração da discussão, os artigos foram repartidos segundo o(s) assunto(s) abordado(s):

- Artigos abordando as provas ao nível humano, através de análises estatísticas do aparecimento das duas doenças, testes cognitivos e salivares em pacientes DA e análises dos tecidos pós-morte (9 artigos)
- Artigo sobre o efeito da periodontite ao nível do tecido gengival, relativamente à fisiopatologia da DA, nomeadamente da ativação ou inibição dos genes implicados na DA (1 artigo)
- Artigos analisando as modificações nos tecidos cerebrais após indução da DP em ratos (2 artigos)
- Artigos explorando os efeitos da *Pg*, injetada diretamente ou aplicada numa DP, no cérebro de ratos (4 artigos)
- Após uma parte geral sobre a *Pg*, as partes seguintes se focalizam sobre cada elemento de virulência da bactéria e o seu efeito respetivo:
 - Os LPS da bactéria (5 artigos)
 - Os *gingipains* (2 artigos)
 - As ceramidas (1 artigo)
 - O serotipo da bactéria (1 artigo)
- Artigos apresentando hipóteses sobre a via da migração da *Pg* até o cérebro (2 artigos)

Alguns artigos abordam vários assuntos, e foram assim incluídos em várias categorias.



Tabela dos resultados

Título	Autor - Ano	Tipo de estudo	Resultado	Conclusão
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (W83) Infection Induces Alzheimer's Disease-Like Pathophysiology in Obese and Diabetic Mice [2]	Bahar.B <i>et al.</i> (2021)	Estudo experimental	Ratos diabéticos não desenvolvem placas amiloide Beta (A β) nem emaranhados neurofibrilares (ENF) na exposição de <i>Pg</i> W83 (uma versão da bactéria), mas desenvolvem neuro-inflamação na forma de microglia reativa. A imunopositividade anti-tau foi proeminente em axônios espessados de neurônios CA hipocampais e em células destes	Existência de co-morbidade entre o diabetes e a infecção por <i>Pg</i> . O metabolismo da insulina parece ter um efeito sobre a formação dos ENF e das A β , impede a formação deles. O <i>Pg</i> parece aumentar a resistência do cérebro à insulina
Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey [12]	Beydoun.MA <i>et al.</i> (2020)	Estudo longitudinal	Nos mais de 65 anos, incidência e mortalidade da DA foram associadas com DP, com <i>Pg</i> , <i>P.melaninogenica</i> e <i>C.Retus</i>	Evidencia da associação entre patógenos periodontais e a DA
Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study [11]	Chen.C-K <i>et al.</i> (2017)	Estudo de coorte retrospectiva	1.24% do grupo com periodontite crónica desenvolveu AD, contra 1.11% no grupo não exposto Paciente com periodontite crónica por mais de 10 anos apresentam um risco significativamente mais que o grupo não exposto	A exposição de 10 anos à periodontite crónica foi associada a um aumento de 1,707 vezes o risco de desenvolvimento de AD

<p>Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer's Disease or Vascular Dementia [10]</p>	<p>Choi.S <i>et al.</i> (2019)</p>	<p>Estudo de coorte retrospectiva</p>	<p>Follow up de 2005 até 2015, periodontite crónica diagnosticada entre 2003 e 2004. Associado à periodontite crónica, o risco relativo de demência é 1,06, risco relativo de AD é 1,05 Nota se que o risco relativo é mais importante entre pacientes com estilo de vida saudável (não fumadores, com atividade física e que não bebem)</p>	<p>A periodontite crónica pode ser associada com um maior risco de desenvolver demência</p>
<p>Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by <i>Porphyromonas gingivalis</i> in Wild Type Rats Is Serotype Dependent [3]</p>	<p>Díaz-Zúñiga.J <i>et al.</i> (2020)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Ratos infetados por <i>P. gingivalis</i> com sorotipos capsulares K1 ou K2 apresentaram perda óssea alveolar significativamente maior e resultados cognitivos fracos em comparação com ratos infetados por <i>P. gingivalis</i> com K4, GPA (<i>Pg</i> sem encapsulamento) e ratos controlos. Estes resultados clínicos são coerentes com a deteção da produção de citocinas e o ratio das proteínas tau fosforiladas (pTau) / não fosforiladas analisadas no hipocampo e no líquido cérebro espinal dos ratos (mais importante nos tipos K1 e K2). No entanto, a presença de <i>Pg</i> foi detetada nos todos grupos infetados (K1, K2, K4 e GPA)</p>	<p>Embora diferentes sorotipos de <i>P. gingivalis</i> possam atingir o cérebro, seus tipos capsulares particulares desempenham um papel central no ataque inflamatório crónico e comprometimento cognitivo induzido por infeção oral de curto prazo.</p>

<p><i>Porphyromonas gingivalis</i> in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors [7]</p>	<p>Dominy.SS <i>et al.</i> (2019)</p>	<p>Estudo caso-controlo e estudo experimental</p>	<p><i>Gingipains</i> em cérebros DA foi significativamente maior do que em cérebros de indivíduos controle O DNA de <i>Pg</i> foi identificado em cérebros de AD e líquido cefalorraquidiano de indivíduos vivos diagnosticados com provável DA, sugerindo que o DNA de <i>Pg</i> no líquido cérebro espinal pode servir como marcador de diagnóstico diferencial Pequenas moléculas inibidoras das gengipains potentes, seletivos e penetrantes no cérebro, foram desenvolvidos e testados <i>in vivo</i>. Os resultados indicam que a pequena molécula inibidora dos <i>gingipains</i> tem o potencial de modificar a DA</p>	<p>O tratamento com um inibidor potente e seletivo de Kgp (um dos 3 tipos de <i>gingipains</i>) reduzirá a infecção de <i>P. gingivalis</i> no cérebro e retardará ou impedirá a neurodegeneração e o acúmulo adicionais da patologia no paciente DA</p>
<p>Systemic Exposure to Lipopolysaccharide from <i>Porphyromonas gingivalis</i> Induces Bone Loss-Related Alzheimer's Disease-Like Pathologies in Middle-Aged Mice [20]</p>	<p>Gu.Y <i>et al.</i> (2020)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Em comparação com o grupo controlo, a perda óssea na tíbia (26% diminuição) e o declínio da memória (diminuição de 47%) foram induzidos em ratos com correlação positiva após exposição aos <i>Pg</i> Lipopolissacarídeos (LPS). Expressão das IL-6 e IL-17 foram negativamente relacionadas ao ratio volume osso/volume total dos tecidos na tíbia e à latência do teste de memória. No cérebro, IL-17 expressão na microglia foi relacionada com acumulação de péptidos Aβ42 (precursor das placas amiloides)</p>	<p>A exposição sistêmica crônica aos <i>Pg</i> LPS simultaneamente induz perda óssea dependente da inflamação e patologias semelhantes à DA, elevando os níveis das IL-6 e IL-17 a partir da meia idade, sugerindo que as bactérias periodontais induzem exacerbação da perda óssea e declínio da memória, resultando em progressão da DA.</p>

			nos neurónios	
Alzheimer's Disease-Like Neurodegeneration in <i>Porphyromonas gingivalis</i> Infected Neurons with Persistent Expression of Active Gingipains [24]	Haditsch.U <i>et al.</i> (2020)	Estudo experimental	Neurónios infetados in-vitro por <i>Pg</i> sobrevivem e apresentam acúmulo de vacúolos autofágicos e corpos multivesiculares, interrupção do citoesqueleto, aumento do ratio pTau/tau e perda de sinapse.	<i>P. gingivalis</i> pode invadir e persistir em neurônios maduros. Os neurônios infetados exibem sinais de neuropatologia semelhante à DA,
Continuous intracerebroventricular injection of <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharide induces systemic organ dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease [21]	Hayashi.K <i>et al.</i> (2019)	Estudo experimental	A exposição aguda ao cérebro de 2µg de <i>Pg</i> -LPS não induziu quaisquer achados positivos em ratos modelos de AD até 28 dias quanto à função cognitiva, condição física e peso do órgão. Não diferencia significativa nos testes cognitivos também após exposição contínua nos ratos do mesmo grupo de idade (no entanto, se nota diferenças entre os grupos)	A exposição contínua do cérebro de <i>Pg</i> -LPS começou sarcopenia e ferimento cardíaco sem aumentar o comprometimento cognitivo em ratos modelos de DA. A exposição contínua do cérebro de <i>Pg</i> -LPS não é prejudicial em indivíduos saudáveis, mas pode deteriorar o prognóstico de pacientes com DA
Association between periodontitis and risk of Alzheimer's disease, mild cognitive impairment	Holmer.J <i>et al.</i> (2018)	Estudo caso-controlo	Fraca saúde oral e perda óssea alveolar foram mais prevalentes nos pacientes com demência do que nos controles. O grupo de casos foi associado à perda óssea alveolar marginal	Periodontite marginal está associada com deficiência cognitiva e DA. No entanto, o desenho do estudo não exclui explicações não causais

and subjective cognitive decline: A case-control study [9]			generalizada (OR= 5,81), aumento do número de bolsas periodontais profundas (OR = 8,43) e cárie dentária (OR = 3,36).	
Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice [18]	Ilievski.V <i>et al.</i> (2018)	Estudo experimental	<p><i>Pg gingipains</i> foram detetadas nos hipocampus de camundongos artificialmente infetadas ao nível oral por <i>Pg</i>, confirmando a translocação de <i>Pg</i> aplicado oralmente ao cérebro que se encontra no cérebro aos níveis extracelular, intracelular e pericelular dos neurónios, astrócitos e da microglia. Foram detetadas expressão aumentada dos marcados de neuroinflamação (IL6, TNFα e IL1β) e astrogliosis e microgliosis em comparação ao grupo controlo.</p> <p>Os genes APP e BACE1 também foram mais exprimidos no grupo infetado. Também é o caso pelo gene PSEN1 mais não num nível estatisticamente significativo. ADAM10 foi no contrário sub-exprimido. No grupo infetado foram detetados peptídeos Aβ42, pTau e ENF</p>	Este estudo mostra a neurodegeneração e a formação de peptídeos A β 42 extracelular em camundongos adultos jovens após aplicação oral repetida de <i>Pg</i> . As características neuropatológicas observadas neste estudo sugerem fortemente que a infeção periodontal crônica de baixo grau pode resultar no desenvolvimento de neuropatologia consistente com a DA
GSK3 β is involved in promoting Alzheimer's disease pathologies following chronic	Jiang.M <i>et al.</i> (2021)	Estudo experimental	A exposição sistêmica crônica ao <i>Pg</i> -LPS promove o declínio da aprendizagem e da memória, Tau hiperfosforilação, neuro inflamação da microglia e aumento da	A exposição sistêmica crônica aos <i>pg</i> -LPS, um componente de bactérias periodontais, promove sinais patológicos da DA, incluindo déficits de aprendizagem e

<p>systemic exposure to <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharide in amyloid precursor protein^{NL-F/NL-F} knock-in mice [4]</p>			<p>expressão do gene GSK3Beta em neurónios e microglia em camundongos modelo AD (APP^{NL-F/NL-F}) de 10 meses de idade.</p> <p>Os <i>Pg</i>-LPS promovem a geração de TNFα que dependem da expressão do GSK3Beta, esses TNFα promovem a hiperfosforilação das proteínas Tau</p>	<p>memória, neuroinflamação mediada por microglia e hiperfosforilação Tau, em camundongos APP^{NL-F/NL-F}. Estas observações sugerem fortemente que GSK3β liga periodontite e progressão da DA</p>
<p>Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease [17]</p>	<p>Kantarci.A <i>et al.</i> (2020)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Após a indução da DP, camundongos WT (normais) e 5xFAD (modelos de AD) experimentaram perda óssea alveolar. A DP aumentou o nível de micróglia Iba1- imunocorada (microglia ativada) em ratos WT. Em ratos 5xFAD, a DP aumentou o nível de peptídeos Aβ2 insolúvel. Um declínio em Iba1 na proximidade de placas Aβ em camundongos 5xFAD com periodontite induzida em comparação com aqueles controlos sugere uma diminuição induzida por DP da microglia associada à placa. A DP reduziu IL-6, MCP-1, GM-CSF e IFN-γ em cérebros de camundongos WT e reduziu IL-10 em camundongos 5xFAD</p>	<p>Uma resposta neuroinflamatória distinta à DP experimental em ratos de WT e 5xFAD é um mecanismo potencial que pode ligar a DP e a DA.</p>
<p>Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of</p>	<p>Laugisch.O <i>et al.</i> (2018)</p>	<p>Estudo caso-controlo</p>	<p>Comparação pacientes com DA e pacientes com outras formas de demência: Destruição periodontal e inflamação foram onipresentes, sem diferença entre os grupos.</p>	<p>Os patógenos periodontais podem entrar no cérebro e estimular uma resposta imune local. Contudo, em pacientes com demência na idade até 70 anos, os</p>

Alzheimer's Disease [15]			<p>Espécies de <i>P. gingivalis</i>, <i>T. forsythia</i> e <i>Treponema</i> foram detetadas em mais de 50% das amostras de biofilme subgingival, mas nem no soro nem no líquido cefalorraquidiano (LCR). Níveis elevados de anticorpos anti-patógenos no LCR de 16 pacientes num total de 20 (7 com DA; 9 com demência não DA) em comparação com o soro destacam uma possibilidade de resposta imune intratecal aos patógenos. Não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos contra bactérias selecionadas no LCR e no soro entre os grupos.</p> <p>Existe uma associação do nível de proteínas Tau no grupo DA com os níveis séricos de anticorpos anti-<i>Pg</i> e MCP-1/CCL-2 (citoquinas quimiotáticas)</p>	<p>micróbios patogénicos periodontais não atuam como um disparador para desenvolver a DA</p>
Knock-on effect of periodontitis to the pathogenesis of Alzheimer's disease? [14]	Leblhuber.F <i>et al.</i> (2019)	Estudo transversal	<p><i>Pg</i> mostrou-se associado com escores mais baixos ao mini exame do estado mental e com uma tendência para escores mais baixas no teste de desenho de relógio. Associação entre concentrações séricas mais baixas do biomarcador da neopterinina e a presença de <i>Treponema denticola</i>, bem como de kynurenina (os dois são marcadores da ativação imunitária) foram encontradas em pacientes com Alzheimer</p>	<p>Os dados indicam uma possível associação de patógenos periodontais específicos com comprometimento cognitivo, <i>Treponema denticola</i> e <i>Tannerella forsythia</i> podem alterar a resposta imune do hospedeiro na DA. Possível papel de um microbioma salivar alterado como uma ligação causal entre a DP crónica e comprometimento cognitivo na DA</p>

			positivos vs. negativos para <i>Tannerella forsythia</i>	
Dental Health in advanced age and Alzheimer's Disease: A possible link with bacterial toxins entering the brain? [26]	Maurer.K <i>et al.</i> (2018)	Estudo caso-controlo	Três cepas bacterianas foram encontradas com maior destaque em pacientes com periodontos inflamados: <i>Aggregatibacter actinomycetem comitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>Pg</i>) e <i>Fusobacterium nucleatum</i> . Comprometimentos da função olfatória foram associados com infestação bacteriana dos molares e resposta inflamatória nas gengivas e correlacionados com déficits cognitivos em pacientes com DA. DA-pacientes mostraram maior carga bacteriana e níveis de inflamação em comparação com o grupo controlo	O estudo sugere que a invasão cerebral pelo <i>Pg</i> e outros patógenos de origem periodontal se faça pelos seios paranasais por disseminação hematogênica, com prova das capacidades olfativas diminuídas dos pacientes DA
Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues [16]	Nezu.A <i>et al.</i> (2017)	Estudo caso-controlo	Ambos os genes APP (amiloide beta precursor proteína) e NEP (neprilysina, uma enzima com capacidade a degradar as placas amiloides) foram regulados em cima nos tecidos gengivais afetados por periodontite. APP expressando macrófagos e NEP-expressando neutrófilos e fibroblastos, refletindo estágios inflamatórios, foram detetados em tecidos gengivais inflamados	Os níveis aumentados de mRNA de NEP na periodontite podem atuar como um inibidor da acumulação de A β nos tecidos gengivais, equilibrando a expressão aumentada de mRNA da APP. Contudo, NEP tem vários efeitos, incluindo a degradação de substâncias vasoativas

<p>Periodontitis Deteriorates Cognitive Function and Impairs Neurons and Glia in a Mouse Model of Alzheimer's Disease [23]</p>	<p>Qian.X <i>et al.</i> (2021)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>A expressão de citocinas pró-inflamatórias gengivais, bem como a reabsorção óssea alveolar em camundongos <i>Pg</i>LPS injetados e ligaduras foi aumentada em comparação com a de camundongos controle. Camundongos do grupo <i>Pg</i>LPS Injection + Ligation apresentaram comprometimento cognitivo e redução significativa no número de neurônios. A ativação de células gliais nos grupos experimentais com níveis significativamente aumentados de Aβ foi mais pronunciada em relação ao grupo controle (todos os ratos são modelos de DA neste estudo).</p>	<p>Periodontite exacerba aprendizagem e perda de memória em camundongos modelos de DA e aumento da Aβ e respostas neuroinflamatórias</p>
<p>Effects of <i>Porphyromonas gingivalis</i> and Its Underlying Mechanisms on Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation in Sprague-Dawley Rats [5]</p>	<p>Tang.Z <i>et al.</i> (2020)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>A gravidade da Tau fosforilada nos sítios relacionados com a DA Thr181 e Thr231 e o número de astrócitos ativados foram significativamente maior no hipocampo de ratos com injeção de <i>Pg</i>. Os níveis da citocina inflamatória IL-1β e IL-6 e TNFα no soro e hipocampo também foram aumentados nos ratos com injeção de <i>Pg</i>. A atividade da proteína fosfatase 2A foi significativamente inibida no hipocampo de</p>	<p><i>P. gingivalis</i> poderia induzir Tau hiperfosforilação por, em parte, atenuar a atividade da proteína fosfatase 2A através do desencadeamento de inflamação sistêmica e neuroinflamação em ratos selvagens.</p>

			<p>ratos com injeção de <i>Pg</i>.</p> <p><i>In vitro</i>, IL-1β induziu Tau hiperfosforilação inibindo a atividade da proteína fosfatase 2A em nerónios de ratos.</p> <p>A aplicação do promotor da proteína fosfatase 2A eficientemente atenuou a hiperfosforilação Tau induzida por IL-1β em nerónios de ratos.</p>	
<p>Oral Pathogenic Bacteria-Inducing Neurodegenerative Microgliosis in Human Neural Cell Platform [19]</p>	<p>Tran.VTA <i>et al.</i> (2021)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Microgliose mediada por bactérias induziu a produção de óxido nítrico, o que causa neurodegeneração avaliada com alto nível de pTau.</p> <p>Ocorreu a elevação de mediadores de proteínas prejudiciais, CD86 e Inos e a produção de vários marcadores pró-inflamatórios a partir de micróglia estimulada. Através da inibição de LPS e succinato desidrogenase em um meio condicionado bacteriano, acontece uma diminuição na microgliose neurodegenerativa. O efeito bidirecional da microgliose e astrogliose entre si exacerba a neurodegeneração.</p>	<p>O eixo boca-cérebro pode contribuir para a patogénese da DA.</p>
<p>Association between number of teeth and Alzheimer's disease using the National Database of Health Insurance Claims</p>	<p>Tsuneishi.M <i>et al.</i> (2021)</p>	<p>Estudo transversal</p>	<p>As prevalências de DA foram de 3,0% e 3,7% em indivíduos diagnosticados com periodontite e dentes perdidos, respetivamente.</p> <p>Em pacientes com periodontites, mulheres, idosos e indivíduos com menos dentes</p>	<p>Este estudo transversal utilizando dados de pessoas com 60 anos ou mais diagnosticadas com periodontite ou dentes perdidos mostrou que pacientes com menos dentes presentes e um maior</p>

<p>and Specific Health Checkups of Japan [8]</p>			<p>presentes apresentaram percentuais relativamente mais elevados de DA. Em particular, 16,4% dos indivíduos com 85 anos ou mais e 6,9% dos indivíduos com 1-9 dentes presentes tinham DA.</p> <p>Em pacientes com dentes perdidos, mulheres, idosos e indivíduos com dentes mais ausentes apresentaram percentuais relativamente mais elevados de DA.</p> <p>Notavelmente, 13,0% dos indivíduos com 85 anos ou mais e 8,7% dos indivíduos com 28 dentes perdidos tinham DA.</p> <p>Para pacientes com 14-27 dentes perdidos OR=1.40 e pacientes com 28 dentes perdidos OR=1.81</p>	<p>número de dentes que faltam tiveram um maior risco de DA depois de ajustar para o sexo e idade.</p>
<p>Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from <i>Porphyromonas gingivalis</i> in mice [22]</p>	<p>Wu.Z <i>et al.</i> (2017)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Exposição sistêmica crônica a PgLPS durante cinco semanas consecutivas induziu défices de aprendizagem e de memória com o acúmulo intracelular de Aβ nos neurónios dos ratos de meia-idade, mas não nos ratos jovens ou de meia-idade com deficiência de Cathepsin B (CatB-).</p> <p>PgLPS aumentaram significativamente a expressão de CatB tanto na microglia quanto nos neurónios em camundongos de meia-idade,</p>	<p>A exposição sistêmica crônica a PgLPS induz fenótipos semelhantes a AD, incluindo a neuroinflamação, acumulação intracelular de AB em neurónios e comprometimento das funções de aprendizagem e memória mediada por microglia, em camundongos de meia-idade de forma dependente da CatB</p>

			<p>enquanto o aumento da expressão de IL-1b e TLR2 foi restrito à microglia no hipocampo de camundongos de meia-idade, mas não no de camundongos de meia-idade CatB-.</p> <p><i>In vitro</i>, a estimulação da PgLPS aumentou a expressão do mRNA do IL-1B e TLR2 mas não na microglia de ratos CatB- ou em presença de inibidores específicos da CatB.</p> <p>A expressão do mRNA do APP e do CatB foi significativamente aumentada nos neurónios cultivados tratados com microglia de ratos tratados com PgLPS, mas não após tratamento com anti-IL-1B quando foram tratados com microglia de ratos CatB- tratados com PgLPS, nem com PgLPS só.</p>	
<p>Potential Role of Phosphoglycerol Dihydroceramide Produced by Periodontal Pathogen <i>Porphyromonas gingivalis</i> (PGDHC) in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease [25]</p>	<p>Yamada.C <i>et al.</i> (2020)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>PGDHC, mas não PgLPS, aumenta a secreção de peptídeo Ab42 solúvel e expressão de APP. Hiperfosforilação de proteína Tau foi observada em células modelos de neurónios humanos em resposta ao lipídio PGDHC, ao contrário de PgLPS tem pouco ou não efeito.</p> <p>No entanto, tanto o PGDHC quanto o PgLPS contribuíram para a senescência destas células, conforme indicado pela produção de marcadores de fenótipo secretor associados à</p>	<p>PGDHC promove a amiloidogénese e hiperfosforilação e também os fatores marcadores de fenótipo secretor associados à senescência.</p> <p>PGDHC pode representar uma nova classe de fatores de virulência derivados de bactérias para a DA associada à periodontite</p>

			<p>senescência, incluindo beta-galactosidase, catepsina B (CatB) e citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6.</p> <p>Alem disso, PGDHC diminuída a expressão do marcador da proteção de senescência sirtuin-1.</p>	
Poor oral health conditions and cognitive decline: Studies in humans and rats [13]	Zhang.S <i>et al.</i> (2020)	Estudo transversal e estudo experimental	<p>Os escores MMSE (teste de acuidade mental) para pessoas com mais de 7 dentes perdidos foi significativamente mais baixo que nas pessoas com menos de 6 dentes perdidos e uma relação negativa foi estabelecida entre número de dentes perdido e escores MMSE, tal como entre profundidade de bolsas e escores MMSE.</p> <p>Nos ratos modelos de DA com periodontite induzida os níveis de TNFα e IL-6 no hipocampo foram significativamente maiores do que os do grupo DA.</p> <p>Os níveis de IL-1 e IL-6 no córtex cerebral do grupo com periodontite induzida e DA foram significativamente maiores do que os do grupo DA</p>	Más condições de saúde oral, incluindo mais dentes que faltam e maior média de bolsas periodontais pode ser fature de risco para o declínio cognitivo. Periodontite pode aumentar citocinas inflamatórias em ratos modelos de DA

Discussão:

Constatamos uma maior prevalência da DA numa população idosa quando ela possui uma saúde periodontal mais deficiente. Num estudo de Tsuneishi *et al.* numa população com mais de 60 anos no Japão, verifica-se uma correlação, que foi previsível, entre a idade e a DA, mas também entre o número de dentes perdidos e a DA (3,68% dos doentes com mais de 60 anos diagnosticados com dentes em falta desenvolvem a DA enquanto esta percentagem chega até 8,70% para os mais de 60 anos com 28 dentes perdidos). Nos pacientes diagnosticados com periodontite ativa, há uma conexão muito forte entre a idade e a DA. Um paciente de 85 anos ou mais, com uma periodontite tem 112,32 vezes mais probabilidade de ser diagnosticado com DA do que um paciente com periodontite ativa entre 60 e 64 anos [8]. No outro sentido, um paciente com DA tem também 5,81 vezes mais probabilidade de apresentar uma reabsorção óssea marginal, traduzindo uma patologia periodontal [9].

Se estes estudos nos permitem de fazer uma correlação entre a DP e a DA, no entanto não nos permitem concluir sobre a causalidade de uma doença sobre a outra. Com o declínio das capacidades cognitivas, o paciente DA tem menos capacidade a seguir uma higiene oral rigorosa, aumentando assim as suas probabilidades de apresentar uma periodontite.

Para contornar este problema, foram realizados estudos de coorte retrospectivos. Estes estudos usam registos clínicos de saúde para comparar um grupo que apresentava periodontite com um grupo controlo, e comparar o aparecimento da DA após a exposição. Choi *et al.* demonstram assim que a periodontite aumenta de 6% o risco de demência [10]. Num outro estudo, Chen *et al.* associam uma exposição de 10 anos à periodontite a um risco 1,707 vezes superior de desenvolver a DA [11]. Se estes estudos apontam para a periodontite como fator de risco do aparecimento da DA, em particular nos idosos, apenas se pode especular sobre as causas desta associação.

A relação entre a periodontite e a DA foi demonstrada por outros estudos que fornecem provas da associação entre os patógenos associados à DP e à DA, ou numa maneira mais geral a uma acuidade mental mais fraca no humano [12,13,14]. Com efeito, foi evidenciado uma correlação entre uma pontuação mais baixa ao teste MMSE e uma saúde periodontal mais fraca, e isso na população em geral, sem visar somente os doentes DA [13]. O estudo de Lehluber *et al.* associa a presença de alguns patógenos, especialmente a *Pg*, na saliva de pacientes DA com avaliações mais baixa aos testes de acuidade mental destes pacientes [14]. Por outro lado, um estudo dirigido por Laugisch *et al.* encontra uma associação estatística entre a presença de patógenos da periodontite e a demência, mas conclui, não obstante, que esta presença não é na origem da DA, devido ao fato que esta presença se encontra da mesma forma nos pacientes com demência devida à DA e os pacientes com demência com origem diferente [15].

Este estudo esbarra, no entanto, com uma limitação abordada previamente, que não pode ser determinado, sem um acompanhamento do paciente ao longo do tempo, se é a periodontite que provocou a demência ou se é esta última que levou o paciente a negligenciar a sua saúde oral.

Sobre as provas da ligação entre as duas doenças no humano, foram identificados antígenos das *gingipains*, que são metabólitos da *Pg*, não somente nos cérebros de indivíduos com DA, mas também nos cérebros de indivíduos com a patologia da DA sem diagnóstico de demência. Além de poder ser utilizado como marcador dum diagnóstico diferencial, isso sugere que a infeção do cérebro por *Pg* não é uma consequência duma saúde oral fraca a seguir a demência do paciente nem uma consequência tardia da DA diretamente, mas sim um evento precoce que pode explicar a patologia encontrada em indivíduos de meia-idade antes do declínio cognitivo [7].

1. Expressão genética na DA

Os péptidos A β , componentes das placas A β , são formados a partir de precursores codificados pelo gene da Amiloide- β Precursor Proteína (APP). O gene é assim considerado um gene chave na via da DA [16]. Uma enzima da degradação do A β , a neprilisina (NEP), tem um papel fundamental no regulamento da DA. Comparando os tecidos gengivais humanos de pacientes com DP e tecidos gengivais saudáveis, Nezu *et al.* encontraram uma expressão aumentada dos genes APP e NEP nos tecidos gengivais com DP. Este resultado revelou que as expressões dos genes APP e NEP poderiam estar associadas à periodontite e aumentadas pela inflamação. Os níveis de NEP cerebrais diminuem com a idade [16].

Surge assim uma ligação evidente entre DP e DA no doente idoso se a mesma coisa se produz ao nível dos tecidos cerebrais: a colonização bacteriana conduziria à neuroinflamação que aumentaria a expressão do gene APP enquanto, devido à idade do paciente, a NEP em concentração diminuída não conseguiria degradar os A β , o que levaria à formação de placas A β e assim à DA.

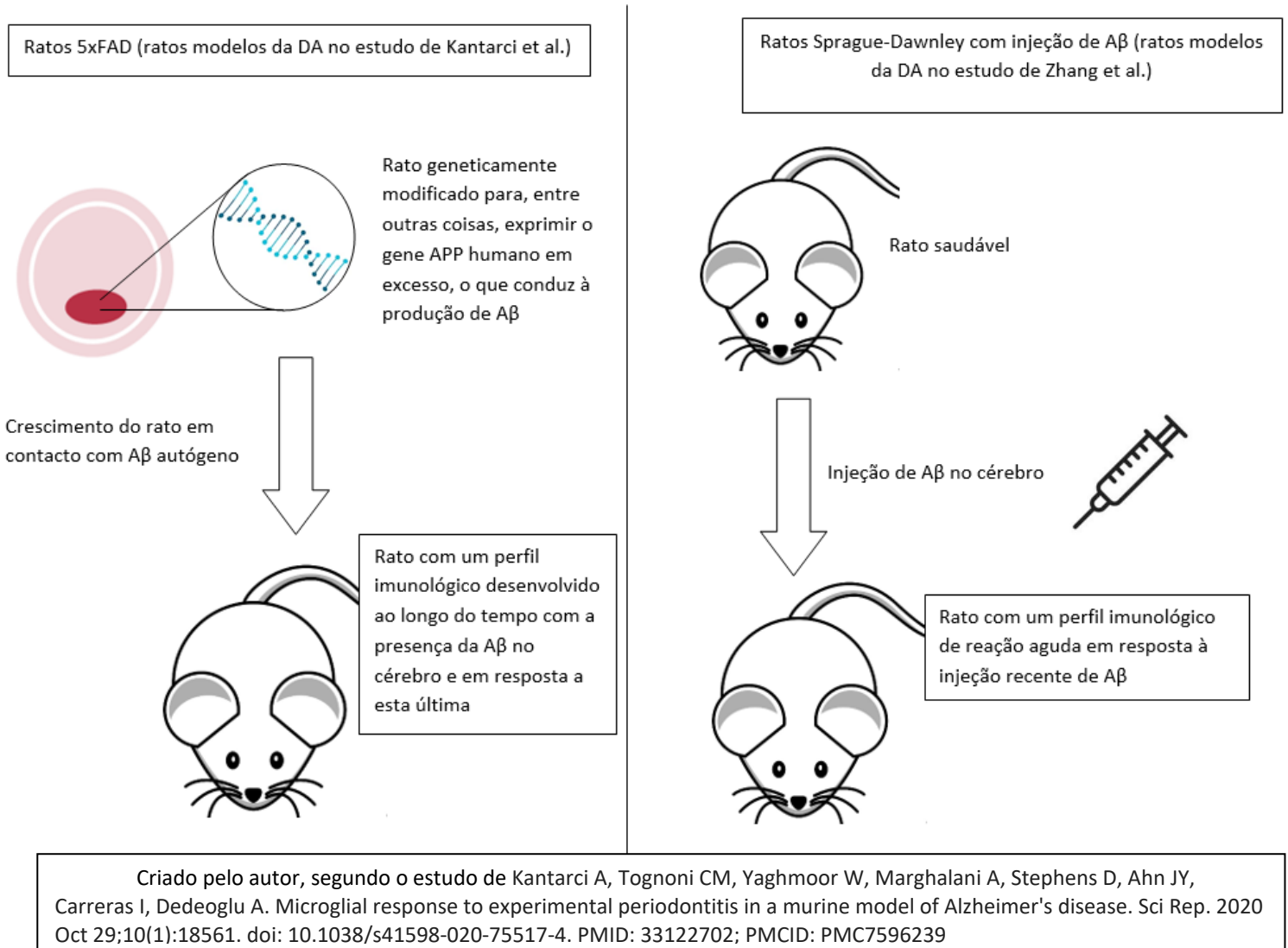
2. Efeito da doença periodontal nos tecidos cerebrais

Para confirmar os achados encontrados nos humanos e revelar os mecanismos subjacentes, a DP foi induzida em ratos, e nomeadamente em ratos “modelos de DA”. Esses ratos modelos de DA podem ser portadores de modificações genéticas que expressam o gene humano da proteína precursor do A β . Assim os ratos modelos de DA desenvolvem sintomas semelhantes que os dos doentes da DA, através de mecanismos semelhantes: o desenvolvimento de placas A β e as suas consequências no cérebro [17]. Para perceber o impacto da DP num paciente DA, Kantarci *et al.* induziram a DP em 2 grupos de ratos, um grupo saudável e um outro grupo que são modelos da DA devida às modificações genéticas para exprimir genes das proteínas A β . Uma primeira nota interessante sobre os resultados é que a condição “tipo DA” dos ratos modelos de DA já induz perda óssea clínica por si mesmo. A DP foi induzida por ligaduras nos molares com seda. Assim a microbiota da DP é formada a partir da microbiota comensal da boca do

rato, e não é específico de um tipo de bactéria de interesse [17]. A DP provocou uma perda óssea comparável nos dois grupos, mas o que é de interesse neste estudo em relação à DA é o achado do impacto da DP na microglia. A microglia ativada nos ratos saudáveis foi aumentada com a DP, mas não nos ratos modelos de DA. De facto, os níveis de microglia ativada já foram altos nos ratos modelos de DA, devido à acumulação de placas A β , mas a DP não aumentou estes níveis. Ao contrário, níveis menores de microglia ativada foram detetados ao nível do hipocampo [17]. Para perceber a explicação disso, deve ser percebido a ação da microglia nas placas A β . Evidências recentes sugerem que a microglia associada às placas A β forma uma barreira física protetora em torno dos depósitos amilóides, compactando as fibrilas amiloides numa forma potencialmente menos tóxica, impedindo a adição de novos A β em placas existentes, e protegendo os neurónios próximos da toxicidade de A β . O que aconteceu no caso de ratos modelo de AD é que o desenvolvimento da DP resultou numa microglia com menos capacidade de prender as placas A β . Esses resultados matizam a ideia de que a DP só provoca uma neuroinflamação pela ativação glial que agrava a doença nos doentes com DA. O que a DP parece provocar também é uma disrupção das capacidades de resposta da microglia à DA, sugerindo que a microglia é central na relação entre a DP e a DA. Em relação aos peptídeos A β , a concentração de peptídeos A β 42, um tipo mais tóxico e mais suscetível de formar placas, se tornou mais elevado nos ratos modelos de DA com DP que nos ratos modelos de DA sem DP. Não se notou diferenças entre os níveis de peptídeos A β 40 [17]. Isso entra em contradição com um outro estudo do mesmo ano (2020), de Zhang *et al.*, que indica uma concentração aumentada de peptídeos A β 40 no cérebro de ratos modelos de DA com uma DP que no grupo modelo de DA sem a DP [13]. A explicação desta diferença poderia ser explicada com a técnica usada na obtenção dos ratos modelos de DA, que difere entre os dois estudos: no primeiro, de Kantarci *et al.*, os organismos dos ratos produzem os peptídeos A β por modificação genética enquanto no segundo os peptídeos são injetados diretamente nos cérebros dos ratos (figura 1). Uma outra diferença notável entre os dois estudos é a concentração de marcadores de inflamação no cérebro. Enquanto no estudo de Zhang *et al.* as IL-1, IL-6 e TNF α se encontram aumentados nos ratos modelos da DA com DP em comparação com ratos modelos da DA

sem DP. Kantarci *et al.* encontraram menos diferenças entre grupos de ratos semelhantes [13,17]. Essa diferença poderia ser explicada pelos perfis inflamatórios diferentes dos ratos modelos de DA dos estudos, que depende da técnica usada para simular a DA no rato [17]. No estudo de Zhang *et al.*, a DP não teve influência na capacidade de

Figura 1: Diferentes tipos de ratos modelos da DA = diferentes perfis imunológicos



aprendizagem dos ratos modelos de DA [13].

Estudos têm relatado uma maneira mais direta pela qual DP pode levar ao declínio cognitivo. O patógeno fundamental na periodontite, a *Pg*, foi identificado nos cérebros de pacientes com DA [13].

3. Efeito da *Pg* nos tecidos cerebrais

Para avaliar mais especificamente os efeitos da *Pg*, Ilievski *et al.* conduziram um estudo consistindo em colocar um gel carregado em *Pg* nos dentes de ratos jovens saudáveis, induzindo assim uma DP com uma microbiota patológica consistente especificamente em *Pg* [18]. As citocinas IL6, IL1 β e o TNF α , marcadores inflamatórios, foram encontrados em concentrações maior ao nível do cérebro dos ratos com a aplicação oral de *Pg*, indicando uma neuroinflamação provocada por esta última [18]. Este achado é confirmado por um outro estudo que encontra o mesmo resultado após injeção da *Pg* no organismo de ratos saudáveis [5]. A invasão da *Pg* também provoca uma ativação da microglia [18] e dos astrócitos [5, 18], um resultado que faz sentido com as concentrações aumentadas de citocinas.

Foi evidenciada uma neurodegeneração, especialmente no hipocampo, provocado pela aplicação oral de *Pg*. Além disso, foi detetado a presença do peptídeo A β 42 extracelular e de ENF no cérebro dos ratos com aplicação oral de *Pg* [18]. O aparecimento dos ENF é consistente com um outro estudo que deteta mais hiperfosforilação nos neurónios dos hipocampos de ratos após injeção de *Pg* no organismo ou aumento dos níveis de A β 42 [5,7]. Neste estudo, de Tang *et al.*, foi evidenciada, a fazer teste em neurónios de ratos *in vitro*, que a IL1 β , produzida pelas células ativadas do sistema imunitário do cérebro (células micróglia, astrócitos), iniba a atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A). Esta proteína é a principal fosfatase das proteínas Tau, ou seja, evita que as proteínas Tau se tornem em pTau. É esta inibição dos PP2A pelos IL1 β que parece provocar as pTau e assim o aparecimento dos ENF nos neurónios [5]. O aparecimento dos ENF seria então uma consequência indireta à exposição do cérebro à *Pg*, mediada pela ativação glial. Este achado coloca a reação neuroinflamatória no centro do mecanismo entre a *Pg*, e por extensão à DP, e o aparecimento do sinal da DA (e causa de neurodegeneração) que são os ENF. Este papel central da microglia ativada na mediação do aparecimento de sinais parecidos à DA é confirmado por um outro estudo mostrando

a capacidade dos produtos celular da microglia ativada a causar ativação dos astrócitos e neurodegeneração, pontando a IL8 como produto das células gliais ativadas e dos astrócitos ativados responsável da neurodegeneração [19]. Além disso, é interessante de constatar que a neurodegeneração foi ainda mais marcada durante a exposição dos neurónios à microglia ativada, que na exposição direta à bactéria *Pg* [19].

Sobre o aparecimento de A β 42 extracelular no cérebro de ratos com aplicação oral da *Pg*, uma ligação se encontra ao nível da expressão dos genes. Nos cérebros desses ratos as expressões dos genes APP, já apresentado na parte sobre a expressão dos genes da via da DA nos tecidos gengivais, e BACE1, gene que permite a formação de A β a partir de APP, se encontram significativamente aumentadas, enquanto a expressão do gene ADAM10, que codifica para uma proteína com a capacidade de degradar os A β , se encontra diminuída [18]. Este achado é consistente com o estudo de Nezu *et al.* que mostra a expressão aumentada do gene APP no tecido gengival, mas aqui transposta aos tecidos cerebrais [16].

Os estudos analisados nesta parte demonstram o poder patogénico da *Pg* no aparecimento de lesões características da fisiopatologia da DA, mesmo se estes estudos são limitados pelo fato que foram conduzidos em ratos e culturas de células. Um estudo realizado *in vitro* demonstrou que a patogenicidade da *Pg* não depende só da sua presença direta [19]. Neste estudo a *Pg* foi cultivada e depois retirada de um meio de cultura, e este meio de cultura “condicionado” pela *Pg* tem sido demonstrado ser citotóxico para os neurónios [19]. Isso mostra que a virulência da *Pg* não depende só da sua presença, mas passa pelos seus metabolitos. Nas próximas partes examinamos esses metabolitos e os papéis que eles têm na patogenicidade da bactéria.

a. Efeito específico dos lipopolissacarídeos da *Porphyromonas gingivalis*

Os lipopolissacarídeos são endotoxinas produzidas pelas *Pg* (PgLPS) e são estudadas pelo seu papel patogénico predominante na infeção pela *Pg*. Na injeção de

PgLPS em ratos saudáveis ou modelos de DA, os estudos concordam para constatar que não existe diferença ou resultados significativos na exposição aguda de PgLPS [20, 21, 22]. Assim os resultados com algum significado obtidos nos estudos são para uma exposição crónica ao PgLPS. Na injeção sistémica de PgLPS em ratos saudáveis, Gu *et al.* relataram uma perda significativa das capacidades de memorização dos ratos de 47% [20]. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, em ratos saudáveis [22] bem como em ratos modelos de DA [4, 23]. No entanto, num estudo de Hayashi *et al.*, mesmo existindo uma perda de capacidades cognitivas os resultados entre os ratos modelos de DA com e sem exposição por injeção cerebral de PgLPS, não foram significativos [21]. Diferentes caminhos podem ser explorados para explicar esta diferença: as mutações no gene do APP dos ratos modelos de DA que são diferentes de um estudo para outro, as idades dos ratos, os testes usados para estimar as capacidades cognitivas e as dosagens e locais das injeções. Não aparece uma razão evidente dos achados diferentes na análise destes parâmetros. Uma possibilidade é que, no estudo de Qian *et al.* os ratos tiveram também uma mutação para aumentar a expressão de gene da PSEN-1, uma proteína com um papel importante na transformação da APP em A β [23], e no estudo de Jiang *et al.* as dosagens de PgLPS foram mais altas e numa zona de injeção diferente (1mg/dia/kg em intraperitoneal) [4] que no estudo de Hayashi *et al.* (2 μ g/dia em intra-ventriculocerebral) [21].

Ao contrário do espectável, experimentações em laboratório mostram que os PgLPS poderiam ser mais nocivos no sentido da neurodegeneração no caso duma exposição sistémica que injetados diretamente no cérebro. No seu estudo, Gu *et al.* não se limitaram a provar só um aumento dos níveis de IL17 e IL6 nos cérebros de ratos saudáveis com injeção sistémica de PgLPS, mas também encontram esta correlação num osso longo destes ratos [20]. O PgLPS induz, por um lado no osso, a produção de IL6 e IL17 que passa no sangue e, por outro lado, a produção de IL6 na microglia que, por sua vez, induz a produção de IL17 pela microglia [20]. As ILs produzidas pelo osso vão assim, através do fluxo sanguíneo, ao entrar em contacto com os tecidos cerebrais e amplificar a neuroinflamação. Sendo que a IL17 induz a produção intracelular de A β pelo neurónio através da aumentação da produção por este de APP e de Cathepsin B (CatB), esta reação

conduz à neurodegeneração [20]. Vemos assim que os PgLPS sozinhos podem provocar uma neurodegeneração em ratos saudáveis, usando uma inflamação óssea que eles provocam para potenciar ainda mais a neurodegeneração pelo acúmulo de A β , característica da DA.

O papel da CatB na indução da neuroinflamação por PgLPS é o assunto central do estudo de Wu *et al.* que mostram que, em ratos saudáveis de meia-idade com exposição sistêmica crônica aos PgLPS, estes conduzem à produção pela microglia de CatB que participa a produzir os IL1 β . Estas últimas vão provocar nos neurónios a produção de APP e de CatB, a qual participa à produção de A β a partir de APP. Assim, verifica-se um aumento da neuroinflamação, do A β intracelular e uma diminuição das capacidades de aprendizagem e de memorização destes ratos, enquanto em ratos deficientes em CatB não foram obtidos estes resultados. É interessante também ver que neste mesmo estudos, ratos jovens sem deficiência de CatB também não desenvolveram os sintomas relativos à DA, o que sugere que a ação dos PgLPS na sintomatologia da DA depende da idade [22]. Da mesma maneira que a CatB para as A β , Jiang e al. sugerem que o GSK3 β tem um papel na produção de pTau intracelular, em ratos modelos de DA [4]. Os PgLPS provocam produção de TNF α pela microglia. E este TNF α provoca a hiperfosforilação das proteínas Tau nos neurónios, com o GSK3 β , que tem neste contexto uma atividade aumentada, e um papel importante na cascata de sinalização destes dois processos [4]. Além de mostrar que os PgLPS aumentam os níveis de pTau dos neurónios, o estudo aponta que os PgLPS não somente aumentam os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , TNF α) mas também diminuem os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL10, TNF β) [4].

Um estudo interessante para identificar o papel exato dos PgLPS em comparação à periodontite é o de Qian *et al.* Os autores fazem a comparação de 3 grupos de ratos modelos de DA: um controlo, um com injeção intrapapilar de PgLPS e um com injeção e ligadura com fio de sede nos molares para induzir uma periodontite [23]. Ao nível da gengiva, os níveis de destruição dos tecidos periodontais se encontram muito mais aumentados nos grupos com PgLPS e com PgLPS + ligadura em comparação ao grupo

controle. No entanto, só o grupo PgLPS + ligadura apresenta uma diferença significativa dos níveis gengivais de IL6 e TNF α , que são citocinas inflamatórias, com o grupo controle [23]. No cérebro, duma maneira relativamente expectável, os indicadores de sinais características da DA, tais como a produção de A β , a ativação glial e nível de citocinas pró-inflamatórias são mais alarmantes no grupo no grupo LPS+ligadura que no grupo LPS, e no grupo LPS que no grupo controle, com diferenças significativas [23]. Além disso, a diferença é mais marcada entre os grupos LPS+ligadura e LPS do que entre os grupos LPS e controle [23]. Qian *et al.* puderam concluir que a periodontite induz a produção de A β , a ativação da microglia e a liberação de citocinas inflamatórias [23]. Essa conclusão sobre a periodontite deveria ser colocada em perspectiva com o estudo de Kantarci *et al.*, o qual leva a pensar que a periodontite provoca mais uma disrupção da inflamação glial em ratos modelos de DA [17]. Para explicar a matiz entre as conclusões dos dois estudos, por um lado uma aumento da inflamação e no outro uma disrupção da inflamação, deve se tomar em consideração que o estudo de Kantarci *et al.* foi feito só com a técnica da ligadura enquanto o estudo de Qian *et al.* incluía a injeção de PgLPS [17,23]. Assim a neuroinflamação com ativação glial poderia ser atribuída aos PgLPS, isso concordando com outros estudos sobre os PgLPS já descritos anteriormente, deixando a pensar que outros metabolitos preenchem papéis importantes na patogenicidade da periodontite no contexto da sintomatologia da DA.

b. Efeito específico das *gingipains*

Pg produz fatores de virulência conhecidos como as *gingipains*, que são proteases da cisteína que consistem na lisina-*gingipain* (Kgp) e na arginina-*gingipain* (Rgp) [7,24]. As *gingipains* são secretadas, transportadas para superfícies externas da membrana bacteriana e parcialmente liberadas no meio extracelular em formas solúveis e associadas à membrana externa [7]. As *gingipains* são essenciais para a sobrevivência e a patogenicidade da *Pg*, desempenham um papel crítico na colonização e inativação das defesas do hospedeiro, aquisição de ferro e nutrientes e destruição tecidual [7]. Além

disso, como o tratamento com antibióticos de largo espectro raramente erradica *Pg* e pode levar à sua resistência, as *gingipains* são estudadas como alvos no desenvolvimento de tratamentos de espectro estreito [7].

Ao estudar os tecidos cerebrais humanos pós-morte, foi constada que a carga de *gingipains* no cérebro entra em correlação com o diagnóstico da DA: uma maior concentração de *gingipains* foi encontrada nos cérebros dos pacientes com DA do que nos indivíduos sem demência no momento da sua morte [7]. Esta correlação existe também entre a carga das *gingipains* e a carga dos pTau e da ubiquitina, uma proteína que se acumula nas placas A β e nos ENF [7]. Nos neurónios, além desta correlação de concentração, se verifica que a localização das *gingipains* e a localização das placas A β e dos ENF estão ligadas [7], que sugere um nexo de causa e efeito direto. Como foi explicado na primeira parte desta discussão, *gingipains* foram encontradas também nos cérebros de pacientes sem diagnóstico de DA, mas com a mesma relação com os ENF e as placas A β , de uma maneira coerente com o conceito de DA pré-clínica, ou seja, que a DA se inicia antes do aparecimento de sintomas clínicos [7].

As *gingipains*, pela sua natureza de protéase, têm a capacidade de fragmentar as proteínas Tau, levando à hiperfosforilação e insolubilização destas últimas, que conduz à formação dos ENF [7,24]. Dominy *et al.* mostram assim, que inibidores das *gingipains* têm um efeito citoprotetor nos neurónios expostos às *gingipains* [7]. Além disso, neste mesmo estudo, foi demonstrado que exposição oral de *Pg* induz o aumento dos níveis de A β 42 nos cérebros de ratos imunodeficientes. Também foi demonstrado, através da utilização de inibidores específicos, que o aumento dos níveis de A β 42 requer a atividade das duas *gingipains*, as Kgp e as Rgp [7]. A resposta do cérebro pela produção de A β 42 é consistente com o fato que os péptidos A β 42 têm uma atividade antimicrobiana, demonstrada *in vitro* neste estudo de Dominy *et al.*, em comparação com os péptidos A β 40 e o controlo [7].

c. Efeito específico da ceramida produzida pela *Porphyromonas gingivalis*

Pg é uma das raras bactérias que é capaz de sintetizar ceramidas [25]. O estudo de Yamada *et al.* analisou a patogenicidade da ceramida produzida pela *Pg*, a fosfoglicerol dihidroceramida (PGDHC) [25]. Usando uma linha celular de ovário do hamster modificado para exprimir o gene APP e uma linha celular de neurónios humanos, os efeitos dos PGDHC e dos PgLPS sobre o aparecimento dos marcadores típicos da DA foram avaliados. Assim foi demonstrado que o PGDHC aumenta a secreção dos A β 42 nas células com o gene APP, ao contrário dos PgLPS. Além disso, hiperfosforilação da proteína Tau foi observada em células neuronais em resposta à PGDHC [25]. Em contraste, PgLPS teve pouco ou nenhum efeito significativo sobre a fosforilação das proteínas Tau em células desta linha celular [25]. No entanto, tanto o PGDHC quanto o PgLPS contribuíram para a senescência das células neuronais, indicada pela produção de marcadores associados à senescência, entre outros CatB e citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 [25]. Adicionalmente, o PGDHC diminuiu a expressão do marcador de proteção da senescência nestas células [25].

É interessante de colocar estes resultados em perspetivas com as conclusões sobre o papel dos PgLPS já discutidos. No entanto, fazendo isso, é importante de considerar que os métodos de experimentação são muitos diferentes, nomeadamente o fato que os estudos sobre os PgLPS foram realizados *in vivo*, enquanto aqui os PGDHC são avaliados sobre linhas celulares *in vitro*.

d. Influência do serótipo da *Porphyromonas gingivalis* na sua patogenicidade

A antigenicidade da *Pg* esta associada à composição em polissacarídeo da sua cápsula extracelular, definida segundo o seu antígeno-K, a maior molécula da sua superfície [3]. Os serotipos encapsulados K1 e K2 são conhecidos por induzir produção de interleucinas pró-inflamatórias nos macrófagos e células dendríticas e outros sinais de virulência nomeadamente na doença periodontal. Enquanto o serótipo K4 e o serótipo “sem cápsula” estão associados à saúde periodontal [3]. Se os efeitos de serótipo da bactéria são já conhecidos sobre a patogenicidade ao nível da gengiva, Díaz-Zúñiga *et al.*

investigaram os potenciais efeitos deletérios de cada serótipo de *Pg* no cérebro, através da injeção, no palato de ratos saudáveis, dos diferentes serótipos de *Pg* [3]. Os resultados indicam que, apesar de todas os serótipos poderem atingir o cérebro, incluindo o serótipo “sem cápsula”, apenas os serótipos mais virulentos de *Pg*, K1 e K2, efetivamente induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação dos astrócitos, secreção de A β 42, hiperfosforilação da proteína Tau e declínio cognitivo em ratos jovens, após um curto período de exposição à infeção [3].

O estudo também ratificou a maior capacidade dos serotipos K1 e K2 de *P. gingivalis* em induzir reabsorção óssea alveolar durante periodontite experimental [3].

4. Via da migração bacteriana até os tecidos cerebrais

Já foi demonstrado o fato que a *Pg* é encontrada no cérebro de pacientes DA [7,13] mas ainda não foi bem determinado a via utilizada para esta invasão do patógeno a partir do ambiente periodontal. Atualmente 3 hipóteses são exploradas pela comunidade científica:

-Uma infeção dos monócitos no local da inflamação dos tecidos periodontais, monócitos infetados pela *Pg* que serão depois recrutados pelo cérebro [7]

-Uma infeção direta, após transporte no fluxo sanguíneo, e danos pelas *Pg* à barreira hematoencefálica [7]

-A infeção e proliferação direta através das estruturas craniais, seios e nervos cranianos (olfativos ou trigémeo) [7]

Maurer *et al.* formularam a hipótese que os patógenos da DP atravessam os seios perinasais e perturbam o sentido do olfato, dando uma entrada direta aos patógenos no cérebro olfatório [26]. Avaliando dois grupos humanos, um com provável DA e outro controlo, os autores verificaram que as alterações da função olfativa foram associadas à acumulação bacteriana dos molares e resposta inflamatória nas gengivas, e

correlacionadas com défice cognitivo maior em pacientes com DA [26]. Pacientes com DA apresentaram maior carga bacteriana e níveis de inflamação comparados ao grupo controlo [26]. Este estudo esbarra contra uma limitação já analisada anteriormente nesta revisão, o que os parâmetros do estudo não nos permite avaliar se o défice cognitivo é responsável da infestação bacteriana, sendo esta última responsável pela alteração olfativa, ou se é a infeção bacteriana que provocou um défice cognitivo maior nos pacientes DA.

Conclusão:

Os estudos sobre o assunto são difíceis de colocar em perspetiva: cada estudo avalia diferentes marcadores com diferentes citocinas, A β , pTau, ativação da microglia, declino cognitivo e diferentes parâmetros com diferentes idades dos ratos, diferentes métodos de exposição, ratos modelos de DA ou não com diferentes métodos para alcançar um “rato modelo de DA”. Por isso, mais estudos deverão ser conduzidos no futuro, na perspetiva de conhecer os mecanismos entre os dois processos patológicos e assim explorar mais as perspetivas terapêuticas.

Apesar disso, a grande maioria destes estudos mostra como a DP pode influenciar a DA, agravando o défice cognitivo dos pacientes através do agravamento das características da DA no cérebro.

Também foi demonstrado aqui que a DP, e mais especificamente a *Pg*, provoca estas marcas características nos cérebros de indivíduos saudáveis, deixando pensar que a DP poderia ser mais importante no processo patológico da DA que só uma agravação dos sintomas, apesar que os estudos para mostrar isso são, por razões éticas, realizados em ratos.

A haver uma interação estreita entre DP e DA, a saúde periodontal revela-se ainda mais importante na prevenção de doenças sistémicas, o que se torna ainda mais relevante com o aumento da esperança de vida. A prevenção do aparecimento da DA deve ser um fator de sensibilização suplementário na saúde oral. Tal como para as cardiopatias, no futuro os Médicos Dentistas deveriam provavelmente avaliar, na anamnese, o risco do paciente ter DA, de forma a elaborar um plano de tratamento mais adaptado.

Bibliografia:

- [1] World Health Organisation setembro 2021 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- [2] Bahar B, Kanagasingam S, Tambuwala MM, Aljabali AAA, Dillon SA, Doaei S, Welbury R, Chukkapalli SS, Singhrao SK. *Porphyromonas gingivalis* (W83) Infection Induces Alzheimer's Disease-Like Pathophysiology in Obese and Diabetic Mice. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(3):1259-1275. doi: 10.3233/JAD-210465. PMID: 34151813.
- [3] Díaz-Zúñiga J, More J, Melgar-Rodríguez S, Jiménez-Unión M, Villalobos-Orchard F, Muñoz-Manríquez C, Monasterio G, Valdés JL, Vernal R, Paula-Lima A. Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by *Porphyromonas gingivalis* in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Front Immunol.* 2020 Nov 9;11:588036. doi: 10.3389/fimmu.2020.588036. PMID: 33240277; PMCID: PMC7680957.
- [4] Jiang M, Zhang X, Yan X, Mizutani S, Kashiwazaki H, Ni J, Wu Z. GSK3 β is involved in promoting Alzheimer's disease pathologies following chronic systemic exposure to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in amyloid precursor protein^{NL-F/NL-F} knock-in mice. *Brain Behav Immun.* 2021 Nov;98:1-12. doi: 10.1016/j.bbi.2021.08.213. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34391814; PMCID: PMC8849844.
- [5] Tang Z, Liang D, Cheng M, Su X, Liu R, Zhang Y, Wu H. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and Its Underlying Mechanisms on Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation in Sprague-Dawley Rats. *J Mol Neurosci.* 2021 Jan;71(1):89-100. doi: 10.1007/s12031-020-01629-1. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32557144.
- [6] World Health Organisation março 2022 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
- [7] Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder MI, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker GD, Reynolds EC, Faull RLM, Curtis

MA, Dragunow M, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019 Jan 23;5(1):eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333. PMID: 30746447; PMCID: PMC6357742.

[8] Tsuneishi M, Yamamoto T, Yamaguchi T, Kodama T, Sato T. Association between number of teeth and Alzheimer's disease using the National Database of Health Insurance Claims and Specific Health Checkups of Japan. *PLoS One.* 2021 Apr 30;16(4):e0251056. doi: 10.1371/journal.pone.0251056. PMID: 33930067; PMCID: PMC8087029.

[9] Holmer J, Eriksdotter M, Schultzberg M, Pussinen PJ, Buhlin K. Association between periodontitis and risk of Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and subjective cognitive decline: A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2018 Nov;45(11):1287-1298. doi: 10.1111/jcpe.13016. PMID: 30289998.

[10] Choi S, Kim K, Chang J, Kim SM, Kim SJ, Cho HJ, Park SM. Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer's Disease or Vascular Dementia. *J Am Geriatr Soc.* 2019 Jun;67(6):1234-1239. doi: 10.1111/jgs.15828. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30874308.

[11] Chen CK, Wu YT, Chang YC. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimers Res Ther.* 2017 Aug 8;9(1):56. doi: 10.1186/s13195-017-0282-6. PMID: 28784164; PMCID: PMC5547465.

[12] Beydoun MA, Beydoun HA, Hossain S, El-Hajj ZW, Weiss J, Zonderman AB. Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *J Alzheimers Dis.* 2020;75(1):157-172. doi: 10.3233/JAD-200064. PMID: 32280099.

[13] Zhang S, Yang F, Wang Z, Qian X, Ji Y, Gong L, Ge S, Yan F. Poor oral health conditions and cognitive decline: Studies in humans and rats. *PLoS One.* 2020 Jul 2;15(7):e0234659. doi: 10.1371/journal.pone.0234659. PMID: 32614834; PMCID: PMC7332063.

- [14] Leblhuber F, Huemer J, Steiner K, Gostner JM, Fuchs D. Knock-on effect of periodontitis to the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Wien Klin Wochenschr.* 2020 Sep;132(17-18):493-498. doi: 10.1007/s00508-020-01638-5. Epub 2020 Mar 25. Erratum in: *Wien Klin Wochenschr.* 2020 Apr 6;: PMID: 32215721; PMCID: PMC7519001.
- [15] Laugisch O, Johnen A, Maldonado A, Ehmke B, Bürgin W, Olsen I, Potempa J, Sculean A, Duning T, Eick S. Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(1):105-114. doi: 10.3233/JAD-180620. PMID: 30223397.
- [16] Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Nohno K, Morozumi T, Yoshie H. Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues. *Arch Oral Biol.* 2017 Jul;79:35-41. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.003. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28285126.
- [17] Kantarci A, Tognoni CM, Yaghmoor W, Marghalani A, Stephens D, Ahn JY, Carreras I, Dedeoglu A. Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2020 Oct 29;10(1):18561. doi: 10.1038/s41598-020-75517-4. PMID: 33122702; PMCID: PMC7596239.
- [18] Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, *et al.* (2018) Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS ONE* 13(10): e0204941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>
- [19] Tran, V.T.A.; Kang, Y.J.; Kim, H.-K.; Kim, H.-R.; Cho, H. Oral Pathogenic Bacteria-Inducing Neurodegenerative Microgliosis in Human Neural Cell Platform. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6925. <https://doi.org/10.3390/ijms22136925>
- [20] Gu Y, Wu Z, Zeng F, Jiang M, Teeling JL, Ni J, Takahashi I. Systemic Exposure to Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* Induces Bone Loss-Related Alzheimer's Disease-Like Pathologies in Middle-Aged Mice. *J Alzheimers Dis.* 2020;78(1):61-74. doi: 10.3233/JAD-200689. PMID: 32925065.

[21] Hayashi K, Hasegawa Y, Takemoto Y, Cao C, Takeya H, Komohara Y, Mukasa A, Kim-Mitsuyama S. Continuous intracerebroventricular injection of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces systemic organ dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2019 Jun;120:1-5. doi: 10.1016/j.exger.2019.02.007. Epub 2019 Feb 17. PMID: 30786259.

[22] Wu Z, Ni J, Liu Y, Teeling JL, Takayama F, Collcutt A, Ibbett P, Nakanishi H. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain Behav Immun*. 2017 Oct;65:350-361. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.002. Epub 2017 Jun 10. PMID: 28610747.

[23] Qian X, Zhang S, Duan L, Yang F, Zhang K, Yan F, Ge S. Periodontitis Deteriorates Cognitive Function and Impairs Neurons and Glia in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;79(4):1785-1800. doi: 10.3233/JAD-201007. PMID: 33459718.

[24] Haditsch U, Roth T, Rodriguez L, Hancock S, Cecere T, Nguyen M, Arastu-Kapur S, Broce S, Raha D, Lynch CC, Holsinger LJ, Dominy SS, Ermini F. Alzheimer's Disease-Like Neurodegeneration in *Porphyromonas gingivalis* Infected Neurons with Persistent Expression of Active Gingipains. *J Alzheimers Dis*. 2020;75(4):1361-1376. doi: 10.3233/JAD-200393. PMID: 32390638; PMCID: PMC7369049.

[25] Yamada C, Akkaoui J, Ho A, Duarte C, Deth R, Kawai T, Nichols F, Lakshmana MK, Movila A. Potential Role of Phosphoglycerol Dihydroceramide Produced by Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Immunol*. 2020 Nov 23;11:591571. doi: 10.3389/fimmu.2020.591571. PMID: 33329577; PMCID: PMC7719741.

[26] Maurer K, Rahming S, Prvulovic D. Dental health in advanced age and Alzheimer's Disease: A possible link with bacterial toxins entering the brain? *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2018 Dec 30;282:132-133. doi: 10.1016/j.psychresns.2018.06.009. Epub 2018 Jun 26. PMID: 30291038.

