

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Odontología  
Departamento de Especialidades Clínicas Odontológicas



**Puesta a punto de un modelo de relación entre  
enfermedades periodontales y enfermedades psiquiátricas.  
Estudio preclínico *in vivo* (resultados preliminares)**

María González Zamora  
Tutora: Profesora Doctora Elena Figuero Ruiz  
Trabajo Fin de Máster en Ciencias Odontológicas 2018-2019

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Enfermedades periodontales</b>	<b>6</b>
1.1.1. Concepto y prevalencia	6
1.1.2. Etiología bacteriana	7
<b>1.2. Enfermedades psiquiátricas</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Enfermedades periodontales y enfermedades psiquiátricas</b>	<b>10</b>
1.3.1. Evidencia epidemiológica	10
1.3.2 Plausibilidad biológica	12
1.3.3 Estudios de intervención	14
<b>1.4 Modelos de inducción de periodontitis y depresión en ratas</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Justificación</b>	<b>16</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivo general:	17
2.2. Objetivo específico:	17
<b>3. Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>4. Material y métodos</b>	<b>19</b>
4.1. Diseño de estudio	19
4.2. Modelos de enfermedades	20
4.3. Registro de variables	21
4.4 Toma de muestras post-mortem	22
4.6 Variables del estudio	24
4.7. Cálculo del tamaño muestral	27
4.8 Análisis estadístico	28
<b>5. Resultados</b>	<b>29</b>
5.1 Descripción de la muestra	29
5.2 Inducción de periodontitis	29
<b>6. Discusión</b>	<b>35</b>
Limitaciones y fortalezas del estudio	39
<b>7. Conclusiones</b>	<b>41</b>
<b>Anexo I</b>	<b>42</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>45</b>

## ***Agradecimientos***

En primer lugar, quiero mencionar a mi directora de proyecto la Dra. Elena Figuro por aceptar guiarme en este proceso de aprendizaje, por su paciencia y su apoyo durante este año. Gracias también por ser ejemplo de dedicación, entusiasmo y entrega tanto trabajando como enseñando y hacer despertar en mí el interés por la investigación.

A María, Nagore, Estela, Leire, Javier y a todo el equipo del laboratorio por vuestra ayuda.

Y por último a Ana, compañera y amiga, por su apoyo incondicional.

A todos, gracias.

Para la realización de este estudio se estableció una **colaboración** entre el grupo de investigación de *Neuropsicofarmacología Molecular* del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y el grupo de investigación de Etiología y tratamiento de enfermedades periodontales y peri-implantarias (ETEP) y ha sido financiado por un proyecto de investigación Santander UCM.

# 1. Introducción

## 1.1 Enfermedades periodontales

### 1.1.1. Concepto y prevalencia

Tras la última clasificación de las enfermedades periodontales, se define gingivitis como una inflamación local de carácter reversible inducida por la acumulación de *biofilm* que normalmente no se extiende más allá de la inserción periodontal (Chapple et al., 2018). La periodontitis se caracteriza por presentar una destrucción irreversible de los tejidos de soporte del diente, se define como pérdida de inserción clínica interproximal en 2 o más dientes no adyacentes o pérdida de inserción clínica de 3 o más milímetros (mm) con bolsas periodontales mayores a 3 mm detectable en 2 o más dientes. Esta pérdida de inserción clínica no debe ser producida por causas no periodontales. La periodontitis es categorizada siguiendo una clasificación mediante estadios, extensión y grados. El estadio describe la gravedad de la enfermedad en su presentación inicial y la complejidad prevista del manejo de la enfermedad. Por cada estadio se describe la extensión, esta puede ser localizada (menos de un 30% de los dientes se encuentran afectados), generalizada (más de un 30%) o seguir un patrón incisivo molar. Por otro lado, el grado describe la velocidad y el riesgo de progresión de la enfermedad, así como la probabilidad de obtener un mal resultado tras el tratamiento y su impacto sobre la salud general (Papapanou et al., 2018).

Según la última Encuesta de Salud Oral en España en 2015, entre el 85-94% de la población española mayor de 35 años presenta algún tipo de enfermedad periodontal y entre el 16-30% de los españoles mayores de 35 años tiene periodontitis. Acorde a la clasificación de (Armitage, 1999) entre el 5-11% de la población adulta padece periodontitis avanzada (Calvo, 2012). Cabe señalar que la periodontitis severa es la sexta condición más frecuente a nivel mundial, afectando al 10,8% de la población global (743 millones de personas). Su prevalencia es mayor en la tercera y cuarta décadas de la vida (Kassebaum et al., 2014).

En 2016 fue publicado un estudio transversal cuya muestra estaba formada por trabajadores que residían en España. Los resultados mostraron que la condición periodontal en adultos jóvenes (35-44 años) había empeorado en comparación con los datos reportados en encuestas

nacionales anteriores. El 38.4% de los sujetos tenían bolsas periodontales (sondajes > 4mm) , [Intervalo de confianza (IC) del 95%: 36.4–40.5] este porcentaje aumentó significativamente en sujetos de ≥45 años. El 13,7% (IC 95%: 12,8–14,7) de los trabajadores mostró pérdida del nivel de inserción clínico (NIC) de 4–5 mm, mientras que el 7,7% (IC 95%: 7,0–8,5) mostró pérdida del NIC ≥6 mm, nuevamente aumentando significativamente en la población ≥45 años. (Carasol et al., 2016).

### 1.1.2. Etiología bacteriana

El principal factor etiológico de la periodontitis es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de biofilm subgingival en las superficies dentales (placa dental) («Consensus Report Periodontal Diseases», 1996).

La cavidad oral humana alberga la segunda microbiota más abundante después del tracto gastrointestinal. La Base de Datos de Microbiomas Orales Humanos (eHOMD) que se actualizó por última vez el 22 de noviembre de 2017, contiene información de aproximadamente 772 especies procariotas, de las cuales el 70% son especies cultivable y el 30% pertenece a la clase no cultivable. Además tenemos información de la secuencia genómica completa de 482 taxones (Verma, Garg, & Dubey, 2018).

De las más de 700 especies bacterianas que se han detectado en la microbiota subgingival, muy pocas han demostrado tener un papel esencial en la patogénesis de la periodontitis, siendo *Porphyromonas gingivalis* una de ellas. Esta bacteria consta de numerosos factores de virulencia, entre ellos se encuentra su capacidad de producir una disbiosis en la microbiota comensal del hospedador incluso cuando se encuentra en bajas proporciones (Hajishengallis, 2011). La disbiosis es un cambio producido en las comunidades bacterianas, que provoca la ruptura de la relación beneficiosa entre las bacterias y el hospedador, afectando negativamente a la salud periodontal (Sanz et al., 2018). Por tanto, las comunidades microbianas que están asociadas con la salud periodontal se hallan en simbiosis con el hospedador. El mantenimiento de este estado simbiótico dependerá de factores derivados tanto de las bacterias como del hospedador. Las alteraciones de la respuesta inmune pueden influir en el desarrollo de las enfermedades periodontales (función deteriorada o número

reducido de neutrófilos) además también pueden influir las actividades de ciertas especies bacterianas clave o *keystone pathogens* (*P. gingivalis*) capaces de manipular la estructura general de la población bacteriana e influir en toda la comunidad ecológica (Sanz et al., 2018). En diferentes estudios se ha demostrado que en la población española con periodontitis moderada-avanzada la prevalencia de *P. gingivalis* es alta (64,5%) (Sanz et al., 2000).

Aunque la acumulación de bacterias en forma de biofilm es el factor iniciador de las enfermedades periodontales, la respuesta inmune que se desencadena en el sujeto es realmente la responsable de la destrucción de los tejidos periodontales. Las células del sistema inmune producen grandes cantidades de mediadores inflamatorios incluyendo citoquinas [interleuquinas (IL) 1, 6, 8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) y metaloproteinasas (MMP) causantes de la destrucción de la inserción conectiva y de la reabsorción del hueso alveolar. A esta interacción entre la infección bacteriana y el sistema inmune se debe añadir la influencia de factores de riesgo genéticos y adquiridos, confirmando el carácter multifactorial de esta enfermedad (Page & Kornman, 1997).

## **1.2. Enfermedades psiquiátricas**

Las enfermedades psiquiátricas son alteraciones de tipo emocional, cognitivo y/o comportamental por las cuales quedan afectados procesos psicológicos básicos como son la emoción, la motivación, la cognición, la conciencia, la conducta, la percepción, la sensación, el aprendizaje, el lenguaje, etc. Todo ello dificulta a la persona su adaptación al entorno cultural y social en que vive y crea alguna forma de malestar subjetivo (OMS, 2017).

Dentro de ellas se encuentra el trastorno depresivo mayor (MDD) que se trata de un trastorno mental complejo, multifactorial, heterogéneo y, a menudo, crónico (Kessler & Bromet, 2013). Se estima que alrededor de 350 millones de personas se ven afectadas en todo el mundo (OMS, 2017).

Numerosas evidencias científicas tanto en modelos experimentales (*in vitro* e *in vivo*), como en muestras de humanos con patologías mentales (*in vivo* y tejido cerebral postmortem) sugieren que la neuroinflamación es un elemento importante en la fisiopatología de las patologías mentales y en concreto de la depresión. Los mecanismos implicados en la

fisiopatología de patologías mentales siguen sin conocerse en detalle, a pesar de los grandes esfuerzos realizados en investigación (Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008; Leza et al., 2015). En los últimos años la teoría inmune/inflamatoria de la patología mental ha recibido un especial interés, existiendo evidencias científicas a favor y aspectos sin responder.

La evidencia emergente respecto a la teoría inmune/inflamatoria de la patología mental indica que la inflamación sistémica tiene un profundo impacto en el comportamiento. Estas evidencias provienen tanto de modelos animales, como de estudios con muestras humanas a múltiples niveles (genético, periférico, con tejido cerebral postmortem y mediante técnicas de imagen) y de los ensayos clínicos con pacientes:

- 1.- En sujetos con depresión clínica se ha encontrado un aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) y de otros mediadores de respuesta de fase aguda (Proteína C reactiva) a nivel sistémico (Raison, Capuron, & Miller, 2006).
- 2.- Ha sido demostrada la activación microglial en el cerebro de pacientes deprimidos tras suicidio (Steiner et al., 2008).
- 3.- La inmunoterapia con citoquinas tipo Interferón en hepatitis C y cáncer a menudo causa síntomas depresivos (Hoyo-Becerra et al., 2015).
- 4.- Los fármacos antiinflamatorios tipo AINEs (aspirina, ibuprofeno, celecoxib y naproxeno) ejercen un cierto efecto antidepresivo y potencian el efecto de fluoxetina (Akhondzadeh et al., 2009).
- 5.- Los fármacos antidepresivos son antiinflamatorios en modelos animales de depresión (Martín-Hernández et al., 2016).
- 6.- Otro estudio demostró que el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal produce traslocación bacteriana de la microflora intestinal a otros órganos activando el sistema inmune innato ("leaky gut") (Maes, Kubera, Leunis, & Berk, 2012; Gárate et al., 2013).

Está bien establecido que la inflamación sistémica producida por las citoquinas pro-inflamatorias que comunican con el cerebro induce un espectro de cambios en el comportamiento considerado como patológico (Perry, 2004).

El patrón y la magnitud de estas respuestas están determinados por varios factores como la duración de la exposición (crónica o aguda) y el tipo de estrés (físico o psicológico) (Joëls &

Baram, 2009). Además, la alteración del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HPA) tiene un efecto proinflamatorio o antiinflamatorio en los tejidos. Por lo tanto, parece haber una asociación significativa entre los factores estresantes ambientales, los factores psicológicos y el sistema inmunológico (LeResche & Dworkin, 2002).

### **1.3. Enfermedades periodontales y enfermedades psiquiátricas**

El término “**Medicina Periodontal**” nació de la mano de Steven Offenbacher en 1996 (Offenbacher, 1996). Esta disciplina tiene como objetivo estudiar y establecer una posible relación entre las enfermedades periodontales y las enfermedades o afecciones sistémicas, así como evaluar la plausibilidad biológica e implicaciones preventivas y terapéuticas de las mismas, habiéndose relacionado entre otras con la diabetes (Chapple, Genco, & Working group 2 of joint EFP/AAP workshop, 2013), el embarazo (Mariano Sanz, Kornman, & Working group 3 of joint EFP/AAP workshop, 2013) y las enfermedades cardiovasculares (Tonetti, Van Dyke, & working group 1 of the joint EFP/AAP workshop, 2013) (Consenso de la Federación Europea de Periodoncia [EFP] y la Academia Americana de Periodoncia [AAP]). A la hora de estudiar la relación entre enfermedades periodontales y psiquiátricas llama la atención la presencia de mediadores inflamatorios comunes y su impacto sistémico (Esteves Lima, Miranda Cota, & Costa, 2013).

A continuación, se detallan los mecanismos de relación estudiados en cuanto a enfermedades periodontales y mentales.

#### **1.3.1. Evidencia epidemiológica**

En estudios **transversales o de casos y controles** se ha demostrado una asociación positiva entre la depresión y la periodontitis. El grupo de Johannsen (Johannsen, Rydmark, Söder, & Åsberg, 2007) publicó un estudio transversal en el que los pacientes con depresión tenían estadísticamente mayor inflamación gingival 1,59 frente 0,89 (índice gingival de Loe & Silness, 1967) y mayor profundidad de sondaje (3,06mm frente 2,57mm) que los controles. A su vez, (Moss et al., 1996) observaron que alta prevalencia en el recuento de Inmunoglobulina G estaba asociada a pacientes diagnosticados con periodontitis pero sólo entre individuos con depresiones más acentuadas (OR = 6,75 IC 95%= 1,25 a 36,5). (Genco et al., 1999) publicó que

el estrés producido por problemas económicos estaba asociado a una mayor pérdida ósea y de pérdida de inserción OR=1,7 entre diferentes grados de periodontitis y depresión, así como que también existía una relación positiva entre el nivel clínico de inserción periodontal (Saletu et al., 2005; Rosania, Low, McCormick, & Rosania, 2009), la inflamación gingival, los niveles de placa (Johannsen et al., 2007) y la pérdida dentaria (Rosania et al., 2009; Persson et al., 2003) con la depresión.

Otro estudio clínico de corte transversal también mostró que la ingesta de fluoxetina un tipo de antidepresivo (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina), se asocia con un menor sangrado al sondaje y una menor pérdida de inserción en pacientes con periodontitis estadio II grado B generalizada y depresión clínica (Bhatia, Sharma, Tewari, Khurana, & Narula, 2015).

En **estudios longitudinales** se ha demostrado que los síntomas de la depresión estaban significativamente asociados con la pérdida de inserción periodontal en pacientes adultos de raza blanca, pero no en poblaciones negras (Elter, Beck, Slade, & Offenbacher, 1999).

Varios estudios clínicos también han demostrado una relación entre periodontitis y depresión (Rosania et al., 2009; Klages, Weber, & Wehrbein, 2005). La ansiedad experimentada por los pacientes con periodontitis se correlacionó significativamente con la progresión de la periodontitis (Rai, Kaur, Anand, & Jacobs, 2011). Un estudio de cohortes de base poblacional con un período de seguimiento a largo plazo (10 años) mostró mayor incidencia de depresión en el grupo de periodontitis (N = 12,708) que en el grupo de pacientes que no la presentaban (N = 50832) con un riesgo relativo de 1,73 cuando se ajusta por sexo, edad y comorbilidad (Hsu et al., 2015). Este resultado sugiere que la periodontitis es un factor de riesgo independiente para la depresión independientemente del sexo, la edad y las comorbilidades, excepto la diabetes, el abuso del alcohol y el cáncer.

Existe también una relación con la enfermedad de Alzheimer, en el año 2016 un estudio de cohortes de 6 meses de duración reportó que el estado cognitivo se ve deteriorado en el grupo de pacientes con Alzheimer y periodontitis en comparación con el del grupo de Alzheimer sin periodontitis (Ide et al., 2016).

### 1.3.2 Plausibilidad biológica

La relación entre la depresión y el mal estado de salud oral se ha examinado ampliamente (Delgado-Angulo et al., 2015; Genco, Ho, Grossi, Dunford, & Tedesco, 1999; W. S. Marcenes & Sheiham, 1992; W. Marcenes et al., 2013). Se ha demostrado que algunos factores psicológicos pueden afectar las reacciones a eventos estresantes y modificar o inducir ciertos comportamientos como la higiene bucal desatendida (Armitage, 1999).

La depresión está asociada a una respuesta inflamatoria crónica, de bajo grado y activación de la inmunidad celular, así como, con un aumento en el estrés oxidativo, contribuyendo a una neuro-progresión del trastorno (Beck, Schmid, Berres, & Monsch, 2014).

Tanto la periodontitis como la depresión se asocian con una inflamación sistémica. Por ello, esta puede ser la vía de relación fisiopatológica entre las dos enfermedades.

La plausibilidad biológica de la asociación entre depresión y periodontitis está respaldada por estudios que demuestran cómo la depresión puede afectar la respuesta inmune del huésped, haciendo que el individuo sea más susceptible al desarrollo de condiciones patológicas y afecte la salud periodontal (Genco et al., 1998; Peruzzo et al., 2007; Warren et al., 2014a). Los glucocorticoides liberados en la corteza de las glándulas supra-renales pueden inducir la reducción en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL, PGE<sub>2</sub> y TNF- $\alpha$ ). Por otro lado, las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) tienen el efecto opuesto, estimulando la formación y la actividad de las prostaglandinas y las enzimas proteolíticas lo que puede provocar indirectamente la destrucción del tejido (Genco et al., 1998; T. Breivik et al., 2001).

En recientes revisiones sistemáticas han concluido que los pacientes diagnosticados con depresión presentan mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias a nivel sérico tales como las IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ , así como niveles elevados de PCR (Howren, Lamkin, & Suls, 2009; Dowlati et al., 2010). Teniendo en cuenta que en la periodontitis, se ha visto la asociación con niveles elevados de marcadores de inflamación sistémica, en particular con IL-6, TNF- $\alpha$  y PCR, se cree que podría potenciar la respuesta inflamatoria y oxidativa, este podría ser el modo de vulnerabilidad hacia la depresión (Dumitrescu, 2016).

El estrés crónico y la depresión pueden mediar en el riesgo y velocidad en la progresión de la periodontitis a través del cambio en los comportamientos relacionados con la salud, como la higiene oral, el tabaquismo y la dieta (Warren et al., 2014b). Además, a medida que la periodontitis se vuelve crónica, aumenta la aparición de depresión (Tang & Cao, 2011).

En un estudio en dos poblaciones de ratas con líneas genéticas diferentes y diferencias en respuestas de comportamiento y neuroendocrinas frente al estrés, se observó un aumento de la susceptibilidad a periodontitis en términos de profundidad de sondaje, nivel óseo y nivel de inserción clínico en el grupo con conductas asimilables al estrés (T. Breivik, Sluyter, Hof, & Cools, 2000). En otro modelo con ratas Wistar en el que se indujo periodontitis mediante ligaduras comparando un grupo con estrés frente a un grupo control, se pudo observar como ante estrés repetido se aumentaron los niveles de pérdida ósea periodontal (Takada et al., 2004).

Por último, una reciente revisión sistemática que incluyó quince artículos (ocho estudios transversales, seis casos y controles y un estudio de cohortes) con gran heterogeneidad existente entre los estudios, concluye que existe una tendencia para afirmar que la periodontitis podría estar asociada con la depresión (Araújo et al., 2016).

A pesar de ello, la evidencia de la asociación entre la depresión y la periodontitis es contradictoria en la literatura.

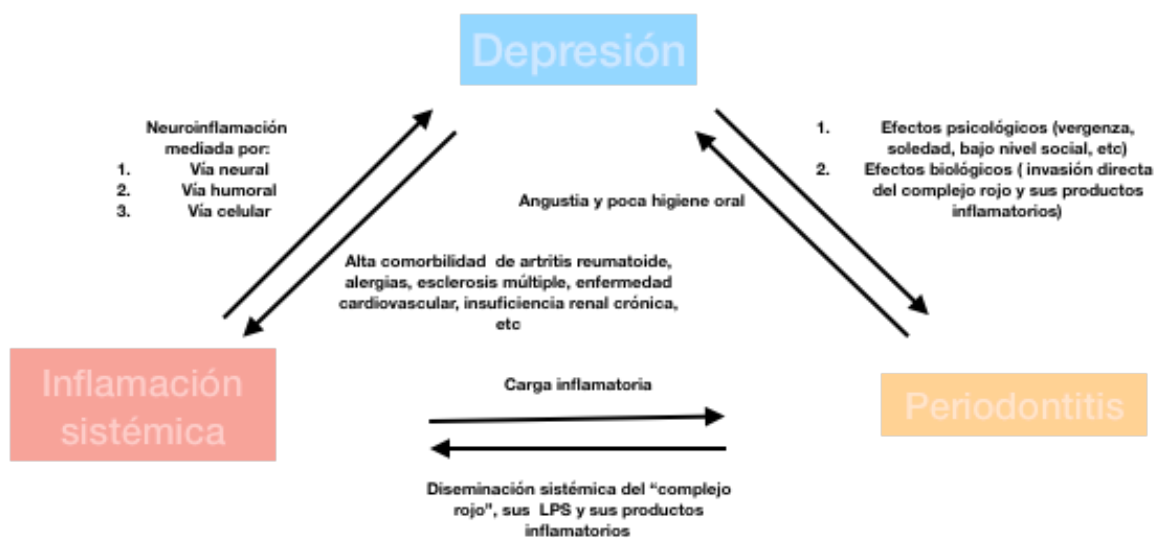


Figura 1. Esquema de plausibilidad biológica modificado de Arauchi et al., 2018

### 1.3.3 Estudios de intervención

Actualmente no existen publicados **estudios de intervención** realizados en humanos, pero si en modelos animales; siendo el animal más comúnmente utilizado las ratas.

La administración periférica de lipopolisacáridos (LPS) de endotoxinas, un componente de la pared celular bacteriana Gram-negativa, ha demostrado un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), tanto en la periferia como en el cerebro, especialmente en microglia y macrófagos perivasculares en el cerebro (Layé, Parnet, Goujon, & Dantzer, 1994; Godbout et al., 2008).

En otro estudio tras realizar el mismo análisis, se detectó LPS de *P. gingivalis* en cerebros con Alzheimer pero no en cerebros del grupo control (Poole, Singhrao, Kesavalu, Curtis, & Crean, 2013).

Curiosamente, un estudio en animales demostró que la tianeptina (antidepresivo tricíclico) ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias (Hashioka et al., 2007; Hashioka, McGeer, Monji, & Kanba, 2009), ralentiza la progresión de la periodontitis y mejora el comportamiento relacionado con la emocionalidad y la ansiedad. Todo esto ha sido probado en el modelo de bulbectomía olfativa en un modelo de ratas con depresión y periodontitis inducida por ligadura (Torbjorn Breivik et al., 2006).

### 1.4 Modelos de inducción de periodontitis y depresión en ratas

Actualmente existen diversos **modelos de inducción de periodontitis** para el modelo animal de ratas: ligaduras de seda, nylon o algodón o modelos combinados de inducción con bacterias y ligaduras.

El más ampliamente utilizado es el modelo de ligadura, con las variantes de seda, nylon o algodón (sutura de seda 3.0 (Kirzioğlu et al., 2017; Hosadurga et al., 2014; Wada-Mihara et al., 2018) o las ligaduras con sutura de nylon 3.0 (França et al., 2017).

Otro modelo de inducción es la ligadura de algodón, (Oliveira et al., 2017) en un modelo de 32 ratas Wistar quería observar el beneficio de los probióticos sobre la periodontitis experimental y obtuvieron resultados de pérdida ósea estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para el grupo tratamiento. Este modelo también fue utilizado por (Swerts et al., 2017) donde en 80 ratas Wistar vieron el efecto del láser en ratas modificadas genéticamente. También fue

utilizado por (Cirano et al., 2016) en ratas Wistar para observar el efecto del resveratrol sobre los patógenos periodontales en periodontitis experimental en ratas. Por último, también se utilizó el modelo de ligaduras de algodón en el estudio de Santos (Santos, Souza, Brigagão, Lima, & Fernandes, 2017) el objetivo era analizar la aplicación de estatinas en el tratamiento de la periodontitis experimental y obtuvieron resultados positivos para el grupo de tratamiento.

En otros casos se ha utilizado un modelo combinado de inducción con bacterias (*P. gingivalis*) y ligaduras. En el estudio de (Kuraji, Fujita, Ito, Hashimoto, & Numabe, 2018) en 34 ratas Wistar estudiaron la comorbilidad entre periodontitis y obesidad y a su vez compararon la potencial pérdida ósea entre un grupo con ligaduras, otro grupo con ligaduras bañadas en *P. gingivalis* y un grupo control. El resultado arrojó que en todos los casos se observaba pérdida ósea, siendo más avanzada en el grupo con ligaduras y *P. gingivalis* pero se observó trauma mecánico a nivel histológico. El modelo combinado también fue utilizado en el estudio de (Liu et al., 2012), realizado en ratas Sprague Dawley, dónde buscaban ver los efectos sistémicos del ornidazol en periodontitis experimental.

Respecto a los **modelos de inducción de depresión**, el modelo de estrés leve crónico (CMS, por sus siglas en inglés) es uno de los modelos de depresión más validados. Se centra en la acción sobre el sistema nervioso central ocasionando anhedonia en los seres humanos (incapacidad para experimentar placer, pérdida de interés o satisfacción por todas las actividades) o comportamientos similares anhedónicos en animales (P. Willner, 2005).

El paradigma de la CMS implica la exposición de los animales a una serie de factores estresantes leves de manera impredecible (aislamiento o alojamiento abarrotado, privación de alimentos o agua, interrupción del ciclo de luz y oscuridad, inclinación de las jaulas de la casa, ropa de cama humedecida, etc.) durante un período de varias semanas o incluso meses (al menos 2 semanas). La ventaja de este modelo de CMS es que el estrés producido induce cambios duraderos en los parámetros conductuales, neuroquímicos, neuroinmunes y neuroendocrinológicos que se asemejan a las disfunciones observadas en pacientes deprimidos (P. Willner, 1997; P. Willner, 2005; Wiborg, 2013).

Históricamente, el primer modelo de estrés crónico de anhedonia fue desarrollado por (Katz & Hersh, 1981). En ese momento, los autores utilizaron factores estresantes severos, como

descargas eléctricas, estrés por agitación y estímulos fríos. Los niveles basales de corticosterona aumentaron, y una menor preferencia por el consumo de sacarosa sugirió una disminución en la sensibilidad de la recompensa, lo que indica una condición similar a la de los estados anhedónicos (Katz & Hersh, 1981; Katz & Baldrighi, 1982). Basándose en estas observaciones, Willner modificó el paradigma mediante el uso de factores de estrés más moderados durante más tiempo para lograr condiciones inductoras más realistas. Por lo tanto, el modelo de CMS de Willner imita los estresores de la vida humana más estrechamente que el modelo de Katz (P. Willner, Towell, Sampson, Sophokleous, & Muscat, 1987; P. Willner, Muscat, & Papp, 1992). Por lo general, se prefieren ratas criadas, pero también se han desarrollado protocolos de CMS para ratones (Schweizer, Henniger, & Sillaber, 2009).

Se trata pues de un estrés crónico, mixto físico-psicológico, impredecible e inescapable que desde que se utilizó por primera vez (P. Willner et al., 1987) se ha considerado uno de los mejores modelos animales de depresión. La elección de este modelo se debe a que su validez aparente, de constructo y predictiva se han demostrado en un gran número de estudio (P. Willner, 1997).

Pese a la evidencia encontrada en la literatura, ninguno de los estudios evalúa el papel que juega la neuroinflamación en la relación entre periodontitis y depresión. Únicamente Breivik y cols. 2006 (Torbjorn Breivik et al., 2006) observaron que las ratas con depresión inducida presentaban estados más severos de periodontitis. Sin embargo, no se ha podido establecer plausibilidad biológica de la relación. Por lo tanto, aún no se ha podido establecer el mecanismo de relación causal entre depresión y periodontitis; es por ello que cobra especial importancia una investigación que dirige los esfuerzos a esclarecer la relación de plausibilidad entre ambas patologías.

## **1.5 Justificación**

Basándonos en la evidencia epidemiológica, la plausibilidad biológica y la escasa evidencia derivada de estudios preclínicos *in vivo* es de interés científico ahondar en relación entre la periodontitis y la depresión para tratar de entender la fisiopatología de inflamación/infección relacionada con la periodontitis en la fisiopatología de la depresión.

## 2.Objetivos

### 2.1. Objetivo general:

El objetivo general es analizar mediante un estudio preclínico *in vivo* los mecanismos existentes de la relación entre depresión y periodontitis.

### 2.2. Objetivo específico:

- Poner a punto un modelo preclínico *in vivo* (ratas) para el estudio de la influencia de las enfermedades periodontales (periodontitis) en las enfermedades psiquiátricas (depresión) tanto a nivel molecular como comportamental.
- El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es comparar la pérdida ósea producida entre cuatro grupos de experimentación medida a nivel de trece localizaciones en hemi-mandíbulas de ratas mediante un análisis fotográfico calibrado.

### 3.Hipótesis

Los animales con periodontitis inducida presentan una mayor vulnerabilidad frente a la respuesta neuroinflamatoria y los cambios comportamentales producidos en un modelo experimental de depresión basado en la exposición a estrés.

#### Hipótesis específicas

- Las enfermedades periodontales (periodontitis) tienen influencia en las enfermedades psiquiátricas (depresión) tanto a nivel molecular como comportamental.
- La pérdida ósea producida en el grupo con periodontitis y depresión es superior a la producida en los grupos que tienen únicamente periodontitis o depresión y el grupo control.

## 4. Material y métodos

Todos los protocolos experimentales, manejo de animales y sacrificio se realizarán siguiendo las normas de uso de animales de experimentación establecidas por la legislación vigente (según Real Decreto 53/2013), previa aprobación por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Complutense (UCM) y la Comunidad de Madrid. Las ratas fueron estabuladas en las instalaciones (animalario de la Facultad de Medicina) de la UCM. Se utilizaron ratas Wistar: Hann macho peso comprendido entre 230-250grs.

### 4.1. Diseño de estudio

Se trata de un estudio preclínico in vivo experimental con ratas Wistar: Hann macho con peso comprendido entre 230-250grs.

El estudio consto de dos fases de investigación:

- Fase 1: Inducción del modelo de periodontitis (12 semanas).
- Fase 2: Inducción del modelo de depresión (3 semanas).

Durante todo el periodo de inducción de la depresión se continuó con el proceso de lavados orales con patógenos periodontales con el fin de mantener el estímulo infeccioso.

Al final de este periodo contamos con 4 grupos de estudio: (a) con periodontitis y con depresión (b) con periodontitis y sin depresión, (c) sin periodontitis y con depresión y (d) sin periodontitis y sin depresión.

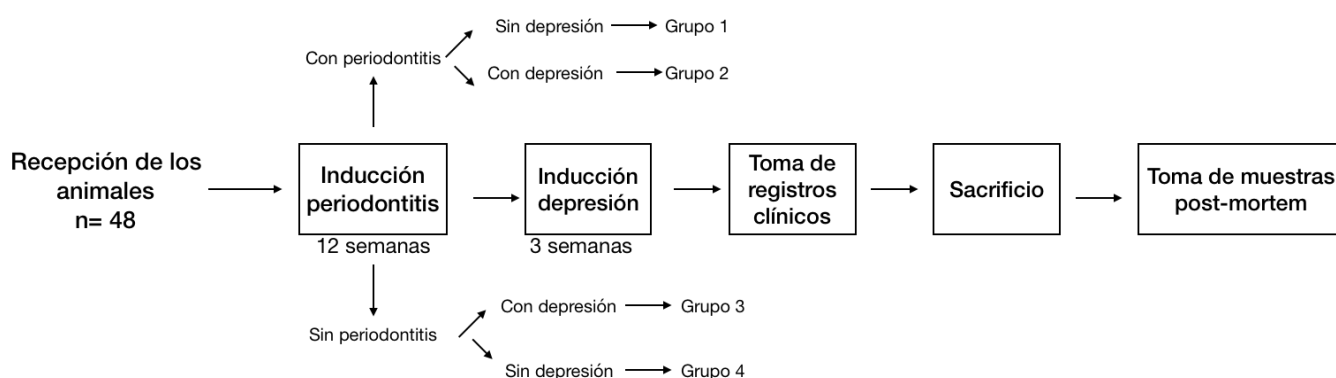


Figura 2: Diagrama resumen de la metodología y temporalización del experimento

## 4.2. Modelos de enfermedades

### a. Modelo de periodontitis:

Para inducir periodontitis experimental en las ratas del estudio se preparó una disolución de dos bacterias con demostrada patogenicidad periodontal; *P. gingivalis* ATCC W83K1 y *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482. Ello conlleva el mantenimiento de los cultivos anaerobios bacterianos [80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> at 37 grados centígrados (°C)] y la preparación de la disolución diaria con la concentración adecuada de bacterias. Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) [25 mililitros (ml)] (Becton, Dickinson and Company, USA). El crecimiento bacteriano se ajustó por espectrofotometría con el objetivo de obtener una solución de BHI con 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/ml) para cada una de las bacterias.

Se retiraron con ayuda de una pipeta 100ul de cada uno de los cultivos y se sembraron diluciones 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> con el fin de controlar las UFC/ml del cultivo y la ausencia de contaminaciones. Los dos cultivos puros se mezclaron y centrifugaron durante 10 minutos a 4000 revoluciones por minuto rpm (revoluciones por minuto) con el fin de separar las bacterias del medio de cultivo. Una vez retirado el medio de cultivo, las bacterias depositadas se resuspendieron en 50ml de la solución de lavado [PBS (phosphate-buffered saline) al 2% de carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma, St. Louis, MO, USA)]. Se preparó asimismo una disolución de lavado sin bacterias para utilizarla como placebo. Se administró 1ml de la disolución con las bacterias o placebo cuatro veces por semana durante doce semanas a cada uno de los animales de estudio con ayuda de una jeringuilla de insulina.

### b. Modelo de depresión (Chronic Mild Stress [CMS]) (Martín-Hernández et al., 2016)

Los animales fueron sometidos durante 21 días a una serie aleatoria de estímulos estresantes de intensidad leve, para evitar la habituación. En un mismo día los animales estuvieron expuestos a dos tipos de estímulos estresantes distintos y consecutivos, salvo un día a la semana en el que no estuvieron en presencia de ningún estímulo estresante.

Los estímulos estresantes empleados fueron:

- 1) Emparejar dos animales en la misma jaula. Un mismo animal es visitante y visitado a lo largo de la semana

- 2) Jaula inclinada en un ángulo de 45°C
- 3) Jaula mojada: 250 ml de agua en el serrín de cada una de las jaulas
- 4) Iluminación Estroboscópica: 150 flashes /min
- 5) Privación Agua
- 6) Privación comida

En el caso de que el animal sufriera lesiones de cualquier tipo, se pusiera enfermo o moribundo, se le aplicaron cuidados veterinarios según recomendaciones y procedimientos autorizados.

Los animales fueron alimentados con una dieta estándar compuesta por 3% de grasa, 60% de hidratos de carbono, 16% de proteínas y 21% de vitaminas y minerales por cada 100 gramos de alimentos. Se trata de un pienso estándar de mantenimiento (alimentación *ad libitum*) de consistencia dura.

#### **4.3. Registro de variables**

El registro de las variables clínicas se realizó con una sonda periodontal de 0,4mm de diámetro: el índice de sangrado simplificado (presencia/ausencia), la profundidad de sondaje (aumentada si es >0,2mm) y el índice gingival modificado de Lobene (se trata de una modificación del índice desarrollado por Silness & Loe en 1963 para evaluar el tejido gingival en el que no se utiliza sonda periodontal. Las puntuaciones van de 0 a 3 siendo 0 ausencia de inflamación: encía normal, 1 Inflamación leve: ligero cambio de color y escaso cambio de textura sin sangrado al sondaje, 2 Inflamación moderada: enrojecimiento y aspecto brillante, edema e hipertrofia moderada, sangrado al sondaje, 3 Inflamación severa: marcado color rojo, edema e hipertrofia pronunciada, sangrado espontáneo o ulceraciones. El registro de las variables clínicas se realizó bajo anestesia general tras doce semanas de inducción de la periodontitis y tras la última sesión de estrés. La toma de muestras in vivo se realizó bajo condiciones de anestesia y analgesia y por último el destino final de los animales fue el sacrificio.

#### 4.4 Toma de muestras post-mortem

El sacrificio fue realizado mediante anestesia terminal con pentobarbital sódico (220mg/kg i.p.; previamente diluido con salino estéril) y posterior decapitación con guillotina.

Tras la eutanasia se procedió a la disección de los animales, en este caso la conservación de las hemi-mandíbulas se realizó en condiciones de temperatura a 30 °C bajo cero.

Algunos animales fueron sometidos a *aislamiento y extracción de tejido fresco*, las muestras fueron recogidas en nieve carbónica y almacenadas a -80°C hasta posterior utilización según determinación. Tras esto se extrajeron las siguientes áreas cerebrales relevantes para el estudio de la neuroinflamación: como corteza frontal, hipocampo e hipotálamo. Igualmente, se extrajeron muestras de mandíbula, hígado, bazo, ganglios cervicales y corazón.

El resto de animales se sometieron a un análisis morfométrico para lo que se procedió a la tinción de las muestras con azul de metileno mediante el siguiente protocolo:

1. Retirada de las hemimandíbulas del congelador (figura 3).
2. Introducción de las mismas en 75 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 100 ml.
3. Colocación del vaso de precipitado en la placa calefactora (T.ARE *heating magnetic stirrer with timer*, VELP científica ®) a 370° C hasta conseguir el punto de ebullición (figura 4).
4. Una vez adquirido el punto de ebullición se disminuye la temperatura a 200° C.
5. Durante 30 minutos se mantiene la temperatura a 200 ° C .
6. Una vez reblandecido, el tejido blando se retira con un cepillo de dientes de dureza media de Vitis ® (Barcelona).
7. Las hemi-mandíbulas privadas del tejido blando, se depositan en tubos Falcon de 50 ml con 45 ml de agua y se posicionan en el agitador orbital (Heidolph Rotamax 120) a 150 revoluciones por minuto (rpm) durante 1 semana con la finalidad del precipitado de tejido blando remanente.
8. Transcurrida la semana, se introduce la hemi-mandíbula de nuevo en agua destilada en la placa calefactora. Tras alcanzar el punto de ebullición, se mantiene a 200°C durante 10 minutos.

9. Para la eliminación de los restos de tejido blando remanente, se utilizó un cepillo de dientes de dureza media Vitis ® (Barcelona) y una cureta tipo Gracey Hu-Friedy ® mini 5-6 con el fin de eliminar cualquier resquicio de tejido blanco.
10. Una vez eliminado el tejido blando por completo, se procede a la tinción de las hemimandíbulas individualmente durante 1 minuto con azul de metileno (figura 5).
11. Tras esto se lavan con abundante agua y se dejan secar durante una semana.

Figuras 3 y 4: hemi-mandíbula tras retirada del congelador y preparación para la cocción

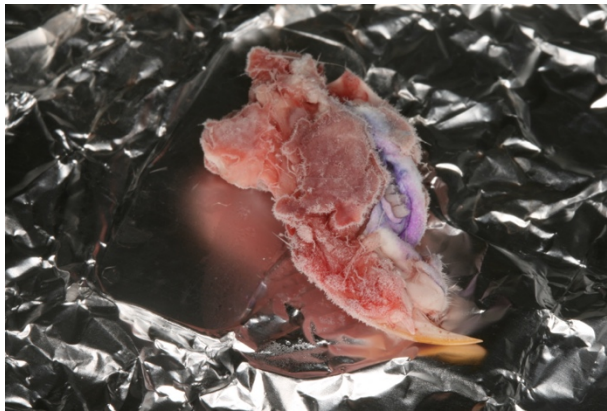
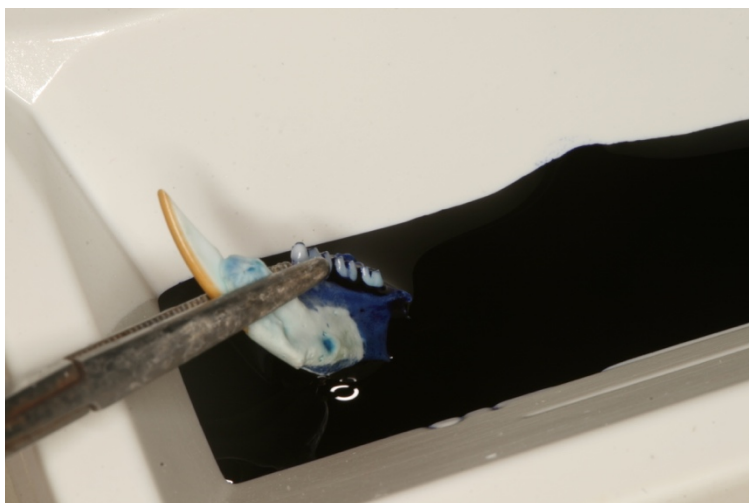


Figura 5: Tinción en azul de metileno



Este proceso así como las fotografías correspondientes a las mediciones fueron realizadas por dos investigadores (M.M y M.G)

#### 4.6 Variables del estudio

La variable respuesta principal es la pérdida ósea. Esta fue analizada mediante fotografías realizadas con el microscopio Nikon SMZ800<sup>®</sup> (Nikon Instrument Inc. Melville, Nueva York, Estados Unidos) a un aumento de 2x y las mediciones calibradas se realizaron utilizando el programa Leica Application Suite<sup>®</sup> ( Microsistemas Leica, Suiza).

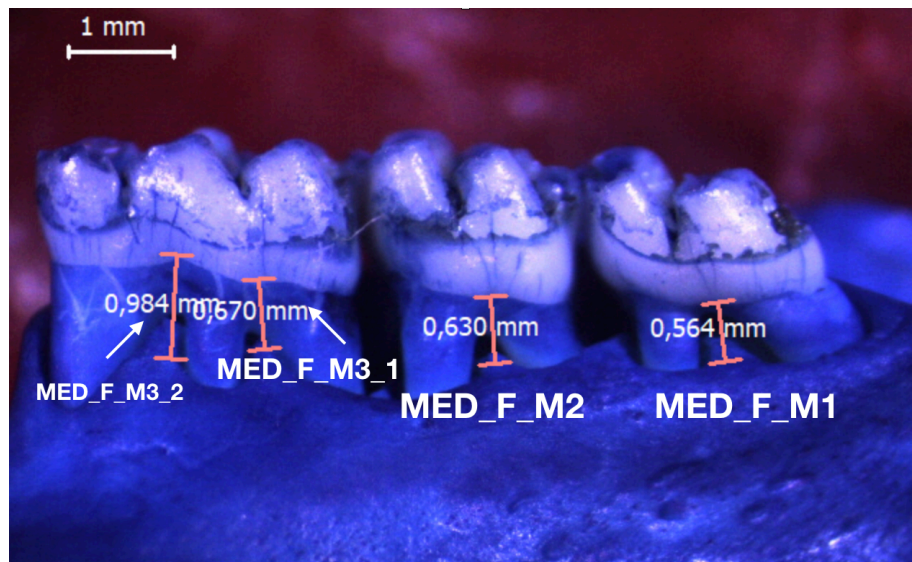
Para estandarizar la obtención de las fotografías se llevó a cabo el siguiente protocolo: en primer lugar, se colocó la hemi-mandíbula en un bloque de cera (utilizada comúnmente para suplementar cubetas ) de 2 cm de altura, de tal manera que la cara palatina de los molares quedase lo más paralela posible a la base y sin observarse la cara oclusal desde un punto de vista cenital. Una vez posicionadas las hemimandíbulas correctamente, se procedió a realizar las fotografías con el microscopio, esto fue llevado a cabo por (M.M). Una vez obtenidas las fotografías, se triplicaron para poder realizar en cada una de ellas el conjunto de las mediciones correspondiente a cada una de las medidas. Una vez obtenidas todas las fotografías se procedió a realizar las mediciones (M.G y M.M).

El análisis morfométrico se realizó en cada una de las fotografías utilizando una escala calibrada en milímetros. Cada fotografía se corresponde a la hemi-mandíbula derecha y en ella se incluyen tres molares. Se utilizó una fotografía de modelo en la que se realizaron durante 5 veces las mediciones hasta llegar a un índice de acuerdo kappa de 90 entre M.G y M.M.

Las mediciones que se realizaron fueron las siguientes:

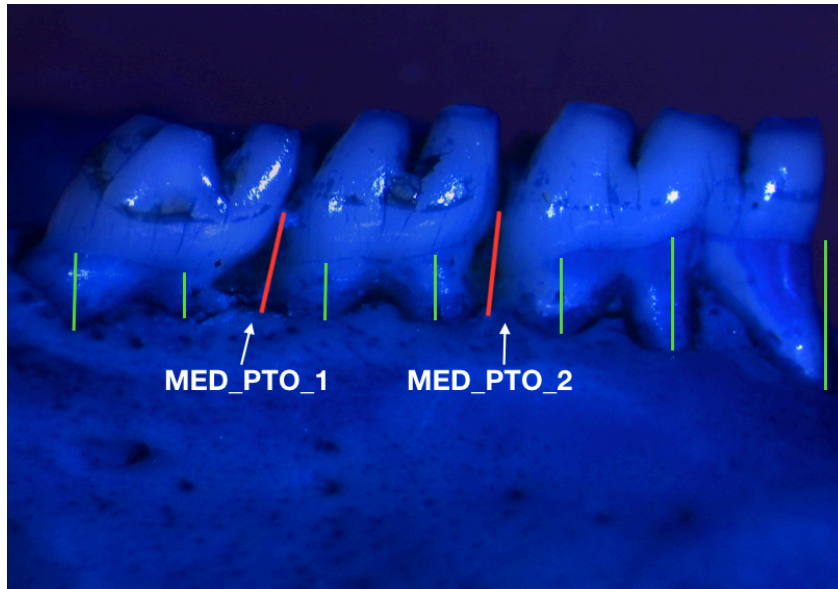
1. Distancia desde la línea amelo-cementaria (LAC) a la cresta ósea medida en el nivel de la furca. Esta medición se realiza a nivel de 4 puntos correspondientes a las furcas de las piezas involucradas. El objetivo de dicha medición es valorar la pérdida ósea ocasionada a nivel de la furca (figura 6).
2. Distancia desde el punto de contacto entre los molares hasta la cresta ósea. Se realiza en los puntos de contacto entre el primer y segundo molar y entre el segundo y tercer molar. El objetivo de esta medición es valorar la pérdida de tejido óseo interproximal (figura 7).
3. Distancia desde el punto más apical de la cresta (a nivel de cada raíz) hasta el LAC medido en su proyección perpendicular en el LAC. Se obtiene en las 7 raíces correspondientes a las piezas y su objetivo es medir la pérdida ósea a nivel radicular (figura 8).

Figura 6: Medición de la distancia LAC- cresta ósea a nivel de la furca (medida 1)



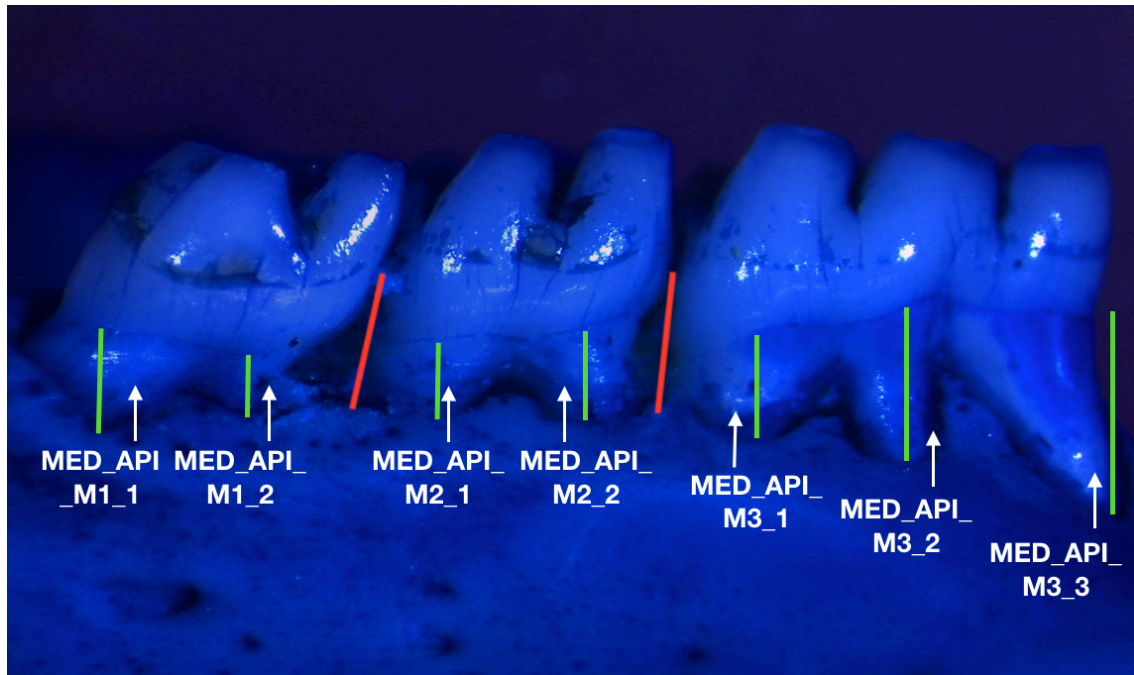
Se registran 4 puntos: MED\_F\_M1: distancia desde el LAC hasta la cresta ósea a nivel de la furca en el primer molar, MED\_F\_M2: distancia desde el LAC hasta la cresta ósea a nivel de la furca en el segundo molar, MED\_F\_M3\_1: distancia desde el LAC hasta la cresta ósea a nivel de la primera furca en tercer molar y MED\_F\_M3\_2: distancia desde el LAC hasta la cresta ósea a nivel de la segunda furca en el tercer molar.

Figura 7: Medición desde el punto de contacto entre los molares hasta la cresta ósea (medida 2)



Se registran 2 puntos: MED\_PTO\_1: medición desde el punto de contacto hasta la cresta ósea entre primer y segundo molar y MED\_PTO\_2: medición desde el punto de contacto hasta la cresta ósea entre segundo y tercer molar.

Figura 8: Distancia desde el punto más apical de la cresta en cada raíz a su proyección perpendicular al LAC (medida 3)



Se registran 7 puntos: MED\_API\_M1\_1: medición desde el punto más apical de la cresta en la primera raíz del primer molar en su proyección perpendicular al LAC. MED\_API\_M1\_2: medición desde el punto más apical de la cresta en la segunda raíz del primer molar en su proyección perpendicular al LAC, MED\_API\_M2\_1: medición desde el punto más apical de la cresta en la primera raíz del segundo molar en su proyección perpendicular al LAC, MED\_API\_M2\_2: medición desde el punto más apical de la cresta en la segunda raíz del segundo molar en su proyección perpendicular al LAC, MED\_API\_M3\_1: medición desde el punto más apical de la cresta en la primera raíz del tercer molar en su proyección perpendicular al LAC, MED\_API\_M3\_2: medición desde el punto más apical de la cresta en la segunda raíz del tercer molar en su proyección perpendicular al LAC y MED\_API\_M3\_3: medición desde el punto más apical de la cresta en la tercera raíz del tercer molar en su proyección perpendicular al LAC.

#### 4.7. Cálculo del tamaño muestral

No existen publicados estudios previos utilizando los dos modelos experimentales combinados que analicen los parámetros planteados en el proyecto. Sin embargo, se realizó el cálculo del tamaño muestral utilizando datos experimentales previos (obtenidos conjuntamente por el grupo de investigación de *Neuropsicofarmacología Molecular*, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM y el grupo de investigación de Etiología y terapéutica de las enfermedades periodontales (ETEP) perteneciente al Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la UCM) en estudios que utilizaban el modelo de CMS y también otros grupos que utilizaban

protocolos de experimentación similares. Fijamos una desviación standard hipotética=25 y una diferencia a detectar=50 (2 x sigma) en la expresión de parámetros inflamatorios a nivel de proteína y de Ácido ribonucleico mitocondrial (ARNm) (Martín-Hernández y cols., 2016). Lo que nos lleva a proponer un tamaño muestral n=10 animales por grupo, lo que supone un total de 40 ratas tipo Wistar de misma edad y peso. Finalmente, por la alta mortalidad asociada a la experimentación con este modelo animal se incluyeron 12 ratas por grupo.

#### **4.8 Análisis estadístico**

La variable respuesta principal es la pérdida ósea medida en milímetros (variable cuantitativa). Se calculó el valor de pérdida ósea media de cada medida en cada uno de sus puntos para comparar la pérdida ósea en cada uno de los 4 grupos.

La distribución de la muestra se comprobó mediante la obtención de diagramas de caja y de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk. Para el cálculo de diferencias intergrupo se empleo un test ANOVA con correcciones de Bonferroni.

Se realizó una comparación de pérdida ósea entre los grupos con y sin periodontitis para el que se empleo el test T-Student de muestras relacionadas.

Se considera que los valores de  $p < 0,05$  son estadísticamente significativos. Los resultados fueron analizados mediante el programa SPSS (versión 25, IBM ®).

## 5. Resultados

### 5.1 Descripción de la muestra

Se incluyeron 48 ratas tipo Wistar de la misma edad y peso. Al inicio del estudio dos ratas fallecieron (una perteneciente al grupo 1 y otra al grupo 4), otras dos de ellas pertenecientes al grupo 1 y al grupo 3 fallecieron tras la inducción anestésica. Otras dos ratas no se durmieron tras la inducción de periodontitis experimental (una de ellas perteneciente al grupo 1 y otra al grupo 2).

Del total de la muestra, once ratas (una de ellas perteneciente al grupo 1, dos pertenecientes al grupo 2, tres pertenecientes al grupo 3 y cinco pertenecientes al grupo 4) fueron perfundidas con la finalidad de realizar histología e inmunohistoquímica en el tejido cerebral.

Por lo tanto, para el análisis estadístico se incluyeron datos de 31 animales.

### 5.2 Inducción de periodontitis

Los resultados del análisis T-Student de comparación de pérdida ósea entre los grupos con y sin periodontitis presentados en la Tabla 1, arrojaron una tendencia mayor a la pérdida ósea en los grupos inducidos con periodontitis (grupos 1 y 2) pese a no existir diferencias estadísticamente significativas.

El punto que más pérdida ósea ha registrado es el correspondiente a la medida MED\_API\_M1\_1 en el grupo con periodontitis con 1,28mm de pérdida medida en la primera raíz del primer molar.

Los resultados de la estadística del test de ANOVA correspondiente a la pérdida ósea (variable respuesta principal) agrupados por cada uno de los 3 tipos de medición y grupo se presentan en la Tabla 2. Encontramos diferencias estadísticamente significativas a nivel de la medición en furca pero dicha diferencia no es apreciable tras la corrección con la Prueba de Bonferroni. A su vez se observa una tendencia a la pérdida ósea en la mayoría de las mediciones en el grupo con periodontitis y depresión inducidas (grupo 2). De manera similar, el grupo inducido por periodontitis (grupo 1) mostró un aumento de pérdida ósea en comparación con el grupo control (grupo 4).

Para la medida MED\_M (medición 1) la mayor discrepancia se encuentra entre el grupo 2 (periodontitis y depresión) con una media de 0,67mm de pérdida ósea y el grupo 4 (control) con 0,53mm de pérdida ósea.

En el caso de la medida MED\_PTO (medición 2) la mayor diferencia también se encuentra entre los grupos 2 y 4 con datos de pérdida ósea de 1,14mm frente 1,04mm respectivamente.

En la medida MED\_API (medición 3), la mayor diferencia se encuentra entre los grupos 2 (periodontitis y depresión) con 0,83mm de pérdida y el grupo 1( periodontitis) a los 0,74mm.

A modo de síntesis, se presentan los gráficos de caja correspondientes a las medias a nivel de las medidas 1, 2 y 3 (pérdida ósea en furca, a nivel interproximal y a nivel de la raíz) por grupo (figuras 8,9 y 10).

Tabla 1: Comparación de medias de los grupos con y sin periodontitis

<i>medición</i>	<b>CON / SIN PERIO</b>	<b>N</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESV. DESVIACION</b>	<b>Sig (bilateral)</b>
MED_F_M1	CON	15	0,76	0,21	0,193
	SIN	13	0,67	0,14	
MED_F_M2	CON	13	0,71	0,19	0,116
	SIN	12	0,59	0,17	
MED_F_M3_1	CON	16	0,54	0,15	0,150
	SIN	13	0,46	0,13	
MED_F_M3_2	CON	16	0,46	0,10	0,569
	SIN	13	0,48	0,09	
MED_F_PTO_1	CON	17	1,11	0,21	0,557
	SIN	14	1,07	0,17	
MED_F_PTO_2	CON	17	1,03	0,12	0,252
	SIN	14	1,11	0,25	
MED_API_M1_1	CON	17	1,28	0,13	0,866
	SIN	15	1,27	0,14	
MED_API_M1_2	CON	17	1,04	0,14	0,078
	SIN	15	1,12	0,12	

MED_API_M2_1	CON	17	0,81	0,15	0,751
	SIN	15	0,79	0,12	
MED_API_M2_2	CON	17	0,71	0,20	0,538
	SIN	15	0,67	0,11	
MED_API_M3_1	CON	17	0,50	0,14	0,823
	SIN	15	0,51	0,09	
MED_API_M3_2	CON	16	0,53	0,12	0,690
	SIN	15	0,55	0,09	
MED_API_M3_3	CON	16	0,61	0,09	0,305
	SIN	15	0,64	0,08	

Grupos CON periodontitis y SIN periodontitis. No se observan diferencias estadísticamente significativas (DES)

Tabla 2: Resultado de ANOVA comparación de medias por localización

<i>medición</i>	<b>GRUPO</b>	<b>N</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESV. DESVIACION</b>	<b>Sig (bilateral)</b>
<b>MED_M</b>	1	8	0,55	0,08	0,039*
	2	8	0,67	0,07	
	3	8	0,56	0,13	
	4	5	0,53	0,08	
	<b>total</b>	29	0,58	0,10	
<b>MED_PTO</b>	1	8	0,99	0,11	0,215
	2	9	1,14	0,15	
	3	8	1,13	0,23	
	4	6	1,04	0,14	
	<b>total</b>	31	1,08	0,17	
<b>MED_API</b>	1	8	0,74	0,10	0,410
	2	9	0,83	0,12	
	3	8	0,80	0,10	
	4	7	0,79	0,06	
	<b>total</b>	32	0,79	0,10	

MED\_M pérdida media a nivel de la furca (medida 1), MED\_PTO pérdida media a nivel interproximal (medida 2), MED\_API pérdida media a nivel de la raíz (medida 3). DES en la medida MED\_M 0,39\* no observadas en corrección de Bonferroni.

## 6. Discusión

El objetivo de este estudio fue analizar mediante un estudio preclínico *in vivo* los mecanismos de relación entre depresión y enfermedades periodontales. Concretamente en el trabajo que se presenta se realizaron fotografías de las hemi-mandíbulas post-mortem en las que se evaluó la pérdida ósea en cada uno de los cuatro grupos realizándose tres tipos de mediciones en cada uno de ellos.

En la comparación de grupos con y sin periodontitis, pese a no existir diferencias estadísticamente significativas observamos una tendencia mayor a la pérdida en los grupos que si presentan periodontitis. Esta pérdida es más acentuada a nivel de las furcas dónde encontramos 0,76mm de pérdida media en el grupo experimental frente 0,67mm en el grupo control a nivel del primer molar y 0,71mm de pérdida para el grupo periodontitis frente a 0,59mm en el grupo control.

En la comparación de los cuatro grupos de las 3 medidas, se observa una diferencia estadísticamente significativa en la medida 1 (a nivel de la furca). Sin embargo, no nos es inidentificable en la corrección de Bonferroni entre que grupos se encuentra debido a la disminución del tamaño muestral. Pese a no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se observa una tendencia creciente a la pérdida ósea en los grupos con periodontitis y depresión. Uno de los factores que podría influir en la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas puede estar relacionado con los pocos cambios detectables en dicho modelo animal. También es de interés destacar que para el cálculo del tamaño muestral no se tuvo en cuenta la variable de pérdida ósea, lo que podría haber disminuido la potencia estadística a la hora de encontrar diferencias.

Cabe destacar que, tanto en el análisis de comparación de dos grupos (con o sin periodontitis) como en el comparativo de los cuatro grupos, se observa una tendencia superior de pérdida ósea en aquellos animales a los que se les ha inducido la periodontitis. Esto nos conduce a pensar que hemos conseguido inducir la periodontitis en dichos animales. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que la patogenicidad y virulencia de las bacterias

empleadas puede no ser comparable a la patogenicidad y virulencia de las bacterias encontradas en la periodontitis de curso natural sin inducción.

Por lo tanto, nuestros resultados pese a no ser estadísticamente significativos conducen a pensar que existe una relación bidireccional en un modelo animal entre periodontitis y depresión en relación con pérdida ósea. Sin embargo, es necesario aumentar el espectro de evidencia para conseguir aclarar los mecanismos que unen las cadenas patogénicas de estas dos patologías inflamatorias.

Existe una asociación robusta, y presumiblemente causal, entre los eventos estresantes de la vida y los episodios depresivos mayores. Se cree que la neurobiología que subyace al estrés y la depresión es el resultado de anomalías moleculares y celulares que interactúan con factores genéticos y ambientales (Warren et al., 2014b).

Dentro de la heterogeneidad en la evidencia científica encontrada, nos es interesante resaltar 2 aspectos relevantes, en primer lugar, de que manera se ha llevado a cabo la inducción de la periodontitis y en segundo lugar que método de análisis se ha utilizado para la valoración de la pérdida ósea.

Tradicionalmente en este tipo de estudios descritos en la literatura se ha optado por el modelo de ligaduras. No obstante, en nuestro grupo de investigación ETEP anteriormente ya se había utilizado este modelo de inducción mediante lavados orales con *P. gingivalis* ATCC W83K1 y *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482 en un estudio para establecer comorbilidad entre obesidad y periodontitis. En este caso no se realizó análisis morfométrico de pérdida ósea, pero los resultados de los parámetros clínicos en cuanto a sondaje periodontal e índice gingival modificado aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en los grupos de periodontitis inducida en comparación con los controles (Virto et al., 2017). En nuestro caso, la realización de medidas morfométricas sin evaluar el componente infraóseo puede ser uno de los desencadenantes de no haber obtenido estas diferencias estadísticamente significativas. No obstante, la utilización del modelo de inducción mediante lavados elimina el posible trauma mecánico ocasionado por las ligaduras, asegurando la inducción por la patogenicidad de las bacterias y no por el trauma sufrido por el periodonto.

(Torbjorn Breivik et al., 2006) administraron tianeptina a una dosis diaria de 10 mg / kg durante 35 días en el grupo de tratamiento para ver el efecto de los antidepresivos en el desarrollo de periodontitis, también se administró una solución salina en el grupo control. Ambos grupos presentaban periodontitis inducida por ligadura el mismo día de la primera administración del fármaco. Treinta y cinco días después de la colocación de la ligadura, la pérdida ósea alveolar en el grupo de tratamiento se redujo significativamente en comparación con los controles. Esta pérdida fue analizada mediante radiografías en la que se medía la distancia del LAC al hueso, únicamente se realizó a nivel del segundo molar. Los animales en el grupo control sufrieron una pérdida ósea más pronunciada  $1,06\text{mm} \pm 0,25\text{ mm}$  frente  $0,90\text{mm} \pm 0,09\text{mm}$  en el grupo test. Cabe destacar que las diferencias significativas en este caso pueden deberse a la utilización del modelo de ligaduras pese a que las ligaduras estuvieron 62 días en boca frente a los 84 días de lavados realizados en nuestro estudio.

(Branco-de-Almeida et al., 2012) utilizaron el mismo modelo animal de ratas Wistar y administraron por sonda nasogástrica fluoxetina. En este caso se utilizó modelo de inducción de ligaduras. Tras 15 días, el grupo tratado con fluoxetina mostró niveles significativamente más bajos de pérdida ósea en comparación con el grupo control. La influencia de la fluoxetina en la pérdida ósea periodontal se evaluó histométricamente midiendo el área (milímetros cuadrados) de la reabsorción ósea en la región de la furca. Las muestras mandibulares del grupo de control (sin ligadura) también se midieron para comparar los resultados de ambos grupos de ligadura. El grupo experimental mostró menores niveles de pérdida ósea a nivel de la furca  $p < 0.05$ .

Estas observaciones coinciden con nuestros resultados, observándose una pérdida ósea más acentuada a nivel de las furca, lo que nos sugiere que la pérdida ósea a este nivel es más reproducible. Sin embargo, esta pérdida en el caso de Branco-de- Almeida podría justificarse por el trauma producido por la ligadura.

En cuanto a los estudios que han utilizado el mismo método de cuantificación de pérdida ósea (análisis morfométrico) encontramos tres estudios interesantes pese a no tratar de hallar la comorbilidad entre depresión y periodontitis.

(Maekawa et al., 2017 y Macri et al., 2014) encontraron DES utilizando nuestro mismo método de cuantificación de pérdida ósea. En el primer grupo realizaron un análisis de *DNA microarray* en ratones diabéticos con periodontitis inducida por ligadura durante 3-7 días, en el análisis morfométrico se calcularon las distancias totales desde el LAC a la cresta ósea de tres sitios. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los ratones experimentales y control

con respecto a la pérdida ósea a los 3 días si que presentaban diferencias a los 7 días posteriores a la ligadura ( $p < 0,05$ ). (Macri et al., 2014) comprobaron la plausibilidad entre una dieta rica en colesterol y periodontitis. Al igual que en nuestro caso se realizó un análisis morfométrico con muestras teñidas en azul de metileno para marcar el LAC y también se midieron las áreas de pérdida ósea. Sin embargo, utilizaron el modelo de inducción por ligadura. La pérdida ósea observada en el grupo control fue de 0,74mm (SD = 0,07), para el grupo control y ligaduras 1,36mm (SD = 0,10) mientras que para el grupo con dieta rica en colesterol y ligaduras 1,59mm (SD = 0,12). Todos los valores fueron estadísticamente significativos  $p < 0,0001$ . Estos resultados nos invitan a pensar que es posible detectar cambios estadísticamente significativos utilizando un análisis morfométrico en el modelo animal de ratas, pese a ello estos resultados pueden ser resultado del trauma sufrido en el periodonto aumentando la pérdida ósea.

(Cavagni et al., 2013) también utilizaron el mismo método de medición que en nuestro estudio para analizar si la obesidad aumentaba el riesgo de periodontitis. Por lo tanto, se trata de un método de medición ampliamente validado en la literatura. En este caso se realizaron 5 mediciones en cada superficie del segundo molar (vestibular y palatino). Los resultados arrojaron que la pérdida de hueso en el grupo control era de 0,344mm (0,313- 0,367) y 0,491mm(0,427- 0,506) para bucal y en el grupo de experimentación 0.308mm (0.289–0.354) y 0.549mm (0.482– 0.616) en vestibular y palatino respectivamente. Al igual que en nuestro caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0.11$ ).

(Li & Amar, 2007) utilizaron el análisis con Micro-tomografía computerizada (Micro CT) para estudiar lesiones periodontales, en dicho análisis se observó que la pérdida ósea en el grupo experimental era significativamente mayor. El análisis con micro- CT al ser una prueba más sensible permite detectar pequeños cambios que han podido pasar desapercibidos en nuestros resultados al no poderse cuantificar el componente intraóseo de los defectos.

Varios mecanismos fisiopatológicos pueden explicar la asociación del estrés crónico y la depresión con enfermedades sistémicas (Joëls & Baram, 2009; Miller, Maletic, & Raison, 2009; Shelton & Trivedi, 2011; Warren et al., 2014). Pese a ello aún no se ha establecido una plausibilidad biológica clara entre ambas patologías. Nuestros resultados nos conducen a pensar

que ambas patologías comparten comportamientos microbiológicos similares y la pérdida ósea es más acentuada cuando ambas se encuentran presentes.

Esta teoría está sustentada por un estudio publicado recientemente de Simoes (Simões et al., 2019) realizado en ratas Wistar donde se realiza inducción de lesiones periodontales con el objetivo de analizar las citoquinas pro-inflamatorias a nivel cerebral y se observó un comportamiento anhedónico y depresivo más acentuado en el grupo con lesiones (dichas conductas depresivas fueron similares a la ansiedad).

### **Limitaciones y fortalezas del estudio**

Este estudio preclínico “*in vivo*” fue llevado a cabo bajo un estricto control de calidad. Para ello, se utilizaron todas las herramientas posibles a fin de evitar sesgos. Se realizó el cálculo del tamaño muestral y aleatorización para asignación a los cuatro grupos comparativos. Las mediciones fueron realizadas por dos examinadores independientes (M.G y M.M).

El uso de un modelo murino permitió eliminar los factores de confusión que influyen en los ensayos de causalidad en humanos.

Los modelos animales siguen siendo una herramienta imprescindible en la investigación periodontal para establecer relaciones de causalidad, ya que permiten un análisis más preciso de las relaciones causa-efecto y un mejor control de los parámetros de estudio con respecto a los estudios en humanos (Graves, Kang, Andriankaja, Wada, & Rossa, 2012).

Las ratas tipo *Wistar* representan el modelo más utilizado en investigación periodontal, debido a las similitudes anatómicas y biológicas con el periodonto humano (Hajishengallis, Lamont, & Graves, 2015), a su vez, constituyen una solución valiosa y eficiente, dado que estos animales son muy manejables en laboratorio, son económicos y tienen una estructura anatómica de los molares similares a los humanos (Klausen, 1991). A su vez el modelo murino, logra reproducir fielmente la periodontitis ya sea con ligaduras o lavados (Graves et al., 2012) y por último nos permite abordar la inducción de la depresión que no sería aprobada por ningún comité ético para otros animales, como por ejemplo los perros.

En cuanto a las **limitaciones**, debemos hacer especial mención a la alimentación de los animales. Fueron alimentados con pienso estándar de mantenimiento de consistencia dura y eso podría suponer una menor acumulación de biofilm debido el arrastre de los depósitos con el alimento. Por lo tanto, no hemos sido capaces de crear una periodontitis severa.

Para el análisis de pérdida ósea, hubiese sido de mayor utilidad emplear un análisis con Micro CT ya que el análisis morfométrico no nos permite establecer los parámetros de pérdida ósea del componente infraóseo.

Por último, el tamaño del modelo animal a pesar de poseer características positivas como el manejo de los animales, presenta una gran desventaja a la hora de realizar las mediciones clínicas ya que su realización es complicada y poco reproducible.

### **Líneas futuras de investigación**

La valía de un determinado modelo animal reside en su capacidad de averiguar una hipótesis específica, más que a su fidelidad a los diferentes aspectos relacionados con la patogénesis de una enfermedad. Por lo tanto, la investigación preclínica "*in vivo*" todavía se considera indispensable para explorar los detalles moleculares más específicos que apoyen las asociaciones epidemiológicas entre la periodontitis y otras enfermedades sistémicas (Hajishengallis et al., 2015).

Los resultados de este estudio tendrían el potencial de ser trasladados a diseños de estudios de intervención con el fin de identificar tratamientos para actuar sobre los procesos claves de la progresión de la periodontitis y la depresión. Dichos estudios cobran especial relevancia dada la elevada prevalencia de ambas enfermedades.

Con cierta discreción se abre una vía de investigación sobre la repercusión que podría tener presentar niveles más altos de citoquinas proinflamatorias en el cerebro y sus cambios en el eje HPA. A su vez, los tratamientos con antidepresivos podrían ser una alternativa para tratar las comorbilidades asociadas a las lesiones periodontales.

## 7. Conclusiones

Este estudio preclínico "*in vivo*" sugiere evidencias sobre la relación de causalidad que existe entre la depresión inducida y la periodontitis experimental en un modelo animal. Por lo tanto, este diseño insinúa que los animales con periodontitis inducida presentan una mayor vulnerabilidad frente a la respuesta neuroinflamatoria y los cambios comportamentales producidos en un modelo experimental de depresión basado en la exposición a estrés.

El análisis de pérdida ósea del modelo preclínico parece demostrar una asociación entre la depresión con la periodontitis experimental; observándose mayor pérdida ósea en el grupo de animales con ambas patologías. Esto nos conduce a pensar que se ha producido la inducción de periodontitis experimental mediante lavados orales tras el análisis fotográfico calibrado.

Anexo I

Figura 9: Diagrama de caja representando la media de la variable pérdida ósea a nivel de la furca representada para los 4 grupos (medida 1)

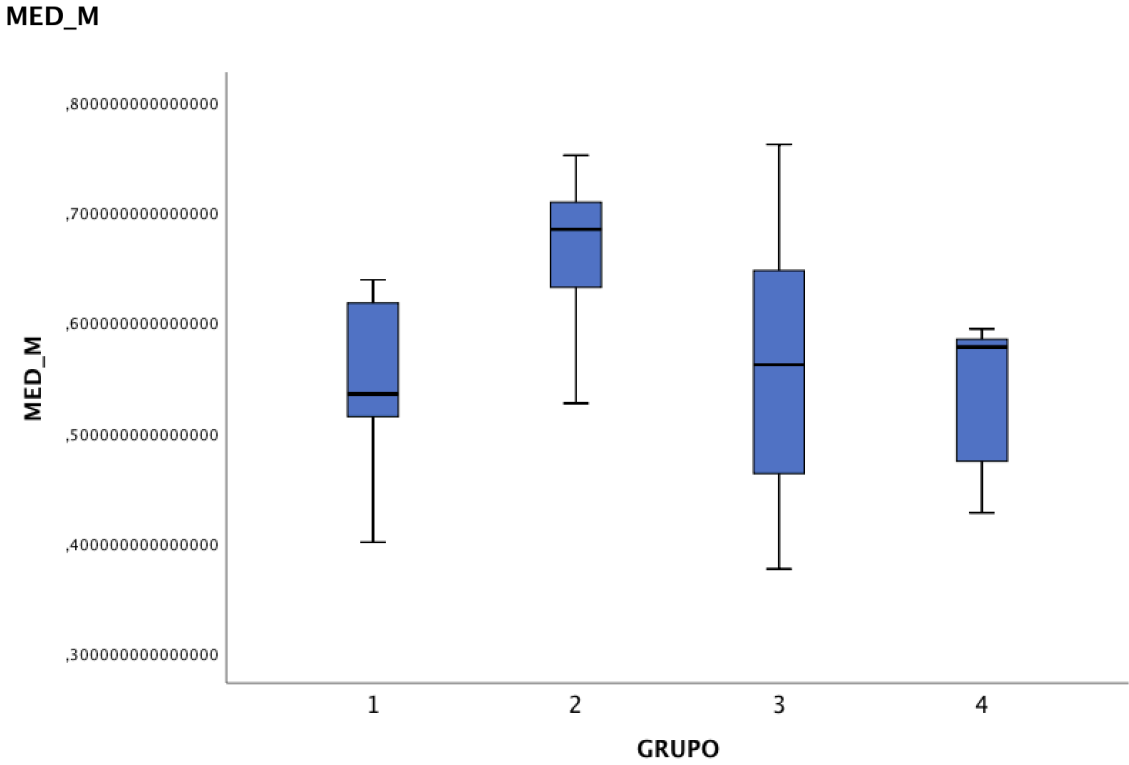


Figura 10: Diagrama de caja representando la media de la variable pérdida ósea a nivel interproximal representada para los 4 grupos (medida 2).

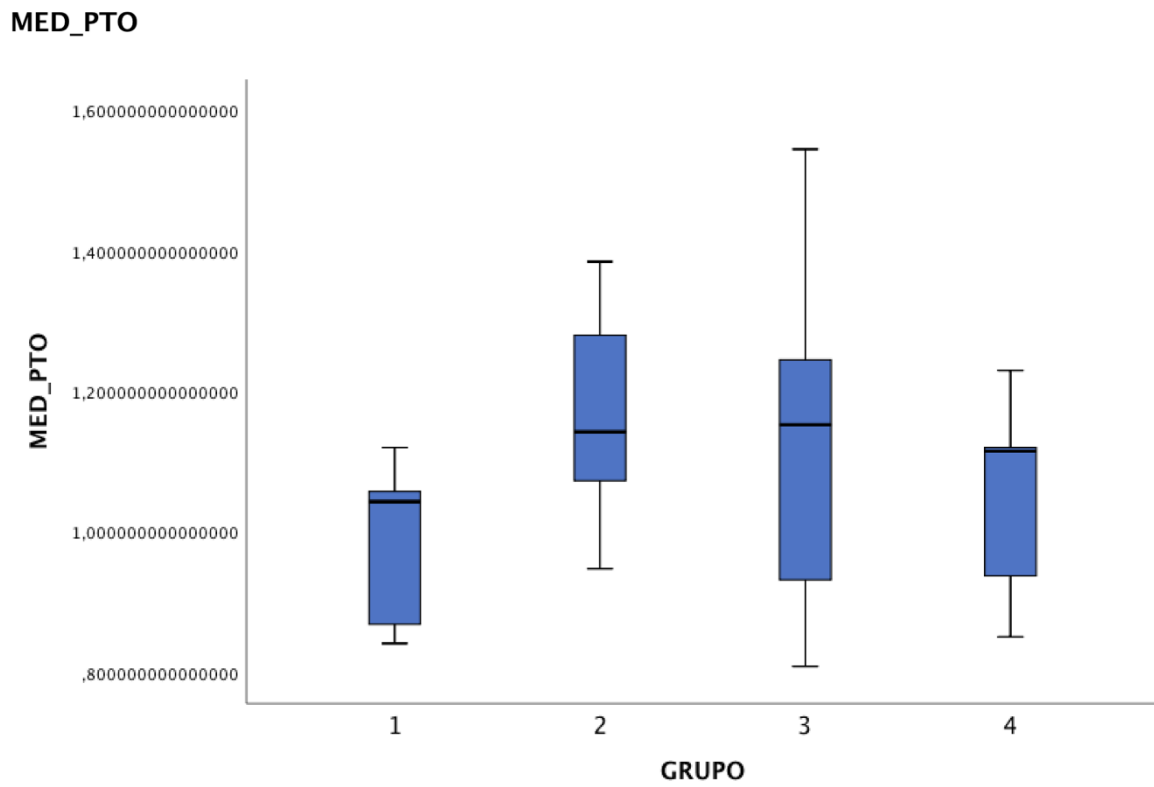
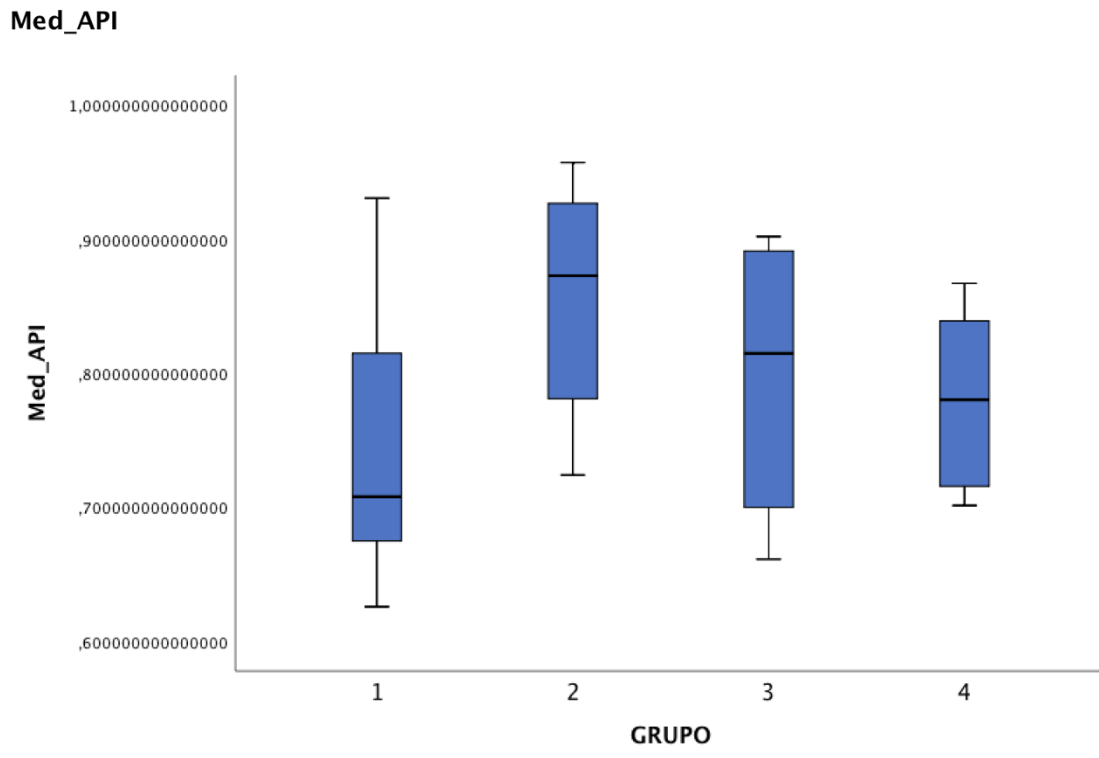


Figura 11: Diagrama de caja representando la media de la variable pérdida ósea a nivel de la raíz representada para los 4 grupos (medida 3)



## 9. Bibliografía

Aguiar, J. C. A., Gomes, E. P. P., Fonseca-Silva, T., Velloso, N. A., Vieira, L. T., Fernandes, M. F., ... Guimarães, A. L. S. (2013). Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *Journal of Periodontal Research*, *48*(5), 632-637.

<https://doi.org/10.1111/jre.12049>

Akhondzadeh, S., Jafari, S., Raisi, F., Nasehi, A. A., Ghoreishi, A., Salehi, B., ... Kamalipour, A. (2009). Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depression and Anxiety*, *26*(7), 607-611.

<https://doi.org/10.1002/da.20589>

Arauchi, R., Hashioka, S., Tsuchie, K., Miyaoka, T., Tsumori, T., Limoa, E., ... Horiguchi, J. (2018). Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. *Brain and Behavior*, *8*(8), e01028.

<https://doi.org/10.1002/brb3.1028>

Araújo, M. M., Martins, C. C., Costa, L. C. M., Cota, L. O. M., Faria, R. L. A. M., Cunha, F. A., & Costa, F. O. (2016). Association between depression and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, *43*(3), 216-228.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12510>

Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, *4*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>

Beck, I. R., Schmid, N. S., Berres, M., & Monsch, A. U. (2014). Establishing robust cognitive dimensions for characterization and differentiation of patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, frontotemporal dementia and depression: Establishing robust cognitive dimensions. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *29*(6), 624-634.

<https://doi.org/10.1002/gps.4045>

Bhatia, A., Sharma, R. K., Tewari, S., Khurana, H., & Narula, S. C. (2015). Effect of Fluoxetine on Periodontal Status in Patients With Depression: A Cross-Sectional Observational Study. *Journal of Periodontology*, *86*(8), 927-935. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140706>

Branco-de-Almeida, L. S., Franco, G. C., Castro, M. L., Dos Santos, J. G., Anbinder, A. L., Cortelli, S. C., ... Rosalen, P. L. (2012). Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology*, *83*(5), 664-671. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110370>

Breivik, T., Sluyter, F., Hof, M., & Cools, A. (2000). Differential susceptibility to periodontitis in genetically selected Wistar rat lines that differ in their behavioral and endocrinological response to stressors. *Behavior Genetics*, *30*(2), 123-130.

Breivik, T., Thrane, P. S., Gjermo, P., Opstad, P. K., Pabst, R., & von Hörsten, S. (2001). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *Journal of Periodontal Research*, *36*(5), 295-300.

Breivik, Torbjorn, Gundersen, Y., Myhrer, T., Fonnum, F., Osmundsen, H., Murison, R., ... Opstad, P. K. (2006). Enhanced susceptibility to periodontitis in an animal model of depression: reversed by chronic treatment with the anti-depressant tianeptine. *Journal of Clinical Periodontology*, *33*(7), 469-477. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00935.x>

Calvo, J. C. L. (2012). Encuesta de Salud Oral en España 2010. *RCOE: Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, *17*(1 (Enero)), 13-41.

Carasol, M., Llodra, J. C., Fernández-Meseguer, A., Bravo, M., García-Margallo, M. T., Calvo-Bonacho, E., ... Herrera, D. (2016). Periodontal conditions among employed adults in Spain. *Journal of Clinical Periodontology*, *43*(7), 548-556. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12558>

Cavagni, J., Wagner, T. P., Gaio, E. J., Rêgo, R. O. C. C., Torres, I. L. da S., & Rösing, C. K. (2013). Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. *Archives of Oral Biology*, *58*(8), 1034-1039. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.03.006>

Chapple, I. L. C., Genco, R., & Working group 2 of joint EFP/AAP workshop. (2013). Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, *40 Suppl 14*, S106-112.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12077>

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, *45 Suppl 20*, S68-S77. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12940>

Cirano, F. R., Casarin, R. C. V., Ribeiro, F. V., Casati, M. Z., Pimentel, S. P., Taiete, T., & Bernardi, M. M. (2016). Effect of Resveratrol on periodontal pathogens during experimental periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research*, *30*(1), e128. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0128>

Consensus Report Periodontal Diseases: Epidemiology and Diagnosis. (1996). *Annals of Periodontology*, *1*(1), 216-222. <https://doi.org/10.1902/annals.1996.1.1.216>

Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(1), 46-56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>

Delgado-Angulo, E. K., Sabbah, W., Suominen, A. L., Vehkalahti, M. M., Knuuttila, M., Partonen, T., ... Tsakos, G. (2015). The association of depression and anxiety with dental caries and periodontal disease among Finnish adults. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *43*(6), 540-549. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12179>

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*, *67*(5), 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>

Dumitrescu, A. L. (2016). Depression and Inflammatory Periodontal Disease Considerations—An Interdisciplinary Approach. *Frontiers in Psychology, 7*.  
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00347>

Elter, J. R., Beck, J. D., Slade, G. D., & Offenbacher, S. (1999). Etiologic models for incident periodontal attachment loss in older adults. *Journal of Clinical Periodontology, 26*(2), 113-123.

Esteves Lima, R. P., Miranda Cota, L. O., & Costa, F. O. (2013). Association between periodontitis and gestational diabetes mellitus: a case-control study. *Journal of Periodontology, 84*(9), 1257-1265. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120350>

França, L. F. C., Vasconcelos, A. C. C. G., da Silva, F. R. P., Alves, E. H. P., Carvalho, J. S., Lenardo, D. D., ... Vasconcelos, D. F. P. (2017). Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *Journal of Clinical Periodontology, 44*(6), 568-576.  
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12729>

Gárate, I., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J. L. M., Caso, J. R., Alou, L., Gomez-Lus, M. L., ... Leza, J. C. (2013). Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biological Psychiatry, 73*(1), 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.07.005>

Genco, R. J., Ho, A. W., Grossi, S. G., Dunford, R. G., & Tedesco, L. A. (1999). Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *Journal of Periodontology, 70*(7), 711-723. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.1.100>

Genco, R. J., Ho, A. W., Kopman, J., Grossi, S. G., Dunford, R. G., & Tedesco, L. A. (1998). Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Annals of Periodontology, 3*(1), 288-302.  
<https://doi.org/10.1902/annals.1998.3.1.288>

Godbout, J. P., Moreau, M., Lestage, J., Chen, J., Sparkman, N. L., O'Connor, J., ... Johnson, R. W. (2008). Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the*

*American College of Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2341-2351.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301649>

Graves, D. T., Kang, J., Andriankaja, O., Wada, K., & Rossa, C. (2012). Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Frontiers of Oral Biology*, 15, 117-132.

<https://doi.org/10.1159/000329675>

Hajishengallis, G. (2011). Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Oral Biosciences*, 53(3), 233-240. <https://doi.org/10.2330/joralbiosci.53.233>

Hajishengallis, G., Lamont, R. J., & Graves, D. T. (2015). The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*, 6(3), 229-235.

<https://doi.org/10.4161/21505594.2014.990806>

Hashioka, S., Klegeris, A., Monji, A., Kato, T., Sawada, M., McGeer, P. L., & Kanba, S. (2007). Antidepressants inhibit interferon- $\gamma$ -induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. *Experimental Neurology*, 206(1), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.03.022>

Hashioka, S., McGeer, P. L., Monji, A., & Kanba, S. (2009). Anti-inflammatory effects of antidepressants: possibilities for preventives against Alzheimer's disease. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 9(1), 12-19.

Hosadurga, R., Rao, S., Jose, J., Rompicharla, N., Shakil, M., & Shashidhara, R. (2014). Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis.

*Pharmacognosy Research*, 6(4), 326. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.138287>

Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. *Psychosomatic Medicine*, 71(2), 171.

<https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>

Hoyo-Becerra, C., Liu, Z., Yao, J., Kaltwasser, B., Gerken, G., Hermann, D. M., & Schlaak, J. F. (2015). Rapid Regulation of Depression-Associated Genes in a New Mouse Model Mimicking

Interferon- $\alpha$ -Related Depression in Hepatitis C Virus Infection. *Molecular Neurobiology*, 52(1), 318-329. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8861-z>

Hsu, C.-C., Hsu, Y.-C., Chen, H.-J., Lin, C.-C., Chang, K.-H., Lee, C.-Y., ... Kao, C.-H. (2015). Association of Periodontitis and Subsequent Depression: A Nationwide Population-Based Study. *Medicine*, 94(51), e2347. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002347>

Ide, M., Harris, M., Stevens, A., Sussams, R., Hopkins, V., Culliford, D., ... Holmes, C. (2016). Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PloS One*, 11(3), e0151081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151081>

Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 459-466. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>

Johannsen, A., Rydmark, I., Söder, B., & Åsberg, M. (2007). Gingival inflammation, increased periodontal pocket depth and elevated interleukin-6 in gingival crevicular fluid of depressed women on long-term sick leave. *Journal of Periodontal Research*, 42(6), 546-552. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00980.x>

Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L., & Marcenes, W. (2014). Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Dental Research*, 93(7 Suppl), 20S-28S. <https://doi.org/10.1177/0022034514537828>

Katz, R. J., & Baldrighi, G. (1982). A further parametric study of imipramine in an animal model of depression. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 16(6), 969-972.

Katz, R. J., & Hersh, S. (1981). Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5(2), 265-271.

Kessler, R. C., & Bromet, E. J. (2013). The Epidemiology of Depression Across Cultures. *Annual Review of Public Health*, 34(1), 119-138. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114409>.

Kırzioğlu, F. Y., Tözüm Bulut, M., Doğan, B., Fentoğlu, Ö., Özmen, Ö., Çarsancaklı, S. A., ... Orhan, H. (2017). Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Oral Science*, *59*(2), 247-255. <https://doi.org/10.2334/josnusd.16-0398>.

Klages, U., Weber, A. G., & Wehrbein, H. (2005). Approximal plaque and gingival sulcus bleeding in routine dental care patients: relations to life stress, somatization and depression. *Journal of Clinical Periodontology*, *32*(6), 575-582. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00716.x>.

Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *Journal of Periodontology*, *62*(1), 59-73. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.1.59>.

Kuraji, R., Fujita, M., Ito, H., Hashimoto, S., & Numabe, Y. (2018). Effects of experimental periodontitis on the metabolic system in rats with diet-induced obesity (DIO): an analysis of serum biochemical parameters. *Odontology*, *106*(2), 162-170. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0322-5>.

Layé, S., Parnet, P., Goujon, E., & Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *27*(1), 157-162.

LeResche, L., & Dworkin, S. F. (2002). The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontology 2000*, *30*, 91-103.

Leza, J. C., García-Bueno, B., Bioque, M., Arango, C., Parellada, M., Do, K., ... Bernardo, M. (2015). Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *55*, 612-626. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.05.014>.

Li, C. H., & Amar, S. (2007). Morphometric, Histomorphometric, and Microcomputed Tomographic Analysis of Periodontal Inflammatory Lesions in a Murine Model. *Journal of Periodontology*, *78*(6), 1120-1128. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060320>.

Liu, R., Li, N., Liu, N., Zhou, X., Dong, Z., Wen, X., & Liu, L. (2012). Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 18(3), BR95-102.

Macri, E., Lifshitz, F., Ramos, C., Orzuza, R., Costa, O., Zago, V., ... Friedman, S. (2014). Atherogenic cholesterol-rich diet and periodontal disease. *Archives of Oral Biology*, 59(7), 679-686. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.03.006>.

Maes, M., Kubera, M., Leunis, J.-C., & Berk, M. (2012). Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *Journal of Affective Disorders*, 141(1), 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.02.023>.

Maekawa, S., Katagiri, S., Takeuchi, Y., Komazaki, R., Ohtsu, A., Udagawa, S., & Izumi, Y. (2017). Bone metabolic microarray analysis of ligature-induced periodontitis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Periodontal Research*, 52(2), 233-245.

Marcenes, W., Muirhead, V. E., Murray, S., Redshaw, P., Bennett, U., & Wright, D. (2013). Ethnic disparities in the oral health of three- to four-year-old children in East London. *British Dental Journal*, 215(2), E4. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.68>.

Marcenes, W. S., & Sheiham, A. (1992). The relationship between work stress and oral health status. *Social Science & Medicine* (1982), 35(12), 1511-1520.

Martín-Hernández, D., Caso, J. R., Bris, Á. G., Maus, S. R., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., ... Leza, J. C. (2016). Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology*, 103, 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.003>.

Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biological Psychiatry*, *65*(9), 732-741. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>

Moss, M. E., Beck, J. D., Kaplan, B. H., Offenbacher, S., Weintraub, J. A., Koch, G. G., ... Tedesco, L. A. (1996). Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, *67*(10 Suppl), 1060-1069. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.10s.1060>.

Offenbacher, S. (1996). Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Annals of Periodontology*, *1*(1), 821-878. <https://doi.org/10.1902/annals.1996.1.1.821>.

Oliveira, L. F. F., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Furlaneto, F. A. C., Figueiredo, L., Casarin, R., ... Messori, M. R. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology*, *88*(2), 197-208. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160217>.

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, *89*(S1), S173-S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>.

Perry, V. H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, *18*(5), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.01.004>.

Persson, G. R., Persson, R. E., MacEntee, C. I., Wyatt, C. C. I. I., Hollender, L. G., & Kiyak, H. A. (2003). Periodontitis and perceived risk for periodontitis in elders with evidence of depression. *Journal of Clinical Periodontology*, *30*(8), 691-696.

Peruzzo, D. C., Benatti, B. B., Ambrosano, G. M. B., Nogueira-Filho, G. R., Sallum, E. A., Casati, M. Z., & Nociti, F. H. (2007). A systematic review of stress and psychological factors as possible risk

factors for periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 78(8), 1491-1504.

<https://doi.org/10.1902/jop.2007.060371>.

Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A., & Crean, S. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 36(4), 665-677. <https://doi.org/10.3233/JAD-121918>

Rai, B., Kaur, J., Anand, S. C., & Jacobs, R. (2011). Salivary stress markers, stress, and periodontitis: a pilot study. *Journal of Periodontology*, 82(2), 287-292.

<https://doi.org/10.1902/jop.2010.100319>

Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, 27(1), 24-31.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2005.11.006>

Rosania, A. E., Low, K. G., McCormick, C. M., & Rosania, D. A. (2009). Stress, depression, cortisol, and periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 80(2), 260-266.

<https://doi.org/10.1902/jop.2009.080334>

Saletu, A., Pirker-Frühauf, H., Saletu, F., Linzmayer, L., Anderer, P., & MATEJKA, M. (2005). Controlled clinical and psychometric studies on the relation between periodontitis and depressive mood. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(12), 1219-1225.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00855.x>

Santos, B. F. E., Souza, E. Q. M., Brigagão, M. R. P. L., Lima, D. C. de, & Fernandes, L. A. (2017). Local application of statins in the treatment of experimental periodontal disease in rats. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 25(2), 168-176. <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0149>

Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., DelleMijn-Kippuw, N., Simón, R., & Winkel, E. (2000). Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis

populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences*, 108(5), 383-392.

Sanz, M., Ceriello, A., Buysschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., ... Vegh, D. (2018). Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(2), 138-149. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12808>

Sanz M., Kornman, K., & Working group 3 of joint EFP/AAP workshop. (2013). Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40 Suppl 14, S164-169. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12083>

Schweizer, M. C., Henniger, M. S. H., & Sillaber, I. (2009). Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, «anomalous anxiolysis» and activity. *PloS One*, 4(1), e4326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004326>

Shelton, R. C., & Trivedi, M. H. (2011). Moderators of antidepressant response in major depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 72(10), e32. <https://doi.org/10.4088/JCP.10027tx3cc>

Simões, L. R., Netto, S., Generoso, J. S., Ceretta, R. A., Valim, R. F., Dominguni, D., ... Barichello, T. (2019). Imipramine treatment reverses depressive- and anxiety-like behaviors, normalize adrenocorticotrophic hormone, and reduces interleukin-1 $\beta$  in the brain of rats subjected to experimental periapical lesion. *Pharmacological Reports*, 71(1), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.08.003>

Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., ... Bogerts, B. (2008). Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *Journal of Psychiatric Research*, 42(2), 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.10.013>

Swerts, A. A., Santos, B. F. E., Bruzadelli, S. R., BrigagãO, M. R. P. L., Lima, D. C. de, & Fernandes, L. A. (2017). Treatment of experimental periodontal disease by laser therapy in simvastatin-modified rats. *Journal of Applied Oral Science*, 25(4), 387-395. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0467>

Takada, T., Yoshinari, N., Sugiishi, S., Kawase, H., Yamane, T., & Noguchi, T. (2004). Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 75(2), 306-315. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.2.306>

Tang, Y., & Cao, F. (2011). [Investigation and analysis of depression occurrence in patients with chronic periodontitis]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue = Shanghai Journal of Stomatology*, 20(1), 74-77.

Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E., & working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology*, 84(4 Suppl), S24-29. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340019>

Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200(4), 525-540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>

Virto, L., Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, P., González, J., Esquifino, A. I., & Sanz, M. (2017). Obesity and Periodontitis. An Experimental Study to Evaluate the Periodontal and Systemic Effects of the Co-Morbidity. *Journal of Periodontology*, 1-15. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170355>

Wada-Mihara, C., Seto, H., Ohba, H., Tokunaga, K., Kido, J.-I., Nagata, T., & Naruishi, K. (2018). Local administration of calcitonin inhibits alveolar bone loss in an experimental periodontitis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 97, 765-770. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.165>

Warren, K. R., Postolache, T. T., Groer, M. E., Pinjari, O., Kelly, D. L., & Reynolds, M. A. (2014a). Role of chronic stress and depression in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, *64*(1), 127-138. <https://doi.org/10.1111/prd.12036>

Wiborg, O. (2013). Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell and Tissue Research*, *354*(1), 155-169. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1664-0>

Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, *134*(4), 319-329.

Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). An animal model of anhedonia. *Clinical Neuropharmacology*, *15 Suppl 1 Pt A*, 550A-551A.

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, *93*(3), 358-364.

Willner, Paul. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, *52*(2), 90-110. <https://doi.org/10.1159/000087097>