



MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

CENTRO: Facultad de Odontología

ESTUDIANTE DE MÁSTER: Eber Asbel Cuba Mamani

TUTOR/ES DEL TFM: Elena Figuro Ruiz

TÍTULO DEL TFM: Análisis de mediadores inflamatorios en plasma y encía de ratas con periodontitis y depresión.

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA: 28 Septiembre 2020

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse):

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del

tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

10. Periodo de Vigencia

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre



ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Eber Asbel Cuba Mamani

estudiante de Máster en la Facultad de
Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el
curso 2020 - 2021 , como autor del trabajo de fin de máster titulado

Análisis de mediadores inflamatorios en plasma y encía de ratas con periodontitis y
depresión.

y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo tutor es:

Elena Figuero Ruiz

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Asimismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 02_de septiembre_de 2021

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	Elena Figuero Ruiz
---------------------	--------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos	Eber Asbel Cuba Mamani
--------------------	------------------------

encuadrado en la línea de investigación

Etiología y terapéutica de enfermedades periodontales y periimplantarias. E.T.E.P.
--

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Análisis de mediadores inflamatorios en plasma y encía de ratas con periodontitis y depresión.
--

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En _____ Madrid _____, a _____ 02 _____ de _____ Septiembre _____ de 2021

Fdo: el profesor/a

--

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Odontología

Departamento de Especialidades Clínicas Odontológicas



Trabajo Fin de Máster en Ciencias Odontológicas 2020-2021

**Análisis de mediadores inflamatorios en plasma y encía de ratas
con periodontitis y depresión.**

Eber Asbel Cuba Mamani

Tutora: Prof. Doctora Elena Figuero Ruiz

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Periodontitis.....	5
1.1.1. Definición	5
1.1.2. Prevalencia	6
1.1.3. Etiopatogenia.....	7
1.2. Depresión.....	9
1.3. Periodontitis y depresión.....	10
1.4. Modelos de inducción de periodontitis y depresión en ratas	15
1.5. Justificación.....	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo general:.....	17
2.2. Objetivos específicos:	17
3. HIPÓTESIS	18
3.1. Hipótesis General:	18
3.2. Hipótesis específicas:.....	18
4. MATERIAL Y METODOS.....	19
4.1. Diseño de estudio.....	19
4.2. Modelos de enfermedades.....	19
4.2.1. Modelo de periodontitis:	19
4.2.2. Modelo de depresión.....	20
4.3 Toma de muestras post-mortem	20
4.4. Análisis de muestras.....	21
4.4.1. Cuantificación de los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, E-selectina, sICAM en muestras de plasma y encía.	22
4.4.2. Cuantificación de los mediadores inflamatorios CRP, P-Selectina en muestras de plasma. .	23
4.5. Cálculo del tamaño muestral	23
4.5.1. Aleatorización.....	24
4.5.2. Ocultación de la asignación.....	24
4.5.3. Enmascaramiento.....	24
4.6. Variables de estudio	24
4.7. Análisis estadístico	24
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Descripción de la muestra.....	26
5.2. Mediadores inflamatorios en encía.....	26

5.3. Mediadores inflamatorios en plasma.....	28
6. DISCUSION	30
6.1. Fortalezas y limitaciones del estudio.....	32
7. CONCLUSIONES.....	34
8. ANEXOS.....	35
9. BIBLIOGRAFIA.....	38

Agradecimientos

Deseo agradecer a mi tutora, Prof. Dra. Elena Figuro, por aceptarme para la tutorización y ejecución del presente proyecto, por ser una referente de motivación y dedicación en el campo de la investigación; ya que con sus enseñanzas en el desarrollo del presente Trabajo de Fin de Máster me alienta a seguir adelante.

A María y a Leire, por su constante ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Alejandra, por darme tranquilidad y fortaleza para seguir avanzando.

A Vianney, mi hermana, por su apoyo nuevamente en esta aventura académica.

A todos, muchas gracias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Periodontitis

1.1.1. Definición

La periodontitis es una infección crónica multibacteriana oral, de etiología multifactorial y uno de los trastornos inflamatorios más comunes en adultos (Hashioka et al., 2018) causada por la infección del *biofilm* oral en el área subgingival, que conduce a un desequilibrio en el sistema de defensa del huésped. Sin embargo, la sola presencia de bacterias en estas áreas no es capaz de inducir una destrucción tisular extensa en todos los individuos. Esto sugiere que se produce una respuesta individual adaptativa a algunas cargas bacterianas en el *biofilm* sin progresión de la enfermedad (Muniz et al., 2018).

Sus principales características incluyen la pérdida de soporte del tejido periodontal, que se manifiesta a través de pérdida de inserción clínica, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival y; radiográficamente se evalúa la pérdida ósea (Papapanou et al., 2018a).

En el Consenso de 2017 entre la Academia Americana de Periodoncia y la Federación Europea de Periodoncia, se propuso una nueva clasificación de enfermedades y condiciones periodontales que, además de la etiopatogenia de la Periodontitis, incluyen enfermedades sistémicas y afecciones que afectan el periodonto de sostén (Caton et al., 2018). Se reconoce que existen trastornos sistémicos, como el Estrés emocional y Depresión (International Classification of Diseases 10, Code: F39.9), tales condiciones son agrupadas dentro del Grupo de "Enfermedades y condiciones sistémicas que afectan el tejido periodontal" y están sub agrupadas como "Otros trastornos sistémicos que pueden influir en la patogenia de enfermedades periodontales" (Jepsen et al., 2018).

La periodontitis se clasifica actualmente según la gravedad y complejidad, la progresión y extensión y distribución:

- Según la gravedad y complejidad: se clasifica en estadio I, estadio II, estadio III, estadio IV. El estadio describe la gravedad de la enfermedad en su presentación inicial y la complejidad prevista del manejo de la enfermedad. La gravedad se basa en parámetros como la pérdida de inserción clínica interproximal, pérdida ósea radiográfica y pérdida dentaria; mientras que, la complejidad se basa en parámetros como la profundidad de sondaje, pérdida ósea, afectación de furca, trauma oclusal secundario, colapso de mordida, abanicamiento dental.

- Según la progresión: se clasifica en grado A, grado B, grado C. El grado describe la velocidad y el riesgo de progresión, las probabilidades de obtener un mal resultado tras el tratamiento y su impacto sobre la salud general
- Según la extensión y distribución: en cada estadio, se describe extensión como localizada (menos del 30 % de dientes implicados), generalizada (mayor al 30% de dientes implicados), o patrón molar/incisivo (Papapanou et al., 2018a).

1.1.2. Prevalencia

La periodontitis es un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia, así como porque puede provocar la pérdida de dientes y la discapacidad, afectar negativamente la función de masticación y la estética, ser una fuente de desigualdad social y menoscabo de la calidad de vida. La periodontitis explica una proporción sustancial de edentulismo y disfunción masticatoria, resulta en importantes costos de atención dental y tiene un posible resultado negativo impacto en la salud general (Papapanou et al., 2018b).

En 2009-2010, la prevalencia total de periodontitis en adultos de 30 años o más fue del 47,2% en los Estados Unidos (Caton et al., 2018). La Organización Mundial de la Salud informó que entre el 10% y el 15% de la población mundial padece periodontitis. Cabe señalar que la periodontitis severa es la sexta condición más frecuente a nivel mundial, afectando a más del 10,8% de la población global. Su prevalencia es mayor en la tercera y cuarta décadas de la vida (Kassebaum et al., 2014).

Se calcula que el 50% de la población adulta europea presenta alguna forma de las enfermedades periodontales y que entre el 10-15% tienen periodontitis severa. Con respecto a la información sobre salud periodontal; los países de España, Suecia, y Suiza se clasificaron como los más saludables entre los países europeos en contraste con Alemania, donde se informó un aumento de la pérdida de dientes y la mayor prevalencia de pérdida de inserción clínica mayor a 4 mm (Holtfreter et al., 2010).

A nivel nacional, es importante mencionar además que entre el 85-94% de la población española mayor de 35 años presenta alguna de las patologías de enfermedades periodontales y entre el 16-30% de los españoles mayores de 35 años tiene periodontitis (Carasol et al., 2016), notando una

elevada prevalencia con periodontitis de moderada a avanzada en más del 50% incluso. (Martínez et al., 2021).

1.1.3. Etiopatogenia

La etiología de la periodontitis se distingue claramente por la presencia de bacterias capaces de producir esta enfermedad, estas bacterias se organizan en *biofilms* supra y subgingivales, conllevando a una reacción inflamatoria que provoca una respuesta en el sistema inmune (Caton et al., 2018). Es bien sabido que la cavidad oral conlleva la colección de una alta cantidad de bacterias que son tan abundantes como en el tracto gastrointestinal (Verma et al., 2018). Se detectaron más de 700 especies en la microbiota subgingival, dentro de las cuales cabe señalar a *Porphyromonas gingivalis* como una de las más patógenas (Taylor et al., 2015).

El modelo general de la etiopatogenia de la periodontitis consiste en un ataque microbiológico induciendo una respuesta inmune en el huésped, liberando éste una serie de mediadores inflamatorios, las que indirectamente provocan una remodelación del tejido óseo y del metabolismo del tejido conectivo, generando los signos y síntomas de la periodontitis; siendo importante mencionar que este proceso puede estar afectado por factores ambientales o factores genéticos (Kornman, 2008).

Este ataque microbiológico, en la actualidad; se conoce como disbiosis, que es un desequilibrio producido entre las comunidades microbianas asociadas con la salud y el sistema inmune del huésped, provocando la ruptura de la relación beneficiosa entre las bacterias y el hospedador, afectando negativamente a la salud periodontal pudiendo ser la causa o consecuencia de la enfermedad (Mariano Sanz & Kornman, 2013), habiendo una serie de factores que influirían ese cambio:

- Alteraciones de la respuesta inmune efectiva por parte del paciente, como por ejemplo la función alterada o el número reducido de neutrófilos.
- Aparición de la actividad de especies bacterianas clave como la *P. gingivalis*, capaces de manipular la estructura de toda la población bacteriana (M Sanz et al., 2017).

Los mecanismos que ocurren después de la degradación de la homeostasis huésped-microbiota periodontal, pueden precipitar en una disbiosis y periodontitis en huéspedes susceptibles. Se cree que las comunidades microbianas disbióticas de patógenos clave, llamados también *keystone pathogens*, (especie microbiana clave que remodela una comunidad microbiana de manera que

promueve la patogenia de la enfermedad) y patobiontes (microorganismo normalmente inofensivo que puede volverse patógeno en determinadas condiciones ambientales) exhiben una virulencia sinérgica por la que no sólo pueden soportar la respuesta del huésped, sino que también pueden prosperar explotando la inflamación que destruye los tejidos, que alimenta un ciclo de autoalimentación de disbiosis creciente y pérdida ósea inflamatoria, potencialmente que conduce a la pérdida de dientes y complicaciones sistémicas. Estos *keystone pathogens*, provocan una interferencia inmunológica, estableciendo posteriormente una disbiosis. Varios de estos patógenos, incluyendo las bacterias del complejo rojo, poseen la habilidad de evadir las defensas del huésped, de tal manera que son capaces de adquirir fuentes de energía de él (Hajishengallis, 2014).

Se agrupa al conjunto bacteriano oral en cinco grupos o clusters dentro de los cuales los que guardan más relación e importancia con la etiopatogenia de la periodontitis son el rojo con una asociación fuerte (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *P. gingivalis*, *Treponema denticola*) y el naranja con una asociación moderada (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*, *Peptoestreptococcus micros*, *Campylobacter rectus* y *showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*) (Socransky, 1998).

Las variaciones inmunológicas confluyen en la aparición de enfermedades periodontales, activando algunas especies bacterianas importantes como *P. gingivalis* que es capaz de manipular toda la población bacteriana incluidas en la economía ecológica del individuo huésped (Mariano Sanz et al., 2019).

A nivel inmunológico, puede ocurrir una respuesta inmune innata y/o adaptativa, ante ello se segrega una importante cantidad de mediadores inflamatorios como citoquinas (interleuquinas como IL-1, IL-6, IL-8; factor de necrosis tumoral TNF- α), prostaglandinas (PGE₂), metaloproteinasas (MMP) responsables de la destrucción del tejido óseo y conectivo (Sanz et al., 2017); añadido en gran medida por factores de riesgo genéticos y adquiridos, dando como un resultado global un hecho multifactorial para el desencadenamiento de esta patología periodontal (Kornman, 2004), que finalmente puede llevar a la pérdida irreversible de piezas dentarias (Hashioka et al., 2018).

Estos mediadores inflamatorios son liberados en el fluido crevicular, conteniendo un trasudado inflamatorio que se expulsa a través del surco gingival o la bolsa periodontal (si nos encontramos en un cuadro patológico) como consecuencia de la respuesta inmune que está ocurriendo. El infiltrado inflamatorio donde se está desarrollando la periodontitis es a nivel del tejido conectivo, mientras que las bacterias y su contenido LPS están depositados sobre la superficie del esmalte o radicular, induciendo la aparición de una respuesta inmune a nivel del tejido conectivo. (Buduneli & Kinane, 2011)

1.2. Depresión

La depresión, *chronic mild stress* (CMS) por sus siglas en inglés, es un síndrome multifactorial determinado por procesos biológicos, sociales o psicológicos. La presentación clínica puede incluir tristeza, fatiga, cambio de peso, alteraciones del sueño y deterioro ocupacional. Lamentablemente todos estos signos vienen acompañados con la dificultad de adaptación de la persona al ambiente sociocultural que lo rodea, lo cual genera decaimiento subjetivo (Huang et al., 2020).

Según la OMS, en el año de 2017, se proyectó que alrededor de 350 millones de personas a nivel mundial padecen de esta patología. En España, la depresión es la enfermedad mental más prevalente (Haro et al., 2006). Según la última encuesta nacional de salud llevada a cabo en nuestro país en el año 2017, un 6.68% de la población española habría recibido un diagnóstico de depresión por un médico en los últimos 12 meses y casi 3 millones de personas tienen un diagnóstico de depresión, lo que la convierte en la enfermedad mental más prevalente en nuestro país, siendo más prevalente en mujeres y en personas de edad avanzada (Instituto Nacional de Estadística, 2017a).

En condiciones fisiológicas, el sistema inmunitario central y periférico conservan la homeostasis entre las señales proinflamatorias y las anti-inflamatorias que envían las citocinas. Estas señales sirven para que ambos sistemas inmunitarios, central y periférico, puedan comunicarse y desencadenar la respuesta inmune en el organismo ante la amenaza de un patógeno (Young et al., 2014). La etiología de la depresión sugiere que existe una desregulación de estas señales que provoca cambios en el estado de ánimo a través de la síntesis y regulación de neurotransmisores en el Sistema Nervioso. Los biomarcadores como la Proteína C Reactiva (PCR) y las citoquinas

pro inflamatorias son biomarcadores para la depresión, elevando su concentración en sangre ante un proceso inflamatorio agudo en comparación con sujetos sin depresión (Lopresti et al., 2014).

La teoría de la depresión más aceptada, es la hipótesis de la monoamina, en la que suelen basarse los antidepresivos; explica la depresión como un cambio en la actividad de los neurotransmisores monoamínicos, en particular la serotonina y la noradrenalina. Desafortunadamente, algunos pacientes no responden al tratamiento con medicamentos convencionales y algunos autores especulan que los biomarcadores inflamatorios más altos también pueden contribuir a la resistencia al tratamiento. Además, la inflamación puede disminuir el metabolismo de los neurotransmisores y la neurogénesis (Solis et al., 2016).

Se realizó un estudio en pacientes con depresión clínica en los cuales los niveles de proteína C reactiva, IL-1 (Howren et al., 2009), IL-6 (Valkanova et al., 2013) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Kohler et al., 2017) se encontraban fuertemente relacionados con esta patología depresiva y con concentraciones elevadas en comparación a sujetos sanos, enviando señales para promover o frenar los procesos inmunológicos, según sean pro-inflamatorias o anti-inflamatorias (Warren, 2014), además de otros mediadores de respuesta como la proteína C reactiva a nivel sistémico (Wiborg, 2013).

El comportamiento considerado como patológico, es inducido en el cerebro por una inflamación sistémica inducida por las citoquinas proinflamatorias que se comunican con éste (Perry, 2004). La depresión está determinada por el nivel del patrón y del nivel de la magnitud durante el intervalo que dure la exposición ya sea de tipo crónica o de tipo aguda; además del tipo de estrés físico o psicológico que se desencadene (Joëls & Baram, 2009). Ante lo dicho anteriormente, parece existir una asociación significativa entre los factores estresantes de tipo ambiental, psicológicos e inmunológicos (Munksgaard, 2002).

1.3. Periodontitis y depresión

La Medicina Periodontal es definida como la disciplina encargada de validar la relación entre la periodontitis con diversas enfermedades y condiciones sistémicas (Offenbacher et al., 1996), así como su plausibilidad biológica en poblaciones humanas y en modelos animales (Papapanou et al., 2018a), habiéndose relacionado con la diabetes, el embarazo, enfermedades cardiovasculares y psiquiátricas dado que comparten mediadores inflamatorios comunes (Chapple et al., 2018).

1.3.1. Evidencia epidemiológica

Epidemiológicamente, en estudios transversales y de casos y controles se ha demostrado una asociación positiva entre la depresión y la periodontitis, en los cuales refieren que los pacientes con depresión tenían mayor inflamación gingival y mayor profundidad de sondaje que los controles (Johannsen et al., 2007), reportando que los pacientes deprimidos tenían estadísticamente más inflamación gingival 1,59 frente 0,89 (índice gingival de Loe & Silness) y más profundidad de sondaje 3,06 mm frente a 2,57 mm que los controles. Se encontró que el estrés acontecido por conflictos de tipo económico estaba asociado a un incremento de pérdida ósea y de inserción clínica (OR=1,70) entre diferentes grados de periodontitis y depresión; por otro lado, se halló una relación positiva entre los niveles de inserción clínica (Saletu et al., 2005) (Rosania et al., 2009), inflamación gingival, niveles de placa y pérdida dentaria con la depresión (Johannsen et al., 2007).

En estudios de tipo longitudinal, se ha registrado que la depresión estaba significativamente asociada con la pérdida de inserción clínica y profundidad de sondaje (Rosania et al., 2009). Por otra parte, la depresión aparecida en pacientes diagnosticados con periodontitis, se correlacionó significativamente con la progresión de esta última enfermedad (Klages et al., 2005). Un estudio de cohortes de base poblacional con un periodo de seguimiento de 10 años, reveló un incremento de la incidencia de la depresión en el grupo de periodontitis (N = 12,708) que en el grupo de pacientes que no la presentaban (N = 50832) (RR = 1,73; IC del 95% = 1,58–1,89) 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 de la diabetes, el abuso del alcohol y el cáncer. Se evidenció que los sujetos con características clínicas depresivas que hallaron en sujetos, presentaron mayor riesgo de padecer periodontitis (RR=1,19; IC del 95%=1.04-1.36) (Nascimento et al., 2019).

En otro estudio de cohorte (Huang et al., 2020), se plantea que la periodontitis puede estar asociada a un mayor riesgo de padecer posteriormente algún tipo de alteración depresiva, la tasa de incidencia de alteraciones depresivas fue significativamente mayor en los individuos con periodontitis respecto al grupo sin presencia de ésta, (RR = 1,46; IC del 95% = 1,17-1,81); coincidiendo con (Cunha et al., 2019) que reveló que la periodontitis estaba fuertemente asociada a la carga bacteriana total (OR = 1,91; IC del 95% = 1,00 -1,99) y depresión (OR = 28,94; IC del 95% = 4,44-177,27). En otro estudio (Coelho et al., 2020) también demostraron (RR = 1,54, IC del 95% = 1,13 - 2,10) que existe una asociación positiva, estadísticamente significativa, entre

trastornos depresivos y periodontitis. En un estudio en personas de 20 a 29 años (Hwang & Park, 2018) la presencia de periodontitis se asoció con depresión autoinformada (OR=2,031; IC del 95%=1,01-4,08) y la presencia de periodontitis severa se asoció tanto con depresión autoinformada (OR=6,53; IC del 95%= 2,19-19,48) y depresión diagnosticada (OR= 7,73; IC del 95% = 1,97-30,39).

Liu et al (2018) obtuvieron una asociación significativa entre la depresión y la periodontitis (OR=1,61, IC del 95%=1,16-2,23), resultado que coincide con los estudios de (Zheng et al., 2021) que igualmente tuvieron una asociación significativa de periodontitis y depresión (OR=1,70, IC 95%=1,01-2,83).

Cabe señalar que en un metaanálisis (Araújo et al., 2016) (OR = 1,03, IC del 95% = 0,75-1,41), 6 artículos marcaron una asociación positiva entre la depresión y las características clínicas de la periodontitis (4 transversales y 2 casos y controles); 9 estudios no marcaron asociación entre ambas patologías (5 transversales, 3 casos y controles y 1 de cohortes). Concluyendo que presentan una heterogeneidad marcada entre los estudios mencionados, mostrando una asociación significativa entre depresión y periodontitis.

1.3.2. Plausibilidad biológica

Desde un punto de vista de la plausibilidad biológica, la periodontitis causa o acelera otras enfermedades sistémicas crónicas provocando inflamación sistémica de bajo grado tanto a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias como por la invasión de bacterias periodontales como *P. gingivalis* junto con sus componentes como, por ejemplo, lipopolisacáridos (LPS) en circulación sistémica (Hashioka et al., 2019), implicando que la periodontitis es un factor de riesgo para un trastorno neuroinflamatorio y neurodegenerativo (Hashioka et al., 2018), aunque aún no se ha demostrado que la ansiedad, el estrés y la depresión sean factores de riesgo de las enfermedades periodontales (Laforgia et al., 2015). Es importante mencionar la evidencia de presencia de mediadores inflamatorios comunes y el impacto sistémico que produce (Cota & Costa, 2013).

Los mecanismos biológicos por los cuales la periodontitis puede relacionarse con la depresión (Hashioka et al., 2019) se pueden presumir que consisten en tres posibilidades (Figura 1):

Primera posibilidad: la neuroinflamación puede ser provocada por el incremento de concentraciones de citoquinas proinflamatorias en el sistema nervioso central SNC asociados con

la activación glial inducida por inflamación sistémica asociada con periodontitis (Hashioka et al., 2019).

Segunda posibilidad: la neuroinflamación puede ser provocada por la invasión directa del patógeno periodontal y sus productos inflamatorios en el cerebro. Dentro de la bolsa periodontal, las bacterias existen en una biopelícula dental estratificada, que está hecha de microorganismos y sus componentes (por ejemplo, endotoxinas de lipopolisacáridos LPS y factores de virulencia), la bolsa periodontal inflamada puede, por tanto, ser una fuente importante de mediadores inflamatorios y derivados de patógenos. En la periodontitis, aproximadamente el 85% de las bacterias son gramnegativas, y las tres principales bacterias periodontales *T. forsythia*, *T. denticola* y *P. gingivalis* son capaces de invadir el epitelio y sus productos, especialmente LPS, pueden inducir citocinas proinflamatorias, como IL-1b, IL-6 y TNF-a (Kohler et al., 2017). Estas citoquinas también podrían ingresar al sistema de circulación y provocar diseminación sistémica, inflamación o deterioro si la inflamación sistémica ya existe, pudiendo afectar el comportamiento y el estado de ánimo a través de una posible comunicación entre la vía periférica y el cerebro que conducen a neuroinflamación. Se ha demostrado que la inyección sistémica de LPS descompone la barrera hematoencefálica (BHE) mediante la activación anormal de la metaloproteinasa de la matriz (Frister et al., 2014).

Tercera posibilidad: es presumible que el patógeno y sus productos inflamatorios puedan ingresar al cerebro y causar directamente neuroinflamación después de que la diseminación sistémica inducida por periodontitis, luego que los LPS derivados del "complejo rojo" interrumpen la BHE hasta cierto punto. Este planteamiento se corroboró también en los estudios de (Martínez, Montero, et al., 2021); (Hashioka et al., 2018); (Dumitrescu, 2016); (Huang et al., 2020), que coincidieron con este criterio.

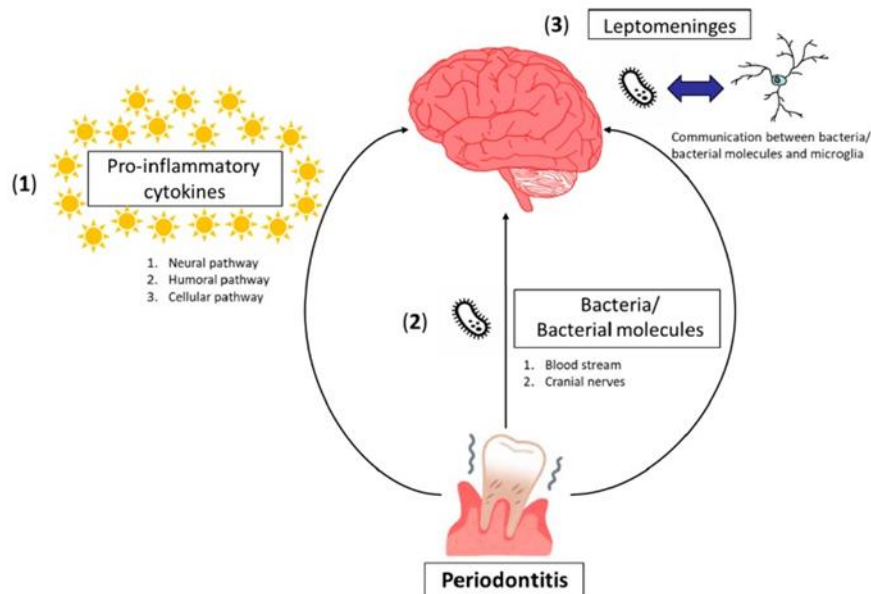


Figura 1. Posibles mecanismos biológicos entre la periodontitis y la neuroinflamación. (1) La vía neuronal, las citocinas sistémicas activan directamente los nervios aferentes primarios, como el nervio vago. (2) La vía humoral, involucra el plexo coroideo y los órganos circunventriculares, que carecen de una barrera hematoencefálica intacta. (3) La vía celular, implica inflamación sistémica en asociación con la activación de células endoteliales y un aumento de los monocitos circulantes (Hashioka et al., 2019).

Estas posibilidades también pueden ayudar a comprender cómo los factores psicológicos pueden contribuir a las diferencias individuales en la susceptibilidad/resistencia a la periodontitis (Breivik et al., 2015). En tal caso, los sujetos que padecen diferentes enfermedades mentales tendrían una salud bucal deficiente en comparación con la población general. Este grupo de pacientes necesita cuidados bucales reforzados regulares a largo plazo (Nayak et al., 2016).

Existe evidencia en revisiones sistemáticas que han concluido que los pacientes diagnosticados con depresión presentan elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias a nivel sérico tales como IL-1, IL-6, TNF- α , así como elevados niveles de PCR (Dowlati et al., 2010). Teniendo en cuenta que, en la periodontitis, se ha visto la asociación con niveles altos de marcadores de inflamación sistémica, como IL-6, TNF- α y PCR, se cree que podría potenciar la respuesta inflamatoria y oxidativa, dando por consiguiente una vulnerabilidad hacia la depresión (Dumitrescu, 2016). Por otra parte, (Arauchi et al., 2018) existe evidencia que hay asociación entre la depresión y la periodontitis como se acepta ampliamente que las microglías activadas

actúan como inmunorreguladores de la activación astrocítica, y viceversa, ya que los estudios de activación de microglia y astrocitos en el cerebro patológico pueden ser muy importante para arrojar luz sobre la patogenia de la psiquiatría de estos trastornos (Figura 2).

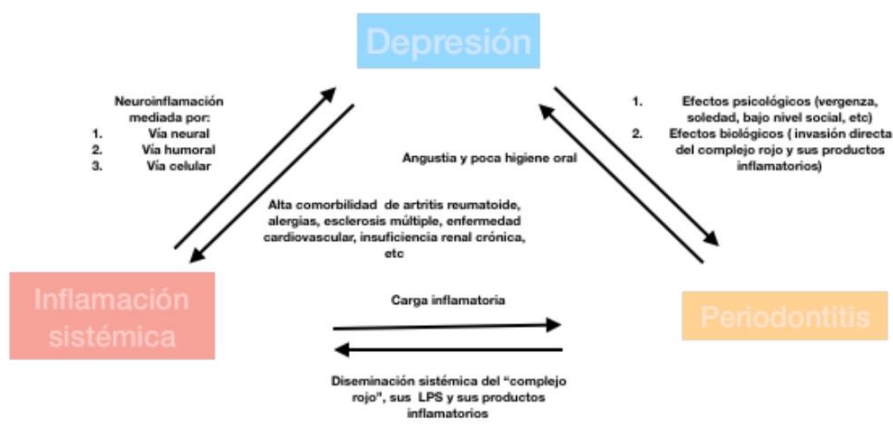


Figura 2. Esquema de la plausibilidad biológica modificado (Arauchi et al., 2018).

1.4. Modelos de inducción de periodontitis y depresión en ratas

En la actualidad, para llevar a cabo estudios de intervención o experimentación, se cuentan con varios modelos para la inducción de la periodontitis en un modelo animal como la rata; como son ligaduras de seda, nylon o algodón y/o modelos combinados con la inducción con bacterias y ligaduras. El más ampliamente usado es el modelo de la ligadura de algodón donde se observa un incremento de microorganismos patógenos en la periodontitis experimental, con obtención de pérdida ósea representativa (Oliveira et al., 2016). En el otro caso, usando la inducción con bacterias (*P.gingivalis*) y ligadura, se observó que hay una potencial pérdida ósea, ya sea sólo con ligaduras o ligaduras bañadas en *P. gingivalis*, pero también asociada a un trama mecánico a nivel histológico (Kuraji et al., 2017).

El modelo de estrés leve crónico (CMS, por sus siglas en inglés), es uno de los modelos más validados con lo que se refiere a la depresión inducida, induciendo una acción sobre el sistema nervioso central ocasionando anhedonia en los seres humanos que consiste en la incapacidad para experimentar placer, hay pérdida de interés o satisfacción por todas las actividades; siendo el comportamiento similar en animales (Willner, 2005).

Se tiene como evidencia el estudio de Martínez et al (2021), en el que los autores realizaron un modelo preclínico *in vivo* en ratas Wistar, en este estudio se identificó la presencia de *F. nucleatum* en el tejido cerebral de estos animales, lo que sugiere un posible mecanismo que vincula la periodontitis y la depresión. Los valores más altos de niveles de hueso alveolar ocurrieron en el grupo: periodontitis y Estrés Leve Crónico, CMS (P + CMS +), que también presentó la mayor expresión de mediadores proinflamatorios (TNF- α , IL-1 β y NF-kB) en la corteza frontal, en relación con el transporte mediado por la lipoproteína APOA1 del lipopolisacárido bacteriano al cerebro y la detección de *F. nucleatum* en el parénquima cerebral. Una desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal del estrés, reflejada en el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona y de receptores de glucocorticoides.

1.5. Justificación

En los últimos años se ha destacado el papel de la neuroinflamación en la etiopatogenia de la depresión. En ausencia de una infección clara, el estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado característico de la periodontitis puede contribuir a la neuroinflamación. Basándonos en la evidencia epidemiológica, la plausibilidad biológica y la escasa evidencia derivada de estudios preclínicos *in vivo* es de interés científico ahondar en la relación entre la periodontitis y la depresión para tratar de entender la etiopatogenia de estas variables a través de los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1), IFN- γ (interferón gamma), IL-10 (interleuquina 10), CRP (proteína C reactiva), E-Selectina, P-Selectina y sICAM (molécula de adhesión intercelular), producidos en los grupos de experimentación de periodontitis (P+CMS-), depresión (P-CMS+), periodontitis y depresión (P+CMS+) y control (P-CMS-).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Analizar mediante un estudio preclínico *in vivo* la presencia de mediadores inflamatorios en la etiopatogenia de la relación entre periodontitis y depresión.

2.2. Objetivos específicos:

Comparar los niveles de concentración de los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, E-Selectina y sICAM presentes **en encía** producidos en los grupos (P-CMS+), (P+CMS+), (P+CMS-) y (P-CMS-).

Comparar los niveles de concentración de los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, E-Selectina, sICAM, P-Selectina y CRP presentes **en plasma** producidos en los grupos (P-CMS+), (P+CMS+), (P+CMS-) y (P-CMS-).

3. HIPÓTESIS

3.1.Hipótesis General:

Los mediadores inflamatorios están implicados en la etiopatogenia de la periodontitis relacionada con la depresión.

3.2.Hipótesis específicas:

Los niveles de mediadores inflamatorios en encía producidos en el grupo (P+CMS+) son mayores que los producidos en los grupos (P+CMS-), (P-CMS+) y (P-CMS-).

Los niveles de mediadores inflamatorios en plasma producidos en el grupo (P+CMS+) son mayores que los producidos en los grupos (P+CMS-), (P-CMS+) y (P-CMS-).

4. MATERIAL Y METODOS

Todos los protocolos experimentales, manejo de animales y sacrificio se realizaron 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 de Madrid (PROEX 087/18).

4.1. Diseño de estudio

Se trata de un estudio preclínico *in vivo* experimental de acuerdo con las directrices de la guía clínica ARRIVE (Vignoletti, 2012). Se usaron ratas macho Wistar Hannover (HsdRccHan: Wist, Envigo, España) (230-250 g) en condiciones constantes durante 7 días antes de los experimentos. Las ratas fueron estabuladas en las instalaciones (animalario de la Facultad de Medicina) de la UCM.

El estudio constó 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 (P+CMS+); (b) con periodontitis y sin depresión (P+CMS-); (c) sin periodontitis y con depresión (P-CMS+); y (d) sin periodontitis y sin depresión (P-CMS-).

4.2. Modelos de enfermedades

4.2.1. Modelo de periodontitis:

El modelo de periodontitis experimental en las ratas del estudio (Virto et al., 2018) consistió en inocular una disolución de dos bacterias con demostrada patogenicidad periodontal; *P. gingivalis* ATCC W83K1 y *F. nucleatum* DMSZ 20482 a través de sondajes orales. Ello conlleva el mantenimiento de los cultivos anaerobios bacterianos (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ a 37 °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 ml) (Becton, Dickinson and Company, USA). El crecimiento bacteriano se ajustó por espectrofotometría a 660 nm con el objetivo de obtener una solución de BHI con 10⁹ 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^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} con el fin de controlar las UFC/ml del cultivo y la ausencia de contaminaciones. Los dos cultivos puros se mezclaron y centrifugaron (10 minutos a 1,520 g) 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 administro 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 estéril sin aguja, temprano en la mañana sacando a los animales de la jaula, siempre en el mismo orden (P-CMS+, P-CMS-, P+CMS+ y P+CMS-) para evitar la contaminación bacteriana.

4.2.2. Modelo de depresión

Para el modelo de depresión (*Chronic Mild Stres, CMS*), 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 (Martín-Hernández et al., 2016). Los estímulos estresantes empleados fueron:

- 1) Privación de alimentos
- 2) Privación de agua
- 3) Inclinación de la jaula a 45°
- 4) Iluminación Estroboscópica (150 flashes /min)
- 5) Jaula sucia
- 6) Iluminación intermitente cada 2 horas.

4.3 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. Se recolectaron muestras de sangre, mandíbula y maxilar. Para evitar la posible influencia del ritmo cicardiano, la recolección de muestras biológicas se realizó siempre al mismo tiempo (es decir, entre las 2 y las 3 de la tarde).

Tras la eutanasia se procedió a la disección de los animales, en este caso la conservación de las muestras fue recogida en nieve carbónica y almacenadas inmediatamente a -80°C hasta posterior utilización según determinación.

Las muestras de sangre se recolectaron por punción cardiaca, luego se anticoagularon con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 1% p:v, 1 vol EDTA por 50 vol de sangre) y se centrifugaron a 366g a temperatura ambiente durante 15 minutos para obtener plasma. Se almacenaron luego en pocillos a -20°C.

Para recolectar las muestras de encía se procedió a retirar del frigorífico, una a una, las muestras de las mandíbulas y maxilares congeladas, envueltas en papel de aluminio, extrayendo el tejido gingival con una hoja de bisturí N°15c, para luego pesarlas en una balanza de precisión de laboratorio previamente calibrada con una tara adecuada (ver Anexo 8.1). Posterior a ello se conservó el tejido gingival disecado en unos tubos *Eppendorf* con esferas de cerámica dentro del frigorífico a -80°C.

Para la trituración de las muestras de encía, se homogeneizó en el MP Biomedicals™ Instrumento con el buffer de extracción (Millipex PBS + coctel inhibidor de proteasas + <0.2% de Tritón). Se añade 300 ul a cada tubo para triturar el tejido. Se centrifuga en 9 ciclos (con la finalidad de no calentar los tubos) a una velocidad de 6 m/s durante 40 segundos y se recoge el sobrenadante. Las muestras se diluyen 1:80 (2,5 ul de encía triturada + 197,5 ul de Assay buffer) y son almacenadas en pocillos a -20°C.

4.4. Análisis de muestras

El análisis de muestras se realizó a través de la técnica de Luminex de los analitos IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, CRP, E-Selectina, P-Selectina y sICAM provenientes del plasma y encía de ratas previamente estimuladas con periodontitis y/o depresión. La concentración mínima detectable (MinDC) se calcula utilizando MILLIPEX Analista, donde se mide los verdaderos límites de detección para un ensayo determinando matemáticamente cuál sería el MinDC empírico si un número infinito de concentraciones estándar se realizarían para el ensayo en las mismas condiciones.

4.4.1. Cuantificación de los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, E-selectina, sICAM en muestras de plasma y encía.

Se empleó el kit *Millipex Map Rat cytokine* para la cuantificación simultánea de estos analitos en sus respectivas muestras de plasma y suero de ratas de los grupos (P-CMS+), (P+CMS+), (P+CMS-) y (P-CMS).

Se añadió 200 μ L de tampón de ensayo en cada pocillo de la placa. Se selló y mezcló en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 ° C). Se decantó el *Assay Buffer* (tampón de ensayo) y eliminó la cantidad residual de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre toallas absorbente varias veces. Se añadió 25 μ L de cada estándar o control en los pocillos correspondientes. Se añadió 25 μ L de tampón de ensayo a los pocillos de muestra. Se añadió 25 μ L de tampón de ensayo a los pocillos de fondo, estándares y control. Se añadió 25 μ L de muestra diluida en los pocillos correspondientes. Se agitó la botella mezcladora en vórtex y agregue 25 μ L de perlas mezcladas a cada pocillo. Se selló la placa con un sellador de placas, envolviendo la placa con papel de aluminio e incubando con agitación en un agitador de placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiró con cuidado el contenido de los pocillos y lavó la placa 2 veces. Se añadió 25 μ L de anticuerpos de detección en cada pocillo. Se selló, cubrió con papel de aluminio y se incubó con agitación en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (20 - 25 ° C). Se añadió 25 μ L de *Streptavidin-Phycoeritrin* a cada pocillo que contenga 50 μ L de anticuerpos de detección. Se selló y cubrió con papel de aluminio e incubó con agitación en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 ° C). Se retiró con cuidado el contenido de los pocillos y se lavó la placa 2 veces. Se agregó 125 μ L de *Sheath Fluid* (fluido envolvente) a todos los pozos. Se volvió a suspender las perlas en un agitador de placas durante 5 minutos. Se procesó el producto en la placa en Luminex® 200™ y con xPONENT® software.

Se guardó y analizó los datos de la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) para calcular el análisis de las concentraciones de IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, E-selectina, sICAM de las muestras de plasma y encía de cada uno de los grupos de ratas.

4.4.2. Cuantificación de los mediadores inflamatorios CRP, P-Selectina en muestras de plasma.

Se empleó el kit *Milliplex Map Rat Vascular Injury* para la cuantificación simultánea de estos analitos en muestras de plasma de ratas de los grupos (P-CMS+), (P+CMS+), (P+CMS-) y (P-CMS).

Se añadió 200 µL de tampón de ensayo en cada pocillo de la placa. Selló y mezcló en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 ° C). Se decantó el Assay Buffer (tampón de ensayo) y eliminó la cantidad residual de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre toallas absorbente varias veces. Se añadió 25 µL de cada estándar o control en los pocillos correspondientes. Se añadió 25 µL de tampón de ensayo a los pocillos de muestra. Se añadió 25 µL de tampón de ensayo a los pocillos de fondo, estándares y control. Se añadió 25 µL de muestra diluida en los pocillos correspondientes. Se agitó la botella mezcladora en vórtex y agregue 25 µL de perlas mezcladas a cada pocillo. Se selló la placa con un sellador de placas, envolviendo la placa con papel de aluminio e incubando con agitación en un agitador de placas durante 16-18 horas a 2-8 ° C. Se retiró con cuidado el contenido de los pocillos y lavó la placa 3 veces. Se añadió 50 µL de anticuerpos de detección en cada pocillo. Se selló, cubrió con papel de aluminio y se incubó con agitación en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (20 - 25 ° C). Se añadió 50 µL de *Streptavidin-Phycoeritrin* a cada pocillo que contenga 50 µL de anticuerpos de detección. Se selló, cubrió con papel de aluminio e incubó con agitación en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 ° C). Se retiró con cuidado el contenido de los pocillos y lave la placa 3 veces. Se agregó 150 µL de *Sheath Fluid* (fluido envolvente) a todos los pozos. Se volvió a suspender las perlas en un agitador de placas durante 5 minutos. Se procesó el producto en la placa en Luminex® 200™ y con xPONENT® software.

Se guardó y analizó los datos de la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) para calcular el análisis de las concentraciones de CRP y P-Selectina de las muestras de plasma de cada uno de los grupos de ratas.

4.5. Cálculo del tamaño muestral

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 Universidad Complutense de Madrid y del Grupo de Investigación de Etiología y Terapéutica de las Enfermedades Periodontales (EETEP) perteneciente al Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, en estudios que utilizaban el modelo de CMS y también otros grupos que utilizaban protocolos de experimentación similares. (Martín-Hernández et al., 2016). Lo que nos propone realizar un tamaño muestral $n=10$ ratas tipo Wistar de la misma edad y peso por subgrupo, haciendo un total de $n = 40$ por grupo.

4.5.1. Aleatorización

Las ratas fueron aleatoriamente asignados a los grupos de periodontitis y/o depresión según un sistema de distribución equilibrada a través de una tabla generada por ordenador de números aleatorios que fue realizada por una persona diferente del operador.

4.5.2. Ocultación de la asignación

El método de ocultación de asignación seleccionado fue mediante numeración. Éstas se desvelaron al operador en el momento de comenzar la experimentación.

4.5.3. Enmascaramiento

El enmascaramiento a doble ciego fue llevado a cabo por:

- Los examinadores de forma que se desconociese el tratamiento que han recibido las ratas.
- El analista: que aportó la información con los nombres de los grupos ocultos.

4.6. Variables de estudio

Las variables respuesta cuantitativas son los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, CRP, E-Selectina, P-Selectina y sICAM medidos en concentraciones de pg/mL o ng/mL en plasma y encía. Las variables independiente categóricas son los grupos (P+CMS+); (P+CMS-); (P-CMS+); (P-CMS-). Estos mediadores inflamatorios fueron analizados mediante citometría de flujo Luminex® LX200 y software xPONENT (EE.UU.).

4.7. Análisis estadístico

La variable respuesta principal es la concentración de los mediadores inflamatorios en plasma y encía IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, CRP, E-Selectina, P-Selectina y sICAM

(variables cuantitativas). Se identificó el valor de la concentración de cada analito para compararlo entre cada uno de sus medias de los 4 sub grupos en los 2 grupos.

La distribución de la muestra se comprobó mediante la obtención de diagramas de BoxPlots y de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk. Para el cálculo de diferencias intergrupo se empleó un test ANOVA con correcciones de Bonferroni (Post-hoc) y con intervalos de confianza del 95%. 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

Debido a la alta mortalidad asociada a la experimentación con este modelo animal, las muestras que se pudieron extraer quedaron de la siguiente manera:

Encía:

- P+CMS+: 9 ratas
- P+CMS-: 8 ratas
- P-CMS+: 8 ratas
- P-CMS-: 7 ratas

n = 32

Plasma:

- P+CMS+: 10 ratas
 P+CMS-: 9 ratas
 P-CMS+: 9 ratas
 P-CMS-: 9 ratas

n = 37

5.2. Mediadores inflamatorios en encía

En la Tabla 1 se aprecia los valores de los analitos: IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, sICAM, E-selectina en encía. Para complementar la interpretación de los resultados, se recomienda ver el apartado de Anexos 8.2.

Tabla 1. Analitos respuesta IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, sICAM, E-selectina.

Mediadores inflamatorios	Grupos	n	Media	Desviación estándar	Global p-valor (ANOVA)	Comparación Post-hoc				
						Comparación Específica	Diferencia de medias	Intervalo de confianza al 95%		Post-hoc p-valor (ANOVA)
							Valor más bajo	Valor más alto		
IL-1b (pg/mL)	P+CMS-	8	61,60	9,79	0,120	P+CMS- vs. P+CMS+	-6,38	-20,11	7,34	1,000
	P+CMS+	9	67,98	5,81		P+CMS- vs. P-CMS+	2,44	-11,68	16,57	1,000
	P-CMS+	8	59,15	13,32		P+CMS- vs. P-CMS-	5,56	-9,06	20,18	1,000
	P-CMS-	7	56,04	9,93		P+CMS+ vs. P-CMS+	8,83	-4,90	22,56	0,472
						P+CMS+ vs. P-CMS-	11,95	-2,29	26,18	0,146
P-CMS+ vs. P-CMS-	3,12	-11,51	17,74	1,000						
TNF-a (pg/mL)	P+CMS-	8	31,68	5,92	0,335	P+CMS- vs. P+CMS+	-1,35	-8,44	5,74	1,000
	P+CMS+	9	33,03	3,52		P+CMS- vs. P-CMS+	2,65	-4,64	9,95	1,000
	P-CMS+	8	29,03	5,35		P+CMS- vs. P-CMS-	2,46	-5,09	10,01	1,000
	P-CMS-	7	29,22	5,69		P+CMS+ vs. P-CMS+	4,01	-3,08	11,10	0,720
						P+CMS+ vs. P-CMS-	3,81	-3,54	11,16	0,914
P-CMS+ vs. P-CMS-	-0,20	-7,75	7,36	1,000						
IL-6 (pg/mL)	P+CMS-	8	1332,75	308,64	0,638	P+CMS- vs. P+CMS+	-40,37	-416,33	335,59	1,000
	P+CMS+	9	1373,12	190,79		P+CMS- vs. P-CMS+	97,55	-289,31	484,41	1,000
	P-CMS+	8	1235,20	292,48		P+CMS- vs. P-CMS-	105,93	-294,51	506,36	1,000
	P-CMS-	7	1226,82	295,22		P+CMS+ vs. P-CMS+	137,92	-238,04	513,88	1,000
						P+CMS+ vs. P-CMS-	146,30	-243,62	536,21	1,000
P-CMS+ vs. P-CMS-	8,38	-392,06	408,81	1,000						

Mediadores inflamatorios	Grupos	n	Media	Desviación estándar	Global p-valor (ANOVA)	Comparación Post-hoc				
						Comparación Específica	Diferencia de medias	Intervalo de confianza al 95%		Post-hoc p-valor (ANOVA)
								Valor más bajo	Valor más alto	
MCP-1(pg/mL)	P+CMS-	8	707,80	112,74	0,411	P+CMS- vs. P+CMS+	-38,42	-191,34	114,51	1,000
	P+CMS+	9	746,22	66,42		P+CMS- vs. P-CMS+	19,74	-137,62	177,10	1,000
	P-CMS+	8	688,06	140,85		P+CMS+ vs. P-CMS-	55,34	-107,55	218,22	1,000
	P-CMS-	7	652,46	116,16		P+CMS+ vs. P-CMS+	58,16	-94,77	211,08	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	93,75	-64,85	252,36
IFN-g (pg/mL)	P+CMS-	8	290,80	210,84	0,393	P+CMS- vs. P+CMS+	-53,36	-398,24	291,53	1,000
	P+CMS+	9	344,16	273,52		P+CMS- vs. P-CMS+	106,01	-248,87	460,89	1,000
	P-CMS+	8	184,79	239,00		P+CMS- vs. P-CMS-	-109,09	-476,43	258,25	1,000
	P-CMS-	7	399,89	270,99		P+CMS+ vs. P-CMS+	159,37	-185,52	504,25	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-55,74	-413,42	301,95
IL-10 (pg/mL)	P+CMS-	8	161,50	30,00	0,447	P-CMS+ vs. P-CMS-	0,646	-582,44	152,24	0,646
	P+CMS+	9	169,85	16,82		P+CMS- vs. P+CMS+	-8,34	-45,23	28,54	1,000
	P-CMS+	8	152,24	30,51		P+CMS- vs. P-CMS+	9,27	-28,69	47,22	1,000
	P-CMS-	7	150,69	28,69		P+CMS- vs. P-CMS-	10,82	-28,47	50,10	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS+	17,61	-19,28	54,50
sICAM (ng/mL)	P+CMS-	8	10,32	4,05	0,203	P+CMS+ vs. P-CMS-	19,16	-19,10	57,41	0,997
	P+CMS+	9	10,85	1,75		P-CMS+ vs. P-CMS-	1,55	-37,74	40,84	1,000
	P-CMS+	8	9,71	3,47		P+CMS- vs. P+CMS+	-0,53	-4,51	3,45	1,000
	P-CMS-	7	7,77	1,28		P+CMS- vs. P-CMS+	0,61	-3,48	4,71	1,000
							P+CMS- vs. P-CMS-	2,55	-1,69	6,78
E-Selectin (ng/mL)	P+CMS-	8	4,62	0,53	0,156	P+CMS+ vs. P-CMS+	1,14	-2,84	5,12	1,000
	P+CMS+	9	5,12	0,28		P+CMS+ vs. P-CMS-	3,08	-1,05	7,21	0,260
	P-CMS+	8	4,88	1,34		P-CMS+ vs. P-CMS-	1,93	-2,31	6,17	1,000
	P-CMS-	7	4,24	0,45		P+CMS- vs. P+CMS+	-0,50	-1,55	0,56	1,000
							P+CMS- vs. P-CMS+	-0,26	-1,35	0,82
					P+CMS- vs. P-CMS-	0,38	-0,74	1,50	1,000	
					P+CMS+ vs. P-CMS+	0,23	-0,82	1,29	1,000	
					P+CMS+ vs. P-CMS-	0,87	-0,22	1,97	0,185	
					P-CMS+ vs. P-CMS-	0,64	-0,48	1,76	0,699	

En todos los casos se observa que no hay una distribución simétrica, la media de concentración más alta se encontró en el grupo (P+CMS+) de sICAM con 10,85 ng/mL; sin embargo, la desviación estándar más baja se dio en el grupo (P+CMS+) de E-Selectin (0,28), indicando que hay una menor variabilidad con respecto a su media. No se evidencia que el p valor global sea estadísticamente significativo ($p > 0.05$); se realiza la prueba Post Hoc de Bonferroni, indicando que en la comparación de los grupos (P+CMS+) vs. (P-CMS-) de los mediadores inflamatorios IL-1 β , IL-6, MCP-1, IL-10, sICAM, E-Selectina, existe una tendencia a tener la p valor más baja, pero aún así, estadísticamente no significativa.

En el caso de los mediadores inflamatorios TNF- α y IFN- γ , su p valor Post Hoc fue estadísticamente no significativo; para TNF- α , la comparación específica más baja fue en el grupo (P+CMS+) vs. (P-CMS+) con $p = 0,720$; y para IFN- γ su comparación específica fue en el grupo (P-CMS+) vs. (P-CMS-) con $p = 0.646$.

5.3. Mediadores inflamatorios en plasma

En la Tabla 2 se aprecia los valores de los analitos: IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, sICAM, E-selectina, P-selectina, CRP en plasma. Para complementar la interpretación de los resultados, se recomienda ver el apartado de Anexos 8.3.

Tabla 2: Analitos respuesta IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, E-selectina, sICAM, P-selectina, CPR.

Mediadores inflamatorios	Grupos	n	Media	Desviación estándar	Global p-valor (ANOVA)	Comparación Post-hoc				
						Comparación Específica	Diferencia de medias	Intervalo de confianza al 95%		Post-hoc p-valor (ANOVA)
								Valor más bajo	Valor más alto	
IL-1b (pg/mL)	P+CMS-	9	38,22	32,12	0,012	P+CMS- vs. P+CMS+	18,04	-19,42	55,51	1,000
	P+CMS+	10	20,18	12,38		P+CMS- vs. P-CMS+	-26,94	-65,38	11,50	0,346
	P-CMS+	9	65,16	45,48		P+CMS- vs. P-CMS-	10,72	-27,72	49,16	1,000
	P-CMS-	9	27,50	14,45		P+CMS+ vs. P-CMS+	-44,98	-82,45	-7,51	0,012
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-7,32	-44,79	30,14
						P-CMS+ vs. P-CMS-	37,66	-0,78	76,10	0,058
TNF-a (pg/mL)	P+CMS-	9	16,45	3,37	0,031	P+CMS- vs. P+CMS+	2,38	-1,87	6,63	0,756
	P+CMS+	10	14,07	4,25		P+CMS- vs. P-CMS+	2,79	-1,58	7,15	0,493
	P-CMS+	9	13,66	2,99		P+CMS- vs. P-CMS-	-1,42	-5,78	2,95	1,000
	P-CMS-	9	17,87	2,08		P+CMS+ vs. P-CMS+	0,41	-3,84	4,66	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-3,80	-8,05	0,46
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-4,21	-8,57	0,16	0,064
IL-6(pg/mL)	P+CMS-	9	1749,64	493,20	0,009	P+CMS- vs. P+CMS+	480,81	-3,70	965,32	0,053
	P+CMS+	10	1268,84	376,78		P+CMS- vs. P-CMS+	492,25	-4,85	989,35	0,054
	P-CMS+	9	1257,39	356,22		P+CMS- vs. P-CMS-	66,61	-430,49	563,71	1,000
	P-CMS-	9	1683,03	228,91		P+CMS+ vs. P-CMS+	11,44	-473,07	495,96	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-414,20	-898,71	70,31
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-425,64	-922,74	71,46	0,132
MCP-1(pg/mL)	P+CMS-	9	398,87	39,06	0,008	P+CMS- vs. P+CMS+	38,57	-54,00	131,14	1,000
	P+CMS+	10	360,30	76,77		P+CMS- vs. P-CMS+	87,04	-7,94	182,01	0,089
	P-CMS+	9	311,83	59,67		P+CMS- vs. P-CMS-	-32,11	-127,08	62,86	1,000
	P-CMS-	9	430,98	97,66		P+CMS+ vs. P-CMS+	48,47	-44,10	141,04	0,907
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-70,68	-163,25	21,89
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-119,15	-214,12	-24,17	0,008
IFN-g (pg/mL)	P+CMS-	9	466,72	42,95	0,219	P+CMS- vs. P+CMS+	19,72	-48,71	88,15	1,000
	P+CMS+	10	447,00	76,92		P+CMS- vs. P-CMS+	26,73	-43,47	96,94	1,000
	P-CMS+	9	439,98	28,37		P+CMS- vs. P-CMS-	-22,01	-92,21	48,20	1,000
	P-CMS-	9	488,73	48,04		P+CMS+ vs. P-CMS+	7,01	-61,41	75,44	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-41,73	-110,16	26,70
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-48,74	-118,95	21,46	0,359
IL-10 (pg/mL)	P+CMS-	9	133,86	112,67	0,027	P+CMS- vs. P+CMS+	61,05	-58,25	180,35	0,962
	P+CMS+	10	72,81	39,24		P+CMS- vs. P-CMS+	-69,75	-192,15	52,65	0,715
	P-CMS+	9	203,61	134,00		P+CMS- vs. P-CMS-	33,43	-88,97	155,83	1,000
	P-CMS-	9	100,42	54,01		P+CMS+ vs. P-CMS+	-130,80	-250,10	-11,50	0,025
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-27,61	-146,91	91,69
						P-CMS+ vs. P-CMS-	103,19	-19,21	225,59	0,144
sI-CAM (ng/mL)	P+CMS-	9	9,40	1,88	0,368	P+CMS- vs. P+CMS+	1,26	-0,81	3,33	0,579
	P+CMS+	10	8,14	0,79		P+CMS- vs. P-CMS+	1,04	-1,09	3,16	1,000
	P-CMS+	9	8,36	1,83		P+CMS- vs. P-CMS-	0,75	-1,37	2,87	1,000
	P-CMS-	9	8,65	1,74		P+CMS+ vs. P-CMS+	-0,22	-2,29	1,84	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-0,51	-2,58	1,55
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-0,29	-2,41	1,83	1,000
E-selectina (ng/mL)	P+CMS-	9	131,80	28,24	0,156	P+CMS- vs. P+CMS+	14,80	-15,36	44,97	1,000
	P+CMS+	10	117,00	20,21		P+CMS- vs. P-CMS+	20,84	-10,11	51,78	0,406
	P-CMS+	9	110,96	21,50		P+CMS- vs. P-CMS-	0,02	-30,92	30,97	1,000
	P-CMS-	9	131,78	23,18		P+CMS+ vs. P-CMS+	6,03	-24,13	36,19	1,000
							P+CMS+ vs. P-CMS-	-14,78	-44,94	15,38
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-20,81	-51,76	10,13	0,407

Mediadores inflamatorios	Grupos	n	Media	Desviación estándar	Global p-valor (ANOVA)	Comparación Post-hoc					
						Comparación Específica	Diferencia de medias	Intervalo de confianza al 95%		Post -hoc p-valor (ANOVA)	
								Valor más bajo	Valor más alto		
P-Selectina (pg/mL)	P+CMS-	9	42735,66	31593,27	0,000	P+CMS- vs. P+CMS+	28437,59	-3271,02	60146,19	0,101	
	P+CMS+	10	14298,08	27588,21		P+CMS- vs. P-CMS+	36155,30	3622,96	68687,64	0,022	
	P-CMS+	9	6580,36	8526,08		P+CMS- vs. P-CMS-	-18686,24	-51218,58	13846,11	0,699	
	P-CMS-	9	61421,90	23805,30		P+CMS+ vs. P-CMS+	7717,71	-23990,89	39426,32	1,000	
						P+CMS+ vs. P-CMS-	-47123,82	-78832,43	-15415,22	0,001	
						P-CMS+ vs. P-CMS-	-54841,54	-87373,88	-22309,19	0,000	
CRP (ng/mL)	P+CMS-	0			0,725						
	P+CMS+	0									
	P-CMS+	2	180640,00	6222,54							
	P-CMS-	4	182130,00	3836,30							

En todos los casos se observa que no hay una distribución simétrica, la media de concentración más alta se encontró en el grupo (P-CMS-) de E-Selectina con 131,78 ng/mL; sin embargo, la desviación estándar más baja se dio en el grupo (P+CMS+) de sICAM (0,79), indicando que hay una menor variabilidad con respecto a su media. Se evidencia que el p valor global es estadísticamente significativo ($p > 0.05$) en los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-10 y P-selectina, siendo el más significativo en este último ($p = 0,001$).

Se realiza la prueba Post Hoc de Bonferroni, indicando que en los mediadores inflamatorios y sus grupos comparativos IL-1 β (P+CMS+) vs. (P-CMS+); MCP-1 (P-CMS+) vs. (P-CMS-); IL-10 (P+CMS+) vs (P-CMS+) y P-Selectina (P+CMS-) vs (P-CMS+), (P+CMS+) vs (P-CMS-), (P-CMS+) vs. (P-CMS-) existe una tendencia a tener una diferencia estadísticamente significativa y el p valor más bajo, siendo el grupo (P-CMS+) vs. (P-CMS-) el más significativo con $p = 0,001$.

En el caso de los mediadores inflamatorios TNF- α , IFN- γ , E-selectina, sICAM y CPR., su valor p global fue estadísticamente no significativo ($p > 0,05$); en cuanto a la prueba de comparación Post Hoc, también fue estadísticamente no significativo. Curiosamente el valor más bajo no significativo se registró en el grupo de comparación IL-1 β (P-CMS+) vs. (P-CMS-) $p = 0,058$.

6. DISCUSION

El objetivo del presente estudio fue analizar, mediante un estudio preclínico, la presencia de mediadores inflamatorios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, CRP, E-Selectina, P-Selectina y sICAM) en la etiopatogenia de la relación entre periodontitis y depresión. Para ello se recogieron muestras de encía y plasma de cuatro grupos de experimentación, realizándose procedimientos para determinar la concentración de estos mediadores presentes y comparándolos entre cada uno de ellos. Estos grupos estuvieron compuestos en periodontitis (P+CMS-), depresión (P-CMS+), periodontitis con depresión (P+CMS+) y control (P-CMS-).

En la comparación de los resultados de mediadores inflamatorios analizados a nivel de encía, se observa que sICAM posee la media de concentración más alta (10,85 ng/mL), correspondiente al grupo (P+CMS+), seguido del grupo (P+CMS-). Por otra parte, el mediador inflamatorio E-selectina, también presentó una media alta en comparación del resto de los demás analitos, seguido de IL-6.

Realizando el test paramétrico de ANOVA, se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de cada analito; sin embargo, IL-1 β presentó un valor de p global (p = 0,120) más bajo entre todos los mediadores inflamatorios. Por tal, se realiza la comparación Post Hoc de Bonferroni, donde se aprecia que tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre sus medias, empero existe una tendencia de apuntar los valores más bajos a la comparación específica de los grupos (P+CMS+) vs (P-CMS-).

En la comparación de los resultados de mediadores inflamatorios analizados a nivel de plasma, se observa que E-Selectina posee la media de concentración más alta (131,80 ng/mL), correspondiente al grupo (P+CMS-), seguido del grupo (P-CMS-). Por otra parte, el mediador inflamatorio sICAM, también presentó una media alta en comparación del resto de los demás analitos, seguido de P-Selectina.

Realizando el test paramétrico de ANOVA, se observa que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de los analitos IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-10 y P-Selectina, presentando este último el valor de p global más bajo (p = 0,001) más bajo entre todos los mediadores inflamatorios. Por tal, se realiza la comparación Post Hoc de Bonferroni, donde se aprecia que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la comparación específica de sus medias de **IL-1 β** (P+CMS+) vs (P-CMS+) con p=0,012; de **MCP-1** (P-CMS+) vs (P-

CMS-) con $p = 0,008$; de **IL-10** (P+CMS+) vs (P-CMS+) con $p = 0,025$; de **P-Selectina** (P+CMS+) vs. (P-CMS-) con $p = 0,001$ y (P-CMS+) vs. (P-CMS-) con $p=0,001$.

En el estudio de Johannsen et al (2007) ha demostrado una asociación positiva entre la depresión y la periodontitis, en los cuales referían que los pacientes con depresión tenían mayor inflamación gingival y mayor profundidad de sondaje que los controles; en comparación con nuestro estudio esta asociación es evidente en los análisis efectuados en muestras de plasma.

En nuestro estudio se refleja que hay la presencia en diferentes concentraciones de mediadores inflamatorios, tanto en muestras de encía como de plasma, por lo cual se evidencia que la periodontitis podría inducir o acelerar otras enfermedades sistémicas crónicas provocando inflamación sistémica, como es el caso de la depresión, liberando citoquinas proinflamatorias (Hashioka et al., 2019), implicando que la periodontitis podría ser un factor de riesgo para un trastorno neuroinflamatorio (Hashioka et al., 2018), aunque aún no se ha demostrado que la depresión sea factor de riesgo de las enfermedades periodontales (Laforgia et al., 2015), en nuestro estudio hemos notado concentraciones elevadas de mediadores inflamatorios que nos hace pensar que ello pueda ser verdadero. Además, es importante mencionar la evidencia de presencia de mediadores inflamatorios comunes y el impacto sistémico que produce (Cota & Costa, 2013) aunque en nuestro estudio hayamos encontrado una diferencia entre las muestras analizadas en plasma y encía.

Analizando los mecanismos biológicos por los cuales la periodontitis puede relacionarse con la depresión (Hashioka et al., 2019), con la presente investigación, se puede dar mayor énfasis a que la neuroinflamación puede ser provocada por el incremento de concentraciones de citoquinas proinflamatorias en el sistema nervioso central asociados con la activación glial inducida por inflamación sistémica asociada con periodontitis.

En el presente estudio, se indujo la formación de periodontitis a través de la inoculación *P. gingivalis*, que son capaces de invadir el epitelio con sus productos, especialmente LPS; pudiendo inducir citoquinas proinflamatorias, como IL-1b, IL-6 y TNF-a, y el ingreso al sistema de circulación provocando una diseminación sistémica, neuroinflamación o deterioro si la inflamación sistémica ya existe (Kohler et al., 2017).

Existe evidencia en revisiones sistemáticas que han concluido que los pacientes diagnosticados con depresión presentan elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias a nivel sérico tales como IL-1, IL-6, TNF-a, así como elevados niveles de CRP (Dowlati et al., 2010). En el presente

estudio, se ha podido validar en forma parcial esa referencia, puesto que se hallaron diferencias estadísticamente significativas en muestras de plasma, más no en encía.

En la literatura, se tiene en cuenta que, en la periodontitis, existe asociación con niveles altos de marcadores de inflamación sistémica, como IL-6, TNF-a y PCR, se cree que podría potenciar la respuesta inflamatoria y oxidativa, dando por consiguiente una vulnerabilidad hacia la depresión (Dumitrescu, 2016). En esta investigación, se pudo encontrar, además, una elevada concentración de otros mediadores inflamatorios como sICAM y E-selectina que favorecerían tal inflamación sistémica.

6.1. Fortalezas y limitaciones del estudio

En cuanto a las fortalezas:

- Los modelos animales siguen siendo una herramienta imprescindible en la investigación periodontal, ya que permite buscar causalidades, además de mejorar los parámetros de estudio con respecto a los estudios en humanos
- Las ratas tipo Wistar representan el modelo más utilizado en investigación periodontal, debido a las similitudes anatómicas y biológicas con el periodonto humano (Zenobia & Hajishengallis, 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
- Los mediadores inflamatorios son fácilmente analizados mediante técnicas de laboratorio que son un gran aporte para la investigación periodontal, aportando mucha evidencia científica.
- Este estudio, al ser *in vivo*, pre clínico, es un paso muy importante hacia la identificación de un factor de riesgo.

En cuanto a las limitaciones:

- Al tratarse de un estudio experimental *in vivo*, puede ser que los resultados obtenidos sobre un modelo animal no sean completamente extrapolables al humano.

- Para el modelo de inducción de la depresión en animales, puede ser que unas ratas sean más resistentes a la depresión que otras lo que podría llevar a un sesgo de selección.
- Al tratarse de un estudio con muestras limitadas, no se pudo hacer un pareamiento de sujetos (ratas) en los diferentes grupos de periodontitis, depresión, periodontitis con depresión y control.

Líneas futuras de investigación

Sugerimos más estudios experimentales para afianzar la relación entre la periodontitis y la depresión. Los estudios derivados de experimentación o intervención, es fundamental para que exista evidencia de causalidad.

7. CONCLUSIONES

- La periodontitis y la depresión presentaron concentraciones de mediadores inflamatorios tanto en encía como en plasma, lo que sugiere vincular un posible mecanismo en la etiopatogénesis entre estas dos patologías.
- Los niveles de mediadores inflamatorios en encía producidos en el grupo (P+CMS+) fueron estadísticamente iguales que los producidos en los grupos (P+CMS-), (P-CMS+) y (P-CMS-).
- Los niveles de mediadores inflamatorios en plasma producidos en el grupo (P+CMS+) fueron estadísticamente mayores que los producidos en los grupos (P+CMS-), (P-CMS+) y (P-CMS-).

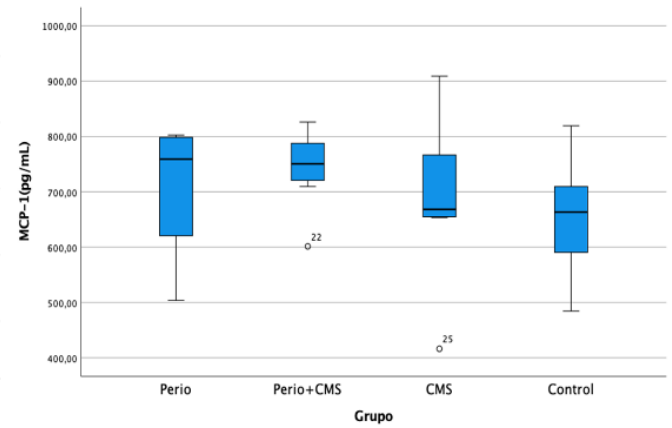
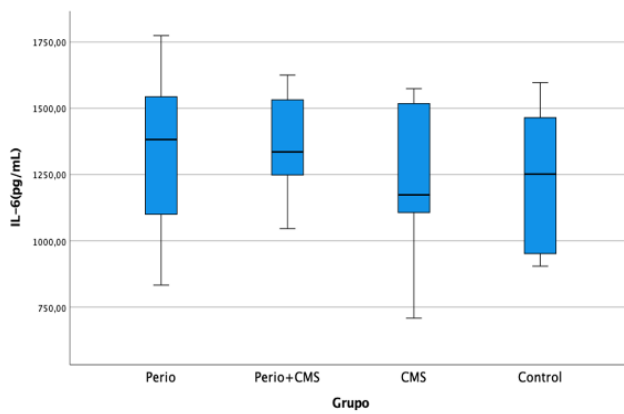
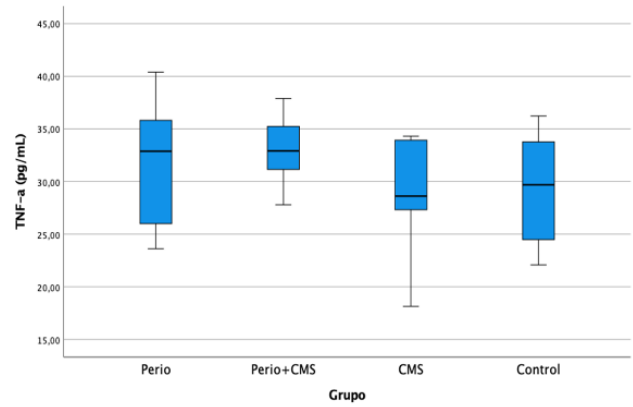
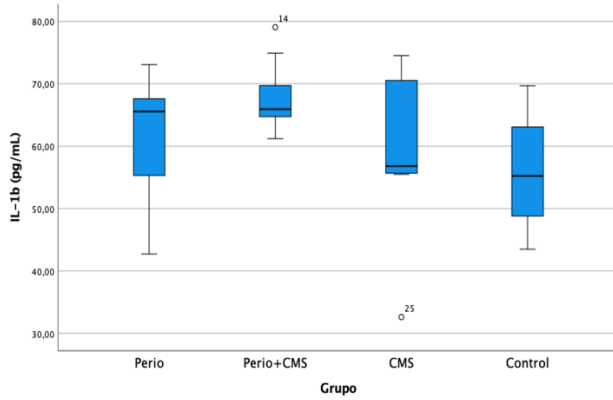
8. ANEXOS

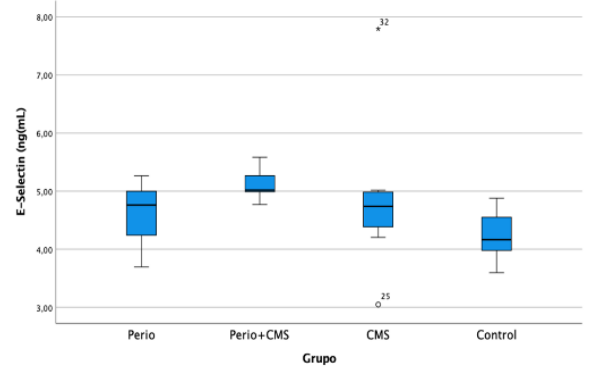
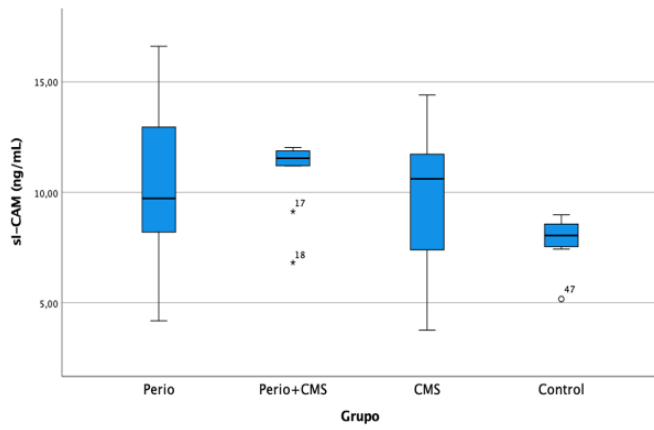
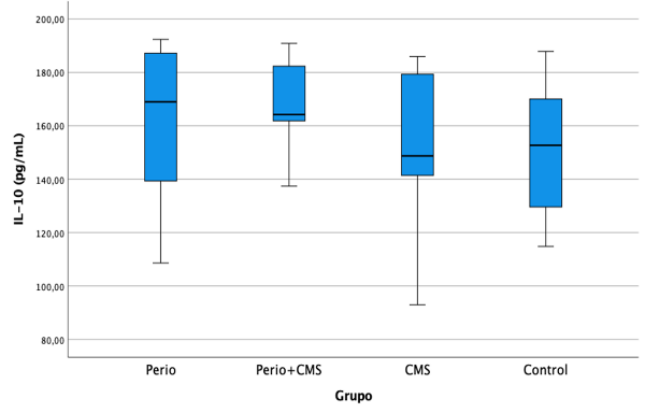
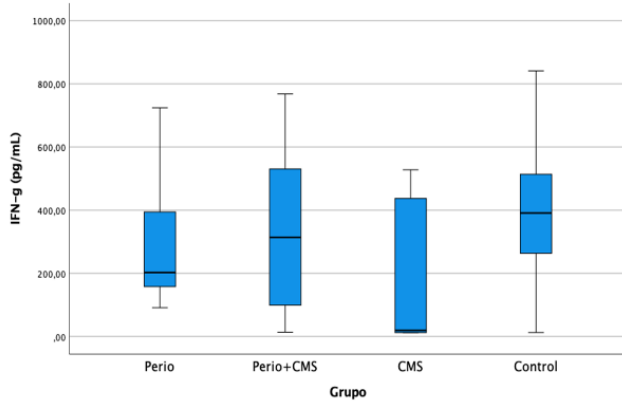
8.1. Peso de encía tomada por grupos de experimentación

	N° rata	Max.	Mand.	Peso Encía Mandibular (gr)	Peso Encía Maxilar (gr)	
Periodontitis	41	x	x	0,0186	0,0100	
	2	x	x	0,0200	0,0098	
	3	x	x	0,0284	0,0123	
	4	x	x	0,0390	0,0126	
	7	x	x	0,0282	0,0108	
	8	x	x	0,0240	0,0158	
	10	x	x	0,0306	0,0102	
	12	x	x	0,0639	0,0107	
	Periodontitis + Depresión	13	x	x	0,0360	0,0101
		14	x	x	0,0223	0,0106
		15	x	x	0,0242	0,0113
		16	x	x	0,0235	0,0096
17		x	x	0,0496	0,0106	
18		x	x	0,0330	0,0100	
19		x	x	0,0223	0,0105	
22		x	x	0,0288	0,0130	
x 24						
20		x	x	0,0372	0,0109	

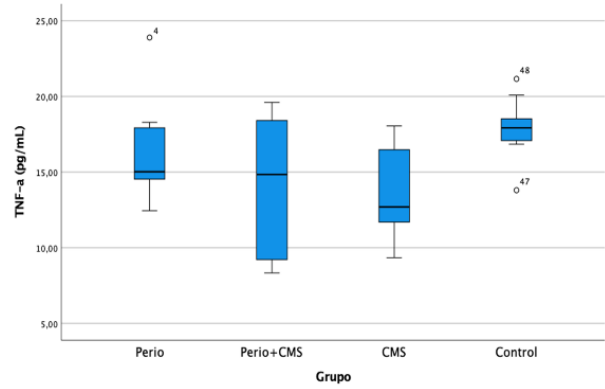
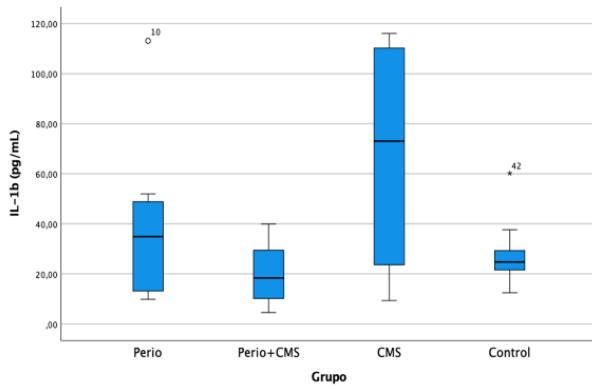
	N° rata	Max.	Mand.	Peso Encía Mandibular (gr)	Peso Encía Maxilar (gr)	
Depresión	25	x	x	0,0400	0,0185	
	27	x	x	0,0198	0,0117	
	28	x	x	0,0498	0,0116	
	29	x	x	0,0278	0,0102	
	30	x	x	0,0394	0,0113	
	31	x	x	0,0391	0,0118	
	32	x	x	0,01163	0,0078	
	33	x	x	0,0485	0,0113	
	Control	42	x	x	0,0205	0,0100
		44	x	x	0,0306	0,0129
45		x	x	0,0349	0,0145	
47		x	x	0,0336	0,0113	
48						
37		x	x	0,0417	0,0112	
38		x	x	0,0298	0,0159	
39		x	x	0,0255	0,0122	

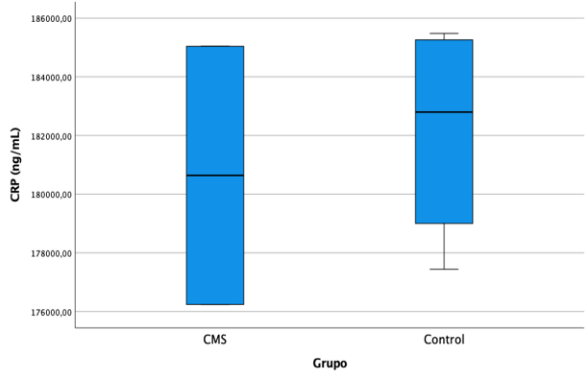
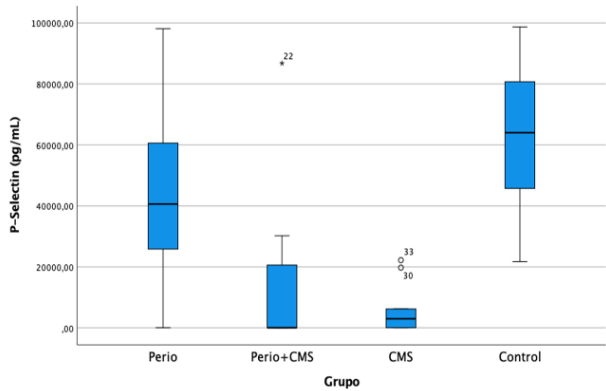
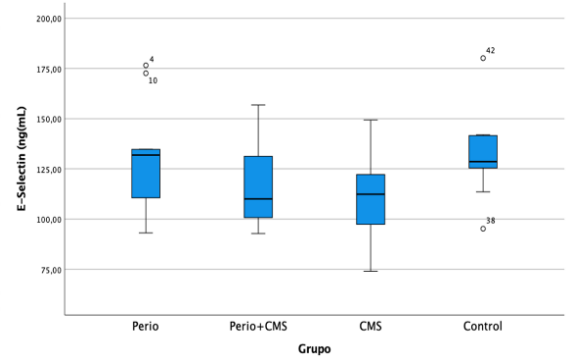
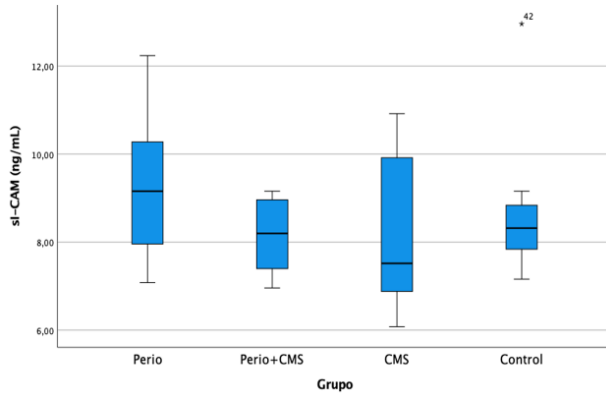
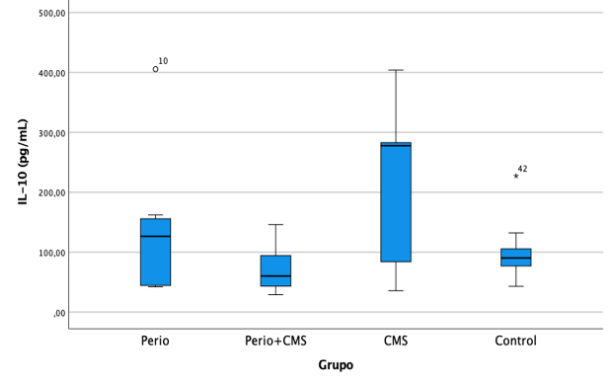
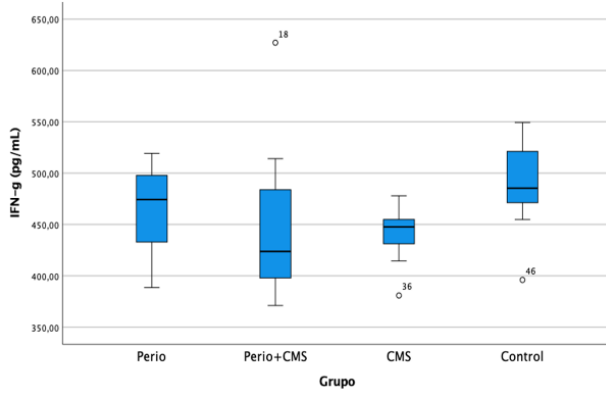
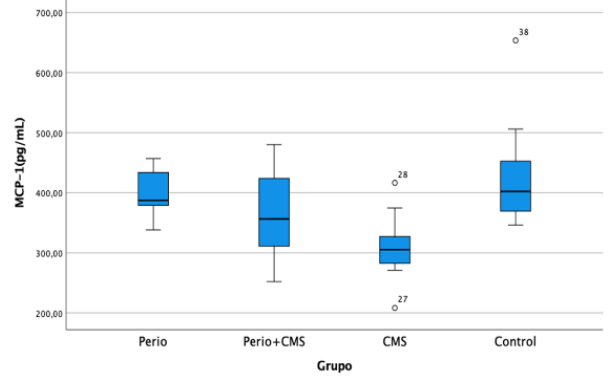
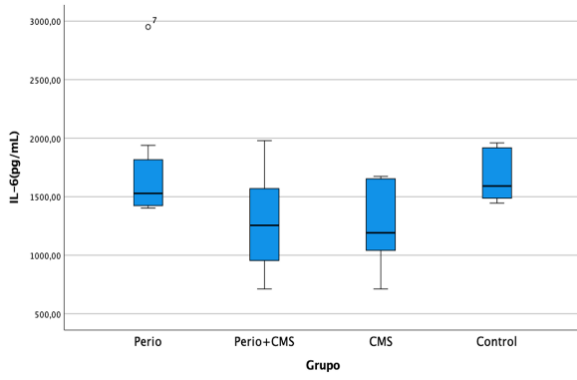
8.2. Boxplot de mediadores inflamatorios en encía





8.3. BoxPlots de mediadores inflamatorios en plasma





9. BIBLIOGRAFIA

- Arauchi, R., Hashioka, S., Tsuchie, K., Miyaoka, T., Tsumori, T., Limoa, E., Azis, I. A., Ohnishi, A., Miura, S., Otsuki, K., Kanayama, M., Izuhara, M., Nagahama, M., Kawano, K., Araki, T., Liaury, K., Abdullah, R. A., Wake, R., Hayashida, M., ... Horiguchi, J. (2018). *Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test*. *May*, 1–9. <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>
- Breivik, T., Gundersen, Y., Murison, R., Turner, J. D., Muller, C. P., Gjermo, P., & Opstad, K. (2015). Maternal Deprivation of Lewis Rat Pups Increases the Severity of Experimental Periodontitis in Adulthood. *The Open Dentistry Journal*, 9(1), 65–78. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010065>
- Buduneli, N., & Kinane, D. F. (2011). Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 85–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x>
- Carasol, M., Llodra, J. C., Fernández-Meseguer, A., Bravo, M., García-Margallo, M. T., Calvo-Bonacho, E., Sanz, M., & 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>
- Carolina, N., Offenbacher, S., Carolina, N., & Hill, C. (1996). *Periodontal Diseases: Pathogenesis*. 1(1), 821–878.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). *A new classification scheme for periodontal and peri - implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification*. 45(March), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Dyke, T. E. Van, Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P.,

- Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., & Meyle, J. (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*. 45(December 2017), 68–77. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12940>
- Coelho, J. M. F., Miranda, S. S., da Cruz, S. S., dos Santos, D. N., Trindade, S. C., Cerqueira, E. de M. M., Passos-Soares, J. de S., Costa, M. da C. N., Figueiredo, A. C. M. G., Hintz, A. M., de Almeida, A. R. B., Pereira, M. N., de Souza, N. M., Barreto, M. L., & Gomes-Filho, I. S. (2020). Common mental disorder is associated with periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 55(2), 221–228. <https://doi.org/10.1111/jre.12705>
- Cota, M., & Costa, F. O. (2013). *and Gestational Diabetes Mellitus : September*, 1257–1265. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120350>
- Cunha, F. A., Cota, L. O. M., Cortelli, S. C., Miranda, T. B., Neves, F. S., Cortelli, J. R., & Costa, F. O. (2019). Periodontal condition and levels of bacteria associated with periodontitis in individuals with bipolar affective disorders: A case-control study. *Journal of Periodontal Research*, 54(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/jre.12605>
- 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. *BPS*, 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*. 7(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00347>
- Haffajee, S. S., Cugini, A. D., Smith, C., Jr, K., & Microbial, R. L. (1998). *Microbial complexes in subgingival plaque*. 134–144.
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones , pathobionts , and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, G., Lamont, R. J., & Graves, D. T. (2015) The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Taylor & Francis*. January 2015, 37–41. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.990806>

- Haro, J. M., Palacín, C., Vilagut, G., Martínez, M., Bernal, M., Alonso, G. E. J., Autonell, J., Bernal, M., Codony, M., Dolz, M., Palacín, C., Ramos, J., Reneses, B., Romera, B., Usall, J., & Vilagut, G. (2006). Prevalence of mental disorders and associated factors: results of the ESEMeD-Spain study. *Medicina Clínica*, *126*(12), 445–451. <https://doi.org/10.1157/13086324>
- Hashioka, S., Inoue, K., Hayashida, M., Wake, R., Oh-Nishi, A., & Miyaoka, T. (2018). Implications of systemic inflammation and periodontitis for major depression. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(JUL), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00483>
- Hashioka, S., Inoue, K., Miyaoka, T., Hayashida, M., Wake, R., Oh-Nishi, A., & Inagaki, M. (2019). The possible causal link of periodontitis to neuropsychiatric disorders: More than psychosocial mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153723>
- Holtfreter, B., Kocher, T., Ko, J., & Kocher, T. (2010). *Periodontal health in Europe : future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services – position paper 1*. *14*(8), 4–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2010.00620.x>
- Howren, B. M., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. *American Psychosomatic Society*, *186*(II), 171–186. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>
- Hsu, C.-C., Hsu, Y.-C., Chen, H.-J., Lin, C.-C., Chang, K.-S., Lee, C.-Y., Chong, L.-W., & Kao, C.-H. (2015). Association of Periodontitis and Subsequent Depression. *Medicine*, *94*(51), 1–6. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002347>
- Huang, Y. K., Wang, Y. H., & Chang, Y. C. (2020). Chronic periodontitis is associated with the risk of bipolar disorder: A population-based cohort study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph17103466>
- Hwang, S. H., & Park, S. G. (2018). The relationship between depression and periodontal diseases. *Community Dental Health*, *35*(1), 23–29. https://doi.org/10.1922/CDH_4150Hwang07

- Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P., Demirel, K., Sanctis, M. De, Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N. C., Hughes, F. J., Matthews, D., McGuire, M. K., Mills, M. P., & Preshaw, P. M. (2018). *Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions : Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions*. *45*(February), 219–229. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12951>
- 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., Soder, B., & Asberg, 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*, 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., & 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>
- Kohler, C., Freitas, T., Maes M, de A. N., Liu, C., Fernandes, B. S., Solmi, M., Veronese, N., Raison, C. L., Miller, B. J., Lanctot, K. L., & Carvalho, A. F. (2017). Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression : a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *135*(5), 373–387. <https://doi.org/10.1111/acps.12698>
- Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* *2000*, *14*, 9–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
- Kornman, K. S. (2008). Mapping the Pathogenesis of Periodontitis : A New Look. *79*(8). <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>
- Kuraji, R., Fujita, M., Ito, H., Hashimoto, S., & Numabe, Y. (2017). Effects of experimental periodontitis on the metabolic system in rats with diet - induced obesity (DIO): an analysis of serum biochemical parameters. *Odontology*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0322-5>
- Laforgia, A., Corsalini, M., Stefanachi, G., Pettini, F., & Di Venere, D. (2015). Assessment of

- psychopatologic traits in a group of patients with adult chronic periodontitis: Study on 108 cases and analysis of compliance during and after periodontal treatment. *International Journal of Medical Sciences*, 12(10), 832–839. <https://doi.org/10.7150/ijms.12317>
- 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. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.03009.x>
- Liu, F., Wen, Y. F., Zhou, Y., Lei, G., Guo, Q. Y., & Dang, Y. H. (2018). A meta-analysis of emotional disorders as possible risk factors for chronic periodontitis. *Medicine (United States)*, 97(28). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011434>
- Lopresti, A. L., Maker, G. L., Hood, S. D., & Drummond, P. D. (2014). Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry A review of peripheral biomarkers in major depression : The potential of in fl ammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 48, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.09.017>
- Martín-Hernández, D., Caso, J. R., Bris, Á. G., Maus, S. R., José, L. M., García-Bueno, B., Macdowell, K. S., Alou, L., Gómez-Lus, M. L., & Leza, J. C. (2015). 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>
- Martínez, M., Martín-Hernández, D., Virto, L., Macdowell, K. S., González-Bris, A., Montero, E., Marín, M. J., Ambrosio, N., Herrera, D., Leza, J. C., Sanz, M., García-Bueno, B., Figuro, E., García-bueno, M. S. B., & Figuro, E. (2021). Periodontal diseases and depression : A pre-clinical in vivo study. *Journal of Clinical Periodontology*, 00(January), 1–25. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13420>
- Martínez, M., Montero, E., Carasol, M., LLodrá, J. C., Sanz, M., Herrera, D., Calvo-Bonacho, E., Fernández-Meseguer, A., & Figuro, E. (2021). Association between caries and periodontal diseases in a sample of employed adults in Spain: a cross-sectional study. *Clinical Oral Investigations*, 25(6), 3957–3966. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03726-2>
- Muniz, F. W. M. G., Melo, I. M., Rösing, C. K., de Andrade, G. M., Martins, R. S., Moreira, M.

- M. S. M., & Carvalho, R. de S. (2018). Use of antidepressive agents as a possibility in the management of periodontal diseases: A systematic review of experimental studies. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/jicd.12291>
- Nascimento, G., Gastal, M. T., Leite, F. R., Quevedo, K., Peres, M., Barros, F. C., & Dermarco, F. F. (2019). Key words: major depression, depressive symptoms, periodontal diseases, cohort studies. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(31–39), 0–3. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13039>
- Nayak, S. U., Singh, R., & Kota, K. P. (2016). Periodontal health among non-hospitalized chronic psychiatric patients in Mangaluru City-India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(8), ZC40–ZC43. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/19501.8248>
- Oliveira, L. F. F., Salvador, S. L., Pharm, D., Silva, P. H. F., Furlaneto, F. A. C., & Figueiredo, L. (2016). Benefits of Bifidobacterium Animalis Subsp Lactis Probiotic in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology* 1–20. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160217>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V, Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., & Loos, B. G. (2018a). *Periodontitis : Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions*. 45(March), 162–170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V, Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., & Loos, B. G. (2018b). *Periodontitis : Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions*. 45(December 2017), 162–170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
- 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>
- 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- Fruhauf, 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, 1219–1225. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00855.x>
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., Ellwood, R., Rodrigo, A., Herrera, D., & Mark, C. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases . *Consensus report of group 1 of the Joint EFP / ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease*. 44. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12682>
- Sanz, M., Ceriello, A., Buyschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., Herrera, D., Jepsen, S., & Lione, L. (2019). 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*. *January*, 138–149. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12808>
- Sanz, M., Kornman, K., & working group 3 of the 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 periodontology*, 84(4 Suppl), S164–S169. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340016>
- Solis, A. C. de O., Marques, A. H., Dominguez, W. V., Prado, E. B. de A., Pannuti, C. M., Lotufo, R. F. M., & Lotufo-Neto, F. (2016). Evaluation of periodontitis in hospital outpatients with major depressive disorder. A focus on gingival and circulating cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 53, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.014>
- Valkanova, V., Ebmeier, K. P., & Allan, C. L. (2013). CRP , IL-6 and depression : A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Journal of Affective Disorders*, 150(3), 736–744. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.06.004>
- Verma, D., Kumar, P., Ashok, G., & Dubey, K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>

- Vignoletti, F., & Abrahamsson, I. (2012). Quality of reporting of experimental research in implant dentistry. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation. *Journal of clinical periodontology*, *39 Suppl 12*, 6–27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01830.x>
- Virto, L., Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, P., González, J., Esquifino, A. I., & Sanz, M. (2018). Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *Journal of periodontology*, *89(2)*, 176–185. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170355>
- Warren, K. R., Postolache, T. T., Groer, M. E., Pinjari, O., Kelly, D. L., & Reynolds, M. A. (2014). 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. (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>
- Young, J. J., Bruno, D., & Pomara, N. (2014). A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, *169*, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.07.032>
- Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2015). Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*, *6(3)*, 236–243. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.999567>
- Zheng, D. X., Kang, X. N., Wang, Y. X., Huang, Y. N., Pang, C. F., Chen, Y. X., Kuang, Z. L., & Peng, Y. (2021). Periodontal disease and emotional disorders: A meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, *48(2)*, 180–204. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13395>