

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Especialidades Clínicas Odontológicas



Puesta a punto del modelo de inducción de periodontitis mediante lavados orales: estudio preclínico *in vivo*

Trabajo Fin de Máster en Ciencias Odontológicas 2021-2022

Juan Ernesto Del Rosal Bethencourt

Tutora: Elena Figuro Ruiz

INDICE

1.	
1.1. Agradecimientos	10
1.2. Resumen y palabras clave.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	12
2.1. Periodontitis.....	12
2.1.1. Prevalencia	13
2.1.2. Etiopatogenia.....	13
2.1.3. Periodontitis y su relación con enfermedades sistémicas.....	15
2.2. Periodontitis como factor de riesgo de enfermedades sistémicas.....	16
2.3. Modelos de inducción de periodontitis en ratas	17
2.3.1. Modelo de ligaduras	18
2.3.2. Modelo de lavados orales	19
2.4. Variables clínicas periodontales y valoración de la pérdida ósea	20
2.4.1. Registro de las variables clínicas	20
2.4.2. Valoración de la pérdida ósea: medidas morfométricas vs micro-CT.....	20
Medidas morfométricas	20
Micro-CT.....	21
2.5. Justificación del estudio	22
3. OBJETIVO	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. HIPÓTESIS	24
4.1. Hipótesis general	24
4.2. Hipótesis específicas	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
5.1. Diseño del estudio	25
5.1.1. Alojamiento, crianza y cuidado de los animales	25
5.1.2. Grupos de estudio.....	26
5.2. Modelo de inducción de la periodontitis	26
5.3. Análisis de las variables clínicas periodontales	27
5.4. Análisis de la pérdida ósea.....	28

5.4.1. Medidas morfométricas	29
5.4.2. Micro-CT.....	30
5.5. Análisis de los datos.....	31
5.5.1. Cálculo del tamaño muestral	31
5.5.2. Aleatorización	31
5.5.3. Ocultación de la asignación.....	31
5.5.4. Enmascaramiento	32
5.6. Análisis estadístico.....	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1. Resultados de la muestra	33
6.2. Variables periodontales	33
6.2.1. Variables clínicas periodontales.....	33
6.2.2. Análisis de la pérdida ósea	38
7. DISCUSIÓN.....	40
7.1. Relevancia clínica del estudio.....	44
7.2. Limitaciones del estudio.....	44
7.3. Futuras líneas de investigación	45
7.4. Papel del alumno en la presente la investigación	45
8. CONCLUSIONES.....	46
9. BIBLIOGRAFÍA	47
10. ANEXOS	53
10.1. Aprobación del comité de ética	53



1.1. Agradecimientos

Especiales agradecimientos a mi tutora, Elena Figuro, por su confianza y la gran oportunidad de participar en este proyecto. Ha sido una experiencia muy gratificadora en la que he podido aprender de primera mano en que se basa la investigación animal.

Gracias a María por enseñarme tanto durante este año y por ofrecerme tu ayuda siempre que la he necesitado. Espero poder seguir tus pasos en un futuro. Gracias a Jaime, Leire, Juan y Marina por vuestra ayuda, explicaciones y consejos en el desarrollo de este proyecto.

Por último, gracias a mis padres y a mi novia Elena por acompañarme de la mano durante todo este camino, espero devolveros con creces la paciencia y el cariño que yo he recibido.

1.2. Resumen y palabras clave

Objetivos: se pretende comparar la pérdida ósea y las variables clínicas periodontales obtenidas con un protocolo de inducción de periodontitis mediante lavados orales modificado en un tiempo variable de 4 a 12 semanas.

Material y métodos: estudio preclínico *in vivo* en el que se incluyeron ratas de la cepa *Wistar:Han* a las que se les indujo periodontitis mediante lavados orales con patógenos periodontales (*Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*) durante un tiempo variable de 4, 8 y 12 semanas. Se obtuvieron cuatro grupos: periodontitis 4 semanas (P+4s); periodontitis 8 semanas (P+8s); periodontitis 12 semanas (P+12s); y un grupo control (P-), que a su vez se dividió en otros tres subgrupos. Se midieron variables clínicas periodontales y niveles óseos alveolares mediante medidas morfométricas y micro-CT. Se aplicaron test estadísticos de ANOVA.

Resultados: De los 32 animales inicialmente incluidos en el estudio, tan sólo 28 animales completaron el experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en cuanto a pérdida ósea y a variables clínicas periodontales a excepción de la variable cambio del índice de placa (IP). En cuanto a las variables clínicas periodontales (IP, índice gingival [IG], sangrado al sondaje [BoP, por sus siglas en inglés] y profundidad de sondaje [PS]) el grupo P+12s muestra los mayores niveles de IG y PS, mientras que el grupo P+8s muestra los mayores niveles de IP y BoP. Las medidas morfométricas muestran que la distancia LAC-cresta ósea en su punto más apical y a nivel de la furca es mayor en el grupo P-8s. En contraposición, el micro-CT muestra que es el grupo P+8s el que mayor pérdida ósea presenta.

Conclusiones: Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, se sugiere que el tiempo de 8 semanas puede ser adecuado a la hora de realizar un protocolo de lavados orales.

Palabras clave: ratas, micro-CT, lavados orales, periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, pérdida ósea.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Periodontitis

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan a los tejidos de soporte periodontal, como son la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. Estas enfermedades se pueden clasificar en función de los tejidos que afectan: (1) gingivitis, forma leve en la que la lesión se encuentra localizada únicamente en la encía sin destruir los tejidos periodontales; y (2) periodontitis, forma grave caracterizada por la pérdida de tejido conectivo y hueso, la formación de bolsas periodontales y eventualmente la pérdida del diente (Caton y cols., 2018).

La periodontitis se puede definir según el *Taller Mundial para la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias* de 2017, como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a la disbiosis de la microbiota oral y caracterizada por la destrucción progresiva del periodonto resultando en la pérdida del diente. Todo ello se manifiesta a través de la pérdida de inserción clínica (PIC) y de hueso alveolar, la formación de bolsas periodontales y el sangrado gingival (Papapanou y cols., 2018).

En esta clasificación, se define periodontitis como la presencia de PIC interproximal detectable en 2 o más dientes no adyacentes y/o PIC vestibular ≥ 3 mm, con una bolsa ≥ 3 mm, detectable en al menos 2 dientes. Además, esta PIC no se debe a: 1) recesión gingival de origen traumático; 2) caries que se extienda hacia el área cervical; 3) pérdida de inserción en distal del segundo molar asociada con malposición o extracción del tercer molar; 4) lesión endodóntica; 5) fractura radicular vertical (Papapanou y cols., 2018; Tonetti y cols., 2018).

De acuerdo con lo propuesto en la última clasificación, la periodontitis se caracteriza mediante estadios (I, II, III, IV) y grados (A, B y C). El estadio describe la severidad de la enfermedad en su presentación inicial y la complejidad prevista en el tratamiento. Adicionalmente, se registran la extensión y distribución de la enfermedad (generalizado, localizado o patrón incisivo-molar). 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 (Tonetti y cols., 2018).

2.1.1. Prevalencia

La periodontitis es considerada un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia, afectando a más del 50% de la población adulta y aumentando de manera proporcional con la edad (Petersen y Ogawa, 2012; Billings y cols., 2018).

La periodontitis es una de las principales causas de pérdida dentaria, afectando negativamente a la función masticatoria y a la estética, deteriorando la calidad de vida y teniendo un impacto negativo en la salud general del paciente (Romandini y cols., 2020).

En base al estudio del ‘*global burden of diseases*’ (GBD) Bernabe y cols. (2020) estimaron que la periodontitis es la sexta condición más prevalente en el ser humano, encontrando además una prevalencia de periodontitis severa del 9,8% (Bernabe y cols., 2020).

En la población española, se ha realizado otro estudio transversal en el que se observó que el 38% de la población española adulta trabajadora presentaba periodontitis (Carasol y cols., 2016).

En un estudio transversal en Noruega, se determinó que la prevalencia y severidad de la periodontitis aumentaba con la edad, obteniendo que la prevalencia combinada de periodontitis estadio III y IV fue del 17,6% (Stødle y cols., 2021).

En otro estudio realizado por Eke y cols. (2018), basado en la cohorte del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) entre los años 2009 y 2014, se estudió la prevalencia de periodontitis severa (Page y Eke (2007)), siendo del 4,1% en la cohorte de entre 30-44 años; de 10,4% en la corte de 45-64 años y del 9% en individuos de más de 65 años (Eke y cols., 2018).

2.1.2. Etiopatogenia

Se conoce como microbiota oral a la comunidad ecológica de organismos comensales simbióticos y patogénicos que se encuentran en la cavidad oral, existiendo más de 700 especies diferentes. Estas comunidades microbianas se agrupan en ‘*clusters*’ o complejos organizados en forma de biofilm bacteriano (Socransky y cols., 1998).

Löe y cols. (1965) demostraron que la acumulación de biofilm dental desencadenaba un estado de inflamación gingival, siendo esta el factor etiológico de la gingivitis (Löe y cols., 1965). Posteriormente, Lindhe y cols. (1973) demostraron en un modelo *in vivo* en

perros de la raza Beagle que la acumulación de biofilm dental por un largo periodo de tiempo provocaba destrucción del aparato de inserción periodontal (Lindhe y cols., 1973).

La acumulación de biofilm dental es necesario para la aparición y desarrollo de la periodontitis, por lo que las principales estrategias empleadas para el tratamiento de esta patología se han centrado en eliminar/reducir la carga bacteriana a nivel de la bolsa periodontal (Donos y cols., 2020). Sin embargo, no todas las personas con grandes acumulaciones de biofilm dental desarrollan la enfermedad, lo que se ha visto en varios estudios del curso natural de la enfermedad (Løe y cols., 1986; Ramseier y cols., 2017), siendo la acumulación de biofilm necesaria pero no suficiente para la aparición de la enfermedad.

En general, se cree que el huésped y la microbiota comensal coexisten en una relación de simbiosis y que la composición bacteriana del biofilm subgingival se adapta en función de las condiciones dinámicas del entorno. Determinados patógenos periodontales (algunos de ellos considerados como “patógenos clave”) como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, desencadenan un desequilibrio entre la flora normal y el sistema inmune del paciente conocido como disbiosis, favoreciendo el sobrecrecimiento de los componentes más virulentos del biofilm (Socransky y cols., 2002; Hajishengallis y cols., 2012). Además, se ha demostrado que esta respuesta inmuno-inflamatoria puede estar modulada por factores de riesgo tanto genéticos como ambientales (Kornman y cols., 2008; Bouchard y cols., 2017) (Figura 1).

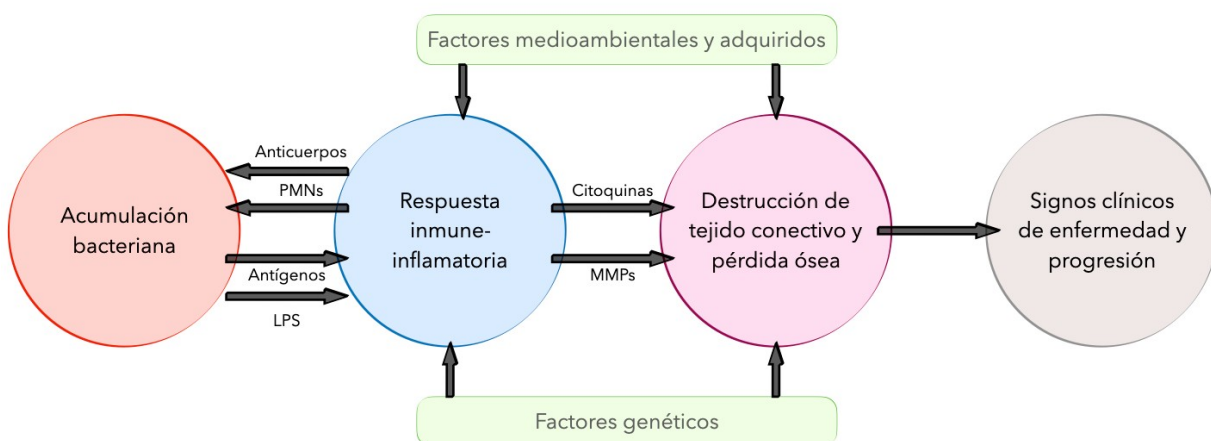


Figura 1: Etiopatogenia de la periodontitis: modelo propuesto por Kornman y cols. (2008)

Los procesos y mecanismos por los cuales la gingivitis progresa a periodontitis siguen sin estar claros. Se considera que la gingivitis es una respuesta inflamatoria no específica a la microbiota subgingival, con predominancia de leucocitos polimorfonucleares (PMN, por sus siglas en inglés), macrófagos y linfocitos T. Por el contrario, la periodontitis se caracteriza por una respuesta inflamatoria específica frente al biofilm subgingival, en el que existe una predominancia de linfocitos B, células plasmáticas, anticuerpos y la expresión de interleuquinas (IL) y factor de necrosis tumoral alfa [TNF-alfa], (Berglundh y cols., 2011).

La producción de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF-alfa) y prostaglandina E2 (PGE2) estimulan la síntesis y liberación de metaloproteinasas (MMPs, por sus siglas en inglés) por los fibroblastos, responsables de la destrucción de la matriz de colágeno extracelular dando lugar a la pérdida de tejido conectivo y reabsorción ósea. Este proceso se da como resultado a la formación de un epitelio largo de unión y la formación de una bolsa periodontal (Kornman y cols, 2008; Bosshardt y cols., 2020).

2.1.3. Periodontitis y su relación con enfermedades sistémicas

Steven Offenbacher definió el término de ‘medicina periodontal’ en el Workshop Internacional de 1996 como la disciplina encargada de validar la relación entre las enfermedades periodontales y las diversas enfermedades sistémicas, así como su plausibilidad biológica en poblaciones humanas y en modelos animales (Offenbacher y cols., 1996).

A partir de ese momento se han realizado numerosos estudios analizando dicha relación, obteniéndose asociación entre la periodontitis y diversas enfermedades/estados sistémicos/os como son la diabetes (Preshaw y cols., 2012), las enfermedades cardiovasculares (Sanz y cols., 2020) y el embarazo (Figuro y cols., 2020), entre otras. Se han descrito diferentes mecanismos para explicar estas interacciones (Offenbacher y cols., 1996):

Primera vía: Se pueden producir bacteriemias (presencia de bacterias en sangre) por el paso de bacterias subgingivales a la circulación sistémica a través del epitelio ulcerado de la bolsa periodontal, pudiendo causar infecciones a distancia en otras partes del organismo. Se ha demostrado que estas bacteriemias se pueden desencadenar por la progresión de la enfermedad o por un trauma mecánico durante el tratamiento periodontal.

Diversos autores han investigado esta primera vía. Se ha encontrado evidencia de que bacterias periodontopatógenas como *Fusobacterium nucleatum* han alcanzado el líquido amniótico y la placenta (Hill y cols., 1998). *Porphyromonas gingivalis* y determinados factores de virulencia como las gingipaínas, se han encontrado en placas de ateroma (Kozarov y cols., 2005) y en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Dominy y cols., 2019). También se ha demostrado la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en placas de ateroma (Figuro y cols., 2014).

Segunda vía: La diseminación de mediadores inflamatorios y productos bacterianos a la circulación sistémica a través de la pared ulcerada de las bolsas periodontales, desencadena una respuesta inmuno-inflamatoria a nivel sistémico. Se ha demostrado que la periodontitis aumenta los niveles sistémicos de IL-6, TNF-alfa y proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), todos ellos asociados con un estado de inflamación sistémico (Paraskevas y cols., 2008; Kinane y cols., 2017).

Se ha demostrado que este estado de inflamación sistémica favorece el desarrollo de determinadas patologías cardiovasculares, a través de la activación del endotelio vascular, induciendo la formación de placas de ateroma (Velsko y cols., 2015). Del mismo modo la inflamación sistémica desencadenada por la periodontitis juega un papel en la aparición de diabetes a través de los productos finales de glicación (AGEs por sus siglas en inglés) (Preshaw y cols., 2012). Además, existe evidencia de que el tratamiento periodontal mejora y disminuye los niveles de inflamación sistémica (de Souza y cols., 2017).

Tercera vía: Es plausible también una colonización e infección del tracto respiratorio inferior en individuos con factores predisponentes, principalmente por aspiración directa. De esta forma los patógenos periodontales podrían llegar al pulmón y desencadenar un proceso inflamatorio a este nivel (Imai y cols., 2021).

1.2. Periodontitis como factor de riesgo de enfermedades sistémicas

Un factor de riesgo es una característica, aspecto de la conducta o una exposición relacionada con una enfermedad en particular. Su exposición hace que aumente la probabilidad de padecer la enfermedad y su eliminación reduce la posibilidad de adquirirla. Debe haber una relación biológicamente plausible, y debe demostrarse que precede al desarrollo de la enfermedad en estudios prospectivos (Beck y cols., 1994; Van Dyke y cols., 2005).

Bradford-Hill en 1965 propuso un modelo de causalidad para la búsqueda de relaciones causales para enfermedades. Este propone que para relacionar o comprobar la asociación de un factor con una enfermedad es necesario cumplir diversos criterios (Hill, 1965).

Uno de los criterios es **la plausibilidad biológica**, que trata de obtener una explicación científica y lógica de los mecanismos de relación entre la causa y la enfermedad. Para ello se plantean diferentes estudios de experimentación, entre los que encontramos los estudios preclínicos (*in vitro*, o *in vivo*), que buscan aportar consistencia y fuerza a la asociación.

Además, de acuerdo con lo propuesto por Beck y cols. (1994) para comprobar la asociación entre periodontitis y cualquier condición sistémica necesitamos establecer: (1) la asociación a través de estudios epidemiológicos, primero transversales y luego prospectivos; (2) la plausibilidad biológica, estudiada en modelos experimentales *in vivo* o *in vitro* y (3) la asociación en estudios de intervención (ensayos clínicos aleatorizados, [RCTs por sus siglas en inglés]) donde el tratamiento de una condición mejore el estado de la otra (Beck y cols., 1994).

1.3. Modelos de inducción de periodontitis en ratas

El estudio de la asociación entre la periodontitis y las diversas enfermedades sistémicas requiere de la inducción de ambas patologías en el modelo animal. Las ratas son un buen modelo experimental para el estudio de la relación entre ambas patologías debido a que la anatomía periodontal en la región de los molares es muy similar a la del hombre (Virto y cols., 2018). Además, cuentan con un manejo más sencillo frente a otros modelos experimentales que emplean roedores más pequeños (Oz y Puleo, 2011).

El modelo con ratas presenta el inconveniente de que son resistentes a desarrollar periodontitis en condiciones naturales (Graves y cols., 2008). Sin embargo, la inducción de periodontitis se puede desarrollar a través de diferentes modelos: (1) inoculación de bacterias específicas en el tejido gingival, (2) a través de lavados orales con bacterias periodontopatógenas o (3) utilizando ligaduras en los molares (Polak y cols., 2009; Graves y cols., 2012).

1.3.1. Modelo de ligaduras

El modelo de ligaduras es, sin lugar a duda, el modelo más empleado para realizar la inducción de periodontitis en modelos animales (de Molon y cols., 2013; Pirih y cols., 2015; Wong y cols., 2017).

Este modelo ha sido empleado en experimentos clásicos como el realizado por Lindhe y cols. (1973) para demostrar la relación entre la acumulación de biofilm dental y el desarrollo de periodontitis, empleando un modelo en perros Beagle (Lindhe y cols., 1973).

Para la colocación de ligaduras se pueden utilizar distintos materiales como la seda, el nylon o el algodón. Las ligaduras se sitúan a nivel del tercio cervical y/o a nivel subgingival de los primeros y/o segundos molares con el objetivo de favorecer la acumulación de biofilm y por tanto inducir la formación de periodontitis (de Molon y cols., 2018).

Más concretamente en el modelo murino existen diferentes estrategias para la colocación de las ligaduras, colocándolas alrededor de un único molar maxilar y/o mandibular o colocándose en forma de 8 entre los primeros y segundos molares maxilares y/o mandibulares (Figura 2).

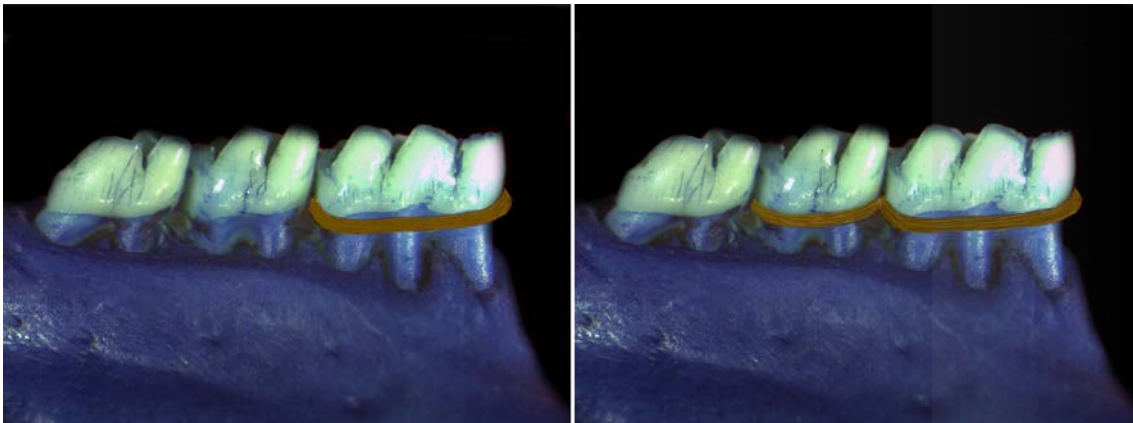


Figura 2: Colocación de ligaduras. a) alrededor de un único molar; b) en forma de 8 alrededor de dos molares.

De acuerdo con diferentes autores, la pérdida ósea se puede observar a los 7-15 días después de la colocación de las ligaduras, manifestada a nivel histológico como destrucción de tejido conectivo y hueso. No obstante, cabe destacar que la colocación de ligaduras se asocia también con la inducción de trauma mecánico a nivel tisular (Kuraji y cols., 2017; de Molon y cols., 2018).

En una investigación preclínica, de Molon y cols. (2018) estudiaron la secuencia temporal de los eventos histológicos que tienen lugar durante la inducción de periodontitis mediante ligaduras. Durante el primer día de colocación de las ligaduras, los autores observaron reabsorción ósea, manifestada como un incremento de la distancia entre la furca y la cresta alveolar, pudiéndose asociar al trauma mecánico. A partir del quinto día, y de forma continuada hasta el día 14, se observó pérdida ósea radiográfica (de Molon y cols., 2018).

A partir del día 14 no se observaron cambios en los niveles óseos radiográficos, por lo que los autores concluyeron que la inducción de periodontitis con el modelo por ligaduras se caracteriza por dos fases diferenciadas:

- (1) Fase aguda (0-14 días) caracterizada por una destrucción progresiva del aparato de inserción periodontal.
- (2) Fase crónica (15-21 días) en la que la inflamación se cronifica y la destrucción periodontal cesa. Esto se puede explicar debido a que, con la reabsorción ósea, los tejidos periodontales migran apicalmente y se restablecen las dimensiones de los tejidos surpracrestales, disminuyendo por tanto la severidad de la enfermedad con el tiempo (de Molon y cols., 2018).

Otros autores han empleado modelos combinados para inducir periodontitis, realizando osteotomía a nivel de la cresta junto con la colocación de ligaduras con el objetivo de conseguir una periodontitis severa de forma reproducible (Gao y cols., 2022).

1.3.2. Modelo de lavados orales

La inducción de periodontitis en el modelo de lavados orales se consigue mediante la administración repetida en el tiempo de patógenos periodontales como *F. nucleatum* y/o *P. gingivalis* en solución por vía oral. Dentro de este modelo existen diferentes factores a tener en cuenta, como son la viscosidad de la solución de los lavados, la patogenicidad y virulencia de las cepas introducidas y así como la consistencia de la alimentación de los animales.

El modelo de inducción de periodontitis mediante lavados orales ha demostrado tener resultados positivos en diferentes estudios previos (Polak y cols., 2009; Virto y cols., 2018; Martínez y cols., 2021), aunque en comparativa, el modelo de ligaduras induce periodontitis de forma más rápida y severa.

Este modelo presenta la ventaja de que no genera un trauma en los tejidos periodontales y pretende acelerar el proceso natural de la enfermedad. Sin embargo, el modelo mediante lavados orales no siempre es capaz de inducir una periodontitis severa, clave para ampliar los efectos a nivel sistémico y poder valorar de forma más eficaz la relación de la periodontitis con las diversas enfermedades sistémicas (Martínez y cols., 2021).

1.4. Variables clínicas periodontales y valoración de la pérdida ósea

1.4.1. Registro de las variables clínicas

Como se ha comentado, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria que afecta a los tejidos de inserción periodontales. En cuanto a los signos típicos se encuentra el enrojecimiento de los tejidos, edema, sangrado al sondaje, movilidad, formación de bolsas periodontales, reabsorción ósea y pérdida de inserción clínica. En el modelo murino, las variables clínicas más registradas son la presencia de inflamación visual (registrado a través del IG), la presencia de inflamación a nivel subgingival (registrado a través del BoP), la presencia de biofilm dental (registrado a través del IP) y la PS, medida a través de una sonda periodontal introducida en el surco gingival.

1.4.2. Valoración de la pérdida ósea: medidas morfométricas vs micro-CT

La pérdida ósea se da como consecuencia de la inflamación producida por la periodontitis y se manifiesta como una migración apical de la cresta alveolar, dando lugar a un aumento de la distancia entre el límite amelocementario (LAC) y la cresta ósea.

Existen diferentes medidas de valorar la pérdida ósea: a) medidas morfométricas; b) medidas a través de microtomografía computarizada (micro-CT) y c) medidas histológicas (Figura 3).

Medidas morfométricas

Las medidas morfométricas permiten valorar la pérdida ósea a nivel vestibular y palatino/lingual de los molares maxilares y mandibulares. Para ello es necesario en primer lugar eliminar todo el tejido blando de forma cuidadosa y realizar una tinción con azul de metileno que permita identificar de forma más clara el LAC. A continuación, el maxilar se coloca e inmoviliza en una posición en la cual la superficie vestibular de los molares

este perpendicular a la lupa de magnificación, lo que no siempre es sencillo debido a la curvatura del maxilar.

Posteriormente, se obtienen las imágenes con la lupa de magnificación y mediante un software específico se realizan las mediciones oportunas. Esta técnica presenta la ventaja de que más económica en comparativa al micro-CT, pero la reproductibilidad entre mediciones es variable. Además, otras posibles desventajas de esta técnica son las limitaciones del propio software, la colocación y estabilización del maxilar en la posición correcta y los factores anatómicos del propio maxilar y/o mandíbula en el que el primer, segundo y tercer molar rara vez suelen estar en el mismo plano (Martínez y cols., 2021).

Micro-CT

La microtomografía computarizada basa la obtención de imágenes gracias a rayos X que se reconstruyen dando lugar a una modelo tridimensional. Es por ello, que resulta de gran utilidad a la hora de valorar de forma exacta las diferencias en los niveles óseos, ya que nos permite valorar el componente infraóseo y realizar mediciones volumétricas. Una vez obtenido el modelo, a través de un software digital, se realizan las mediciones oportunas y se valora la pérdida ósea (Li y cols., 2015).

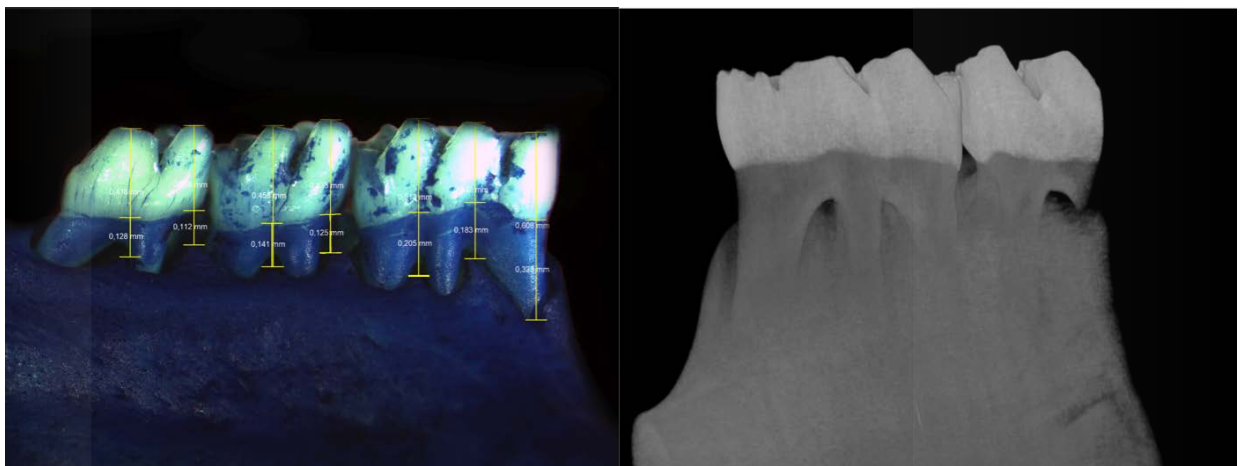


Figura 3: a) medidas morfométricas b) medidas con Micro-CT

1.5. Justificación del estudio

Estudios previos han demostrado que la inducción de periodontitis en ratas con lavados orales no produce trauma tisular y por lo tanto la inflamación que desencadenan se asemeja a la producida por el curso natural de la enfermedad. Sin embargo, este tipo de inducción no ha sido capaz de desencadenar una periodontitis severa (Martínez y cols., 2021).

Dentro de las limitaciones encontradas por nuestro grupo de investigación en anteriores experimentos con este modelo se encuentran:

- (1) El uso de una alimentación dura diseñada para animales roedores, que se piensa que puede estimular la producción de saliva y por tanto dificultar la formación de biofilm.
- (2) La viscosidad del vehículo de lavados orales.
- (3) La duración del protocolo y su posible interacción con mediciones de variables sistémicas.

Es por ello por lo que el presente estudio trata de determinar si con un protocolo de lavados orales en el que se realizan ciertas modificaciones con respecto a los modelos anteriores (Polak y cols., 2009; Virto y cols., 2018; y Martínez y cols., 2021) se consigue inducir una periodontitis de mayor severidad en un tiempo más limitado.

De esta forma, se podrá desencadenar una mayor inflamación sistémica y valorar de forma más eficaz la relación entre la periodontitis y diversas enfermedades sistémicas, como son las enfermedades neuro inflamatorias entre las que encontramos la depresión o la esquizofrenia entre otras.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo general

El objetivo general del presente estudio preclínico *in vivo* es comparar la periodontitis obtenida con un protocolo de inducción de periodontitis mediante lavados orales modificado en un tiempo variable de 4 a 12 semanas.

3.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos, se pretende comparar:

- (1) Las variables clínicas (inflamación) y radiológicas (pérdida ósea) obtenidas con el modelo de inducción modificada a 4, 8 y 12 semanas con respecto a las obtenidas por el grupo control.
- (2) Las variables clínicas (inflamación) y radiológicas (pérdida ósea) obtenidas con el modelo de inducción modificada a 12 semanas con respecto a las obtenidas a 4 u 8 semanas.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

Los cambios introducidos en los modelos de lavados orales pueden inducir el desarrollo de periodontitis en menos tiempo, manifestada a través de la pérdida ósea y medidas periodontales clínicas.

4.2. Hipótesis específicas

Como hipótesis específicas se plantea:

- Las variables clínicas (inflamación) y radiológicas (pérdida ósea) obtenidas con el modelo de inducción modificada a 4, 8 y 12 semanas serán superiores que las obtenidas por el grupo control.
- Las variables clínicas (inflamación) y radiológicas (pérdida ósea) obtenidas con el modelo de inducción modificada a 12 semanas serán superiores a las obtenidas a 4 u 8 semanas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

El presente estudio preclínico *in vivo* fue diseñado de acuerdo con las directrices modificadas ARRIVE para la investigación preclínica (Vignoletti y cols., 2012) y siguiendo la normativa española y de la Unión Europea (Directiva 86/609/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas). El protocolo fue aprobado por las autoridades regionales (PROEX 087/18) y el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios de las 3R del cuidado animal (Remplazar, reducir y refinar).

5.1.1. Alojamiento, crianza y cuidado de los animales.

Para la realización del estudio se obtuvieron 32 ratas macho Wistar Hannover (HsdRccHan:Wist, Envigo, España). Las ratas macho se distribuyeron al azar en jaulas abiertas de policarbonato y se almacenaron en habitaciones a una temperatura constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del $70 \pm 5\%$ en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (se enciende a las 8:00 AM).

Para la alimentación de los animales se empleó comida estándar de pellets triturada (A04 SAFE, Scientific Animal Food and Engineering©, Augy, Francia) mezclada con agua y calculada en función del número de animales por jaula. Además, los animales tenían acceso libre al agua (agua corriente de grifo) y se mantuvieron en condiciones estables durante los 7 días previos al inicio de los experimentos en las instalaciones del animalario de la Facultad de medicina de la UCM.

La alimentación se realizaba de forma diaria exceptuando fines de semana (en el que se les dejaba comida suficiente para el total de días). A diferencia del modelo de lavados anterior (Martínez y cols., 2021), en este estudio se realizó una modificación de la alimentación, en el que los *pellets* eran triturados y mezclados con agua con el objetivo de crear una pasta homogénea que favoreciese la formación del biofilm. La mezcla llevaba una proporción de 0,87 ml de agua por cada gramo de comida. La limpieza de las jaulas y cambio de agua fue realizada por el animalario de forma semanal.

5.1.2. Grupos de estudio

El diseño del estudio se puede observar en la Figura 4. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos experimentales, en función del tiempo de inducción de periodontitis mediante lavados orales: a) P+12s, periodontitis inducida con un tiempo de 12 semanas; b) P+8s, periodontitis inducida con un tiempo de 8 semanas; c) P+4s, periodontitis inducida con un tiempo de 4 semanas; y d) P-, grupo control en el que se realizaron lavados sin patógenos periodontales durante 12 semanas. El grupo control, se dividió posteriormente en 3 grupos experimentales (P-4s, P-8s y P-12s). Tras 4, 8 y 12 semanas se procedió al sacrificio de los animales experimentales junto con miembros del grupo control.

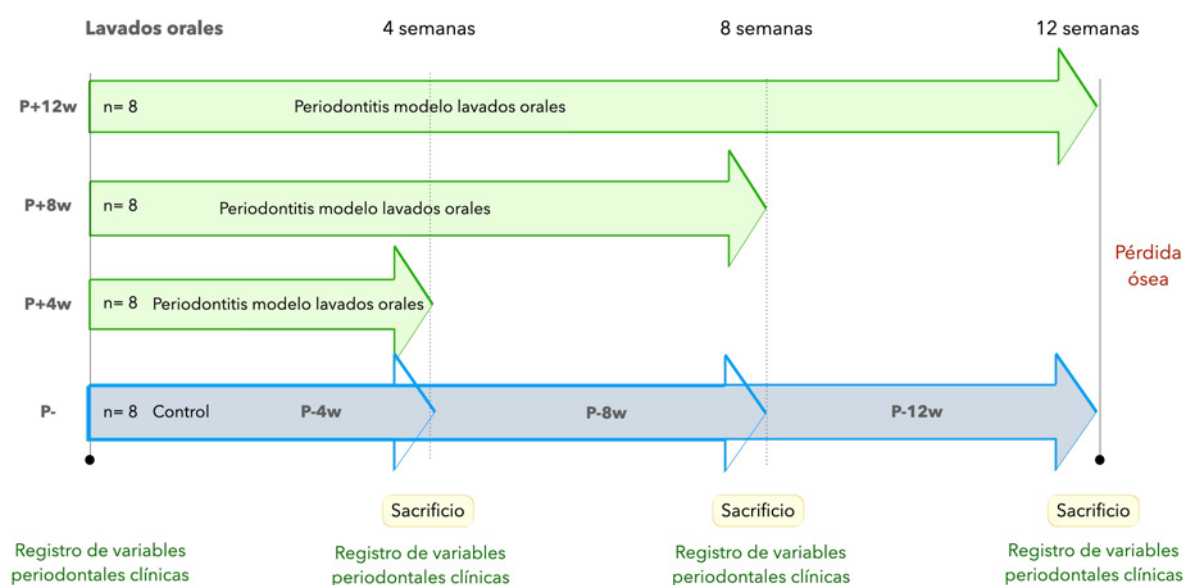


Figura 4: Distribución de los grupos experimentales

4.2. Modelo de inducción de la periodontitis

Para la inducción de periodontitis mediante lavados orales se empleó el modelo experimental de periodontitis descrito por Virto y cols. (2018), en el que se inoculó *P. gingivalis* ATCC W83 K1 y *F. nucleatum* DMSZ 20482 por vía oral a través de jeringas estériles sin aguja (Virto y cols., 2018).

Estas bacterias se cultivaron individualmente en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ a 37°C) en medios de infusión cardíaca cerebral (BHI) (25 ml) (*Becton, Dickinson y Company*). Se ajustó el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría a 550 nm para obtener 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml para cada bacteria. Ambos cultivos puros fueron mezclados y centrifugados (10 min a 4000 rpm) para separar

las bacterias del medio de cultivo. Las bacterias precipitadas se volvieron a suspender en 50 ml de solución estéril [solución salina amortiguada con fosfato (PBS) al 3% de carboximetilcelulosa (Sigma)]. La solución sin bacterias se usó como placebo (Virto y cols., 2018; Martínez y cols., 2021).

Se realizó la administración de 1 mililitro de suspensión en cuatro días consecutivos (martes, miércoles, jueves y viernes) por semana durante 12 semanas. El procedimiento se realizó siempre a primera hora de la mañana y en el mismo orden, primero el grupo control y luego el grupo experimental para prevenir la posible contaminación cruzada.

Dos personas fueron necesarias para realizar el procedimiento. Una de ellas retiró al animal de su caja y lo inmovilizó enrollando al animal mediante un trapo estéril, (diferente entre los grupos control y periodontitis). A continuación, otro operador introdujo la jeringa estéril por el lado derecho con el objetivo de llegar a los primeros molares maxilares y se les administró la mitad de la solución. Posteriormente, se repitió el procedimiento con la mitad restante por el lado izquierdo.

4.3. Análisis de las variables clínicas periodontales

Las variables clínicas periodontales se registraron de forma basal (día 0), y a las semanas 4, 8 y 12 en función del grupo. Para ello, los animales fueron anestesiados mediante una mezcla de ketamina (*Anesketin, Dechra Pharmaceuticals PLC, Inglaterra*), con concentración de 0,08 ml/100 g y xilazina (*Xylaxol, Laboratorios Karizoo, España*) con una concentración de 0,04 ml/100 g.

Un examinador (JRB) se encargó de proporcionar un adecuado campo de visión mientras que otro examinador entrenado (MM) registró las siguientes variables clínicas bajo magnificación (x3.4):

- Índice de placa (IP) (O'Leary, 1972):
 - 0: ausencia de placa.
 - 1: presencia de placa.
- Índice gingival modificado (IG) (Lobene y cols., 1986).
 - 0: ausencia de inflamación.
 - 1: inflamación leve con pequeños cambios de color y textura, pero no en todo el margen gingival.

- 2: inflamación leve en todas las superficies del margen gingival.
- 3: inflamación moderada con color brillante, eritema, edema e hipertrofia del margen gingival.
- 4: inflamación severa: eritema, edema y/o hipertrofia gingival o sangrado espontáneo o ulceración.
- Profundidad de sondaje (PS): representa la distancia entre el margen gingival y el fondo del surco gingival. Se registra en milímetros (mm) con el uso de una sonda de punta redonda de 0,4 mm (*PUNCI2, Hu-Friedy, Mfg. Co., LLC, Chicago, EEUU*).
- Sangrado al sondaje (BOP, por sus siglas en inglés) (Ainamo y Bay, 1975):
 - 0: ausencia de sangrado al sondaje.
 - 1: presencia de sangrado 10 segundos tras el sondaje.

4.4. Análisis de la pérdida ósea

Las ratas se sacrificaron mediante anestesia terminal utilizando Pentobarbital sódico (320 mg/kg (Vetoquinol¹, Madrid, España) seguido de decapitación con guillotina. Se obtuvieron muestras de sangre, hemimandíbulas y hemimaxilares. Con el objetivo de minimizar la posible influencia del ritmo circadiano, la recolección de muestras biológicas se hizo siempre al mismo tiempo.

Una vez realizada la eutanasia se procedió a la disección de los animales, las muestras se conservaron en nieve carbónica, y se almacenaron a una temperatura de aproximadamente -80°C.

La mitad de las hemimandíbulas fue analizada mediante medidas morfométricas en la Universidad Complutense de Madrid, mientras que la otra mitad fue analizada en la Universidad de Oslo por micro-CT.

4.4.1. Medidas morfométricas

Con el objetivo de valorar de forma más precisa la pérdida ósea, se procedió a eliminar el tejido blando de las mandíbulas mediante el siguiente protocolo modificado (Vasconcelos y cols., 2014):

- En primer lugar, se rellenan vasos de precipitados (100 ml de capacidad) con 75 ml de agua destilada. A continuación, se colocaron los vasos de precipitados en una placa calefactora a unos 370°C hasta que empezase a hervir, momento en el que se disminuye la temperatura a unos 200°C.
- Se introducen las hemimandíbulas durante un tiempo aproximado de 30 minutos. Posteriormente, se elimina el tejido blando con un cepillo de dientes de dureza media y una cureta siendo lo más cuidadoso posible.
- Acto seguido, se introducen las mandíbulas en tubos falcón (50 ml de capacidad) con 45 ml de agua destilada. Se colocan en el agitador orbital, calibrado a 150 rpm durante 1 semana.
- Se repite el procedimiento en el que se emplearon vasos de precipitados en una placa calefactora, pero las muestras de hemimandíbula solo están durante un tiempo de 10 minutos. A continuación, se terminan de eliminar posibles restos de tejido blando con el cepillo de dientes y la cureta.
- Por último, se procede a la tinción con azul de metileno durante 1 minuto con el objetivo de facilitar la ubicación del LAC, y se lavan las muestras con abundante agua, dejándose secar durante un tiempo aproximado de 7 días.

Los niveles óseos alveolares (ABL, por sus siglas en inglés) se midieron por dos examinadores (MM y JRB) utilizando un microscopio Nikon SMZ800 a 2 aumentos empleando la aplicación *Leica Application Suite*. Para ello, las hemimandíbulas se colocaron en cera de suplementar cubetas en una posición en la que la cara vestibular del primer y segundo molar quede lo más paralela al suelo posible y en el que no se pueda visualizar la superficie oclusal de los molares.

A continuación, y tras calibrar el programa, se realizaron las fotografías correspondientes y se realizaron diferentes mediciones, todas ellas tomando como referencia el LAC.

Ambos examinadores realizaron una calibración previa en ambas medidas, obteniendo un coeficiente de correlación interclase inter-examinador de 0,887 y 0,993 en la primera y

segunda medida respectivamente, así como un coeficiente de correlación interclase intra-examinador de 0,990 en ambas mediciones.

Las medidas registradas fueron:

- (1) Medidas desde el LAC hasta la cresta ósea en la zona más apical de la cresta ósea (Figura 5a).
- (2) Medidas desde el LAC hasta la cresta ósea en la zona de las furcas (Figura 5b).

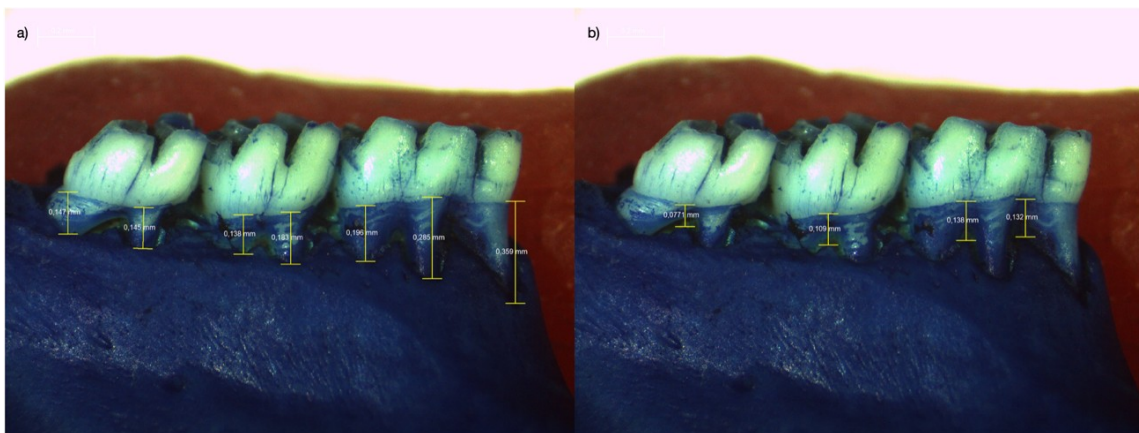


Figura 5: Medidas morfométricas de la pérdida ósea: 4a) desde LAC a la cresta ósea pasando por el punto más apical; 4b) desde LAC a la cresta ósea pasando por las furcas.

4.4.2. Micro-CT

El análisis por micro-CT fue realizado por un examinador calibrado (JB). Se extraerán las hemimandíbulas de cada rata y se fijarán en una solución de formalina al 4% (Applichem Panreac; Barcelona, España). Las muestras se analizarán mediante micro-CT utilizando un sistema de alta resolución (Skyscan 1172; Bruker microCT, Kontich, Bélgica) con una resolución de vóxel de 7,94 μm y una fuente de alimentación de 70 kV y 130 μA , más un filtro de aluminio y cobre de 0,5 mm para optimizar el contraste.

Las muestras se rotarán 180° alrededor de sus ejes longitudinales y se registrarán cuatro imágenes de absorción cada 0,300° de rotación. Estas imágenes sin procesar se reconstruirán luego a través de algoritmos de reconstrucción de haz cónico 3D, utilizando el software de reconstrucción estándar SkyScan® (NRecon 1.6.10; Bruker microCT) para tomogramas en serie orientados coronalmente. Para estas reconstrucciones se fijará el endurecimiento del haz al 60% y la reducción del artefacto al 9.

Después del escaneo, los dientes serán alineados en 3D con el software DataViewer (Bruker microCT), tomando como referencias el LAC y la corona, de tal modo que la línea que une el LAC interproximal mesial y distal, en el máximo diámetro mesio-distal de la corona del primer molar, quede paralela al plano de referencia, al igual que la línea que une el LAC vestibular y palatino, en el máximo diámetro vestibulo-palatino.

Para la medición lineal de los niveles de hueso alveolar se medirá la distancia entre el LAC y la cresta ósea alveolar [LAC-CO] en siete puntos diferentes (raíz mesiobucal, raíz bucal, raíz distobucal, furca mesiobucal, furcadistobucal, interproximal mesial y distal del primer molar) con el software CT-Analyser (Bruker microCT).

4.5. Análisis de los datos

4.5.1. Cálculo del tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral se realizó en base a los resultados de experimentos previos realizados conjuntamente por el grupo de investigación de *Neuropsicofarmacología Molecular* (Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM) y del grupo de investigación de *Etiología y Terapéutica de las Enfermedades Periodontales y Periimplantarias* (Departamento de Especialidades Clínicas Odontológicas de la Facultad de Odontología de la UCM) (Martin-Hernández y cols., 2016; Martínez y cols., 2021). Se asumió una potencia del 90%, riesgo alfa del 5%, por lo que se seleccionaron 8 ratas por subgrupo, 32 ratas entre los 4 subgrupos. Con el objetivo de respetar el principio de las 3R de la ética animal no se incluyeron más animales pese a un posible fallecimiento de alguno de ellos.

4.5.2. Aleatorización

La aleatorización de los animales entre los diferentes subgrupos se realizó de forma digital través de una tabla generada por ordenador. Este proceso fue realizado por una persona diferente del operador.

4.5.3. Ocultación de la asignación

La ocultación de asignación se realizó mediante numeración.

4.5.4. Enmascaramiento

Se realizó un enmascaramiento a doble ciego, en el que los examinadores y el estadístico desconocían el tratamiento que recibieron las ratas. Este proceso se realizó por codificación mediante una tabla generada por ordenador por otro operador.

4.6. Análisis estadístico

Los animales se consideraron la unidad de análisis y los resultados se calcularon tanto individualmente como por subgrupo, expresando los datos como media y desviación estándar (DE). Se definió la pérdida ósea en milímetros (mm) como **variable principal**, mientras que el IP (0-1), IG (0-4), BoP (0-1) y PS (mm) se definieron como **variables secundarias**.

Para las **variables cuantitativas**, se comprobó si seguían una distribución normal, para lo que se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Si los datos siguieron una distribución normal, se utilizó la prueba de ANOVA unidireccional con correcciones *post hoc* de Bonferroni para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales y control para todas las mediciones de resultados. Si los datos no se distribuían normalmente, se realizaron transformaciones logarítmicas. Las **variables categóricas** se analizaron con la prueba de chi-cuadrado.

Un valor $p < 0.05$ se definió como estadísticamente significativo. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando IBM SPSS Statistics 25.0.0.0 (IBM) o GraphPad Prism© versión 7.00. (GraphPad Software, Inc.).

6. RESULTADOS

6.1. Resultados de la muestra

De los 32 animales incluidos en este estudio de experimentación, 4 animales (P+12s, P+8s, P+4s y P-) murieron durante el registro de las variables clínicas periodontales en el estado basal debido a la mala tolerancia al anestésico.

Por tanto, quedaron un total de 28 animales, con una distribución de 7 ratas macho por subgrupo. Debido a una falta de sedación, el registro de las variables clínicas en algunos animales se vio comprometido, obteniendo datos basales únicamente de 21 ratas macho.

El diagrama del flujo de trabajo se puede observar en la figura 6.

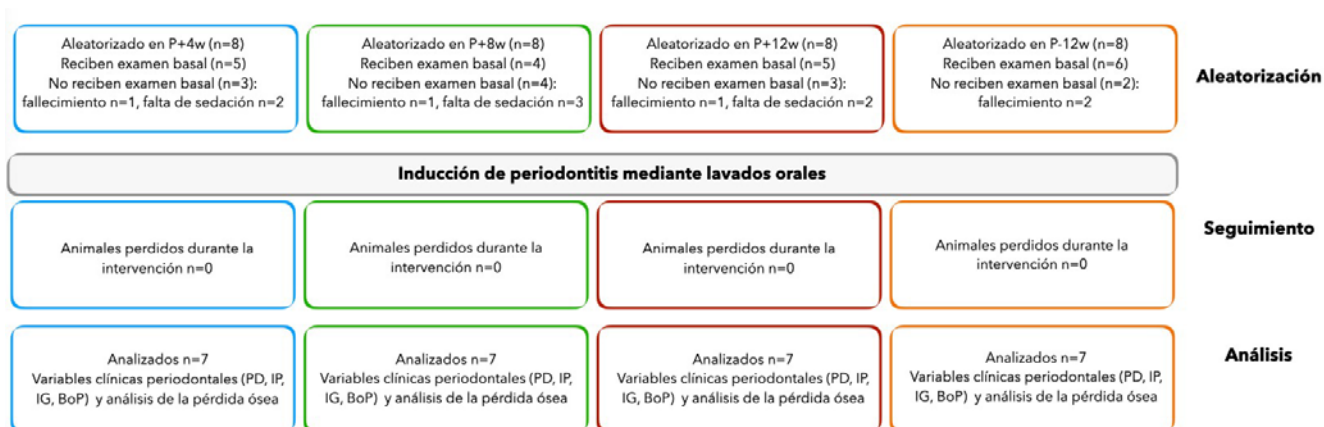


Figura 6: Flujo de trabajo

6.2. Variables periodontales

6.2.1. Variables clínicas periodontales

En cuanto a las variables clínicas periodontales (IP, IG, BoP y PS), el grupo P+12s muestra los mayores niveles de IG y PS, mientras que el grupo P+8s muestra los mayores niveles de IP y BoP. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la visita basal (día 0), así como tras la inducción de periodontitis. La única variable estadísticamente significativa fue la variable cambio del IP ($p=0,047$), siendo superior en el grupo P+8s. Del mismo modo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de subgrupos. Los resultados se pueden ver en la tabla 1.

TABLA 1: VARIABLES CLÍNICAS PERIODONTALES

Variables periodontales	Grupo	n	Media	DE	Valor p (ANOVA)	Comparación Post-hoc						
						Comparación específica	Intervalo de confianza al 95%			Post-hoc valor p (ANOVA)		
							Media	IC inf	IC sup			
IP	Evaluación inicial	P-4s	2	0,125	0,059	0,682	P-4s vs P-8s	0,083	-0,184	0,351	1,000	
		P-8s	2	0,042	0,059		P-4s vs P-12s	0,125	-0,143	0,393	1,000	
		P-12s	2	0,000	0,000		P-4s vs P+4s	0,058	-0,166	0,282	1,000	
		P+4s	5	0,067	0,070		P-4s vs P+8s	0,083	-0,149	0,315	1,000	
		P+8s	4	0,042	0,048		P-4s vs P+12s	0,058	-0,166	0,282	1,000	
		P+12s	5	0,067	0,109		P-8s vs P-12s	0,042	-0,226	0,309	1,000	
							P-8s vs P+4s	-0,025	-0,249	0,199	1,000	
							P-8s vs P+8s	0,000	-0,232	0,232	1,000	
							P-8s vs P+12s	-0,025	-0,249	0,199	1,000	
							P-12s vs P+4s	-0,067	-0,291	0,157	1,000	
					P-12s vs P+8s	-0,042	-0,274	0,190	1,000			
					P-12s vs P+12s	-0,067	-0,291	0,157	1,000			
					P+4s vs P+8s	0,025	-0,155	0,205	1,000			
					P+4s vs P+12s	0,000	-0,169	0,169	1,000			
					P+8s vs P+12s	-0,025	-0,205	0,155	1,000			
		Post inducción periodontitis	P-4s	2	0,000	0,000	0,054	P-4s vs P-8s	0,000	-0,432	0,432	1,000
			P-8s	2	0,000	0,000		P-4s vs P-12s	-0,083	-0,478	0,311	1,000
			P-12s	3	0,083	0,144		P-4s vs P+4s	-0,036	-0,382	0,311	1,000
			P+4s	7	0,036	0,066		P-4s vs P+8s	-0,167	-0,513	0,180	1,000
			P+8s	7	0,167	0,167		P-4s vs P+12s	-0,238	-0,584	0,108	0,508
	P+12s		7	0,238	0,155	P-8s vs P-12s		-0,083	-0,478	0,311	1,000	
					P-8s vs P+4s	-0,036		-0,382	0,311	1,000		
					P-8s vs P+8s	-0,167		-0,513	0,180	1,000		
					P-8s vs P+12s	-0,238		-0,584	0,108	0,508		
					P-12s vs P+4s	0,048		-0,250	0,346	1,000		
				P-12s vs P+8s	-0,083	-0,381	0,215	1,000				
				P-12s vs P+12s	-0,155	-0,453	0,143	1,000				
				P+4s vs P+8s	-0,131	-0,362	0,100	1,000				
				P+4s vs P+12s	-0,202	-0,433	0,028	0,129				
				P+8s vs P+12s	-0,071	-0,302	0,159	1,000				
	Cambio	P-4s	2	-0,125	0,059	0,047	P-4s vs P-8s	-0,083	-0,543	0,377	1,000	
		P-8s	2	-0,042	0,059		P-4s vs P-12s	-0,250	-0,710	0,210	1,000	
		P-12s	2	0,125	0,177		P-4s vs P+4s	-0,108	-0,493	0,277	1,000	
		P+4s	5	-0,017	0,137		P-4s vs P+8s	-0,354	-0,753	0,044	0,109	
		P+8s	4	0,229	0,185		P-4s vs P+12s	-0,242	-0,627	0,143	0,656	
		P+12s	5	0,117	0,075		P-8s vs P-12s	-0,167	-0,627	0,293	1,000	
					P-8s vs P+4s		-0,025	-0,410	0,360	1,000		
					P-8s vs P+8s		-0,271	-0,669	0,128	0,464		
				P-8s vs P+12s	-0,158	-0,543	0,227	1,000				

							P-12s vs P+4s	0,142	-0,243	0,527	1,000	
							P-12s vs P+8s	-0,104	-0,503	0,294	1,000	
							P-12s vs P+12s	0,008	-0,377	0,393	1,000	
							P+4s vs P+8s	-0,246	-0,554	0,063	0,208	
							P+4s vs P+12s	-0,133	-0,424	0,158	1,000	
							P+8s vs P+12s	0,113	-0,196	0,421	1,000	
IG	Evaluación inicial	P-4s	2	0,000	0,000	0,775	P-4s vs P-8s	-0,042	-0,329	0,246	1,000	
		P-8s	2	0,042	0,059		P-4s vs P-12s	-0,028	-0,290	0,235	1,000	
		P-12s	3	0,028	0,048		P-4s vs P+4s	-0,017	-0,257	0,224	1,000	
		P+4s	5	0,017	0,037		P-4s vs P+8s	-0,021	-0,270	0,228	1,000	
		P+8s	4	0,021	0,042		P-4s vs P+12s	-0,083	-0,324	0,157	1,000	
		P+12s	5	0,083	0,144		P-8s vs P-12s	0,014	-0,249	0,276	1,000	
							P-8s vs P+4s	0,025	-0,216	0,266	1,000	
							P-8s vs P+8s	0,021	-0,228	0,270	1,000	
							P-8s vs P+12s	-0,042	-0,282	0,199	1,000	
							P-12s vs P+4s	0,011	-0,199	0,221	1,000	
							P-12s vs P+8s	0,007	-0,213	0,227	1,000	
							P-12s vs P+12s	-0,056	-0,266	0,154	1,000	
							P+4s vs P+8s	-0,004	-0,197	0,189	1,000	
							P+4s vs P+12s	-0,067	-0,249	0,115	1,000	
							P+8s vs P+12s	-0,063	-0,255	0,130	1,000	
		Post inducción periodontitis	P-4s	2	0,208	0,059	0,727	P-4s vs P-8s	0,000	-0,612	0,612	1,000
			P-8s	2	0,208	0,059		P-4s vs P-12s	0,097	-0,462	0,656	1,000
			P-12s	3	0,111	0,127		P-4s vs P+4s	0,030	-0,461	0,521	1,000
			P+4s	7	0,179	0,101		P-4s vs P+8s	-0,065	-0,556	0,425	1,000
			P+8s	7	0,274	0,178		P-4s vs P+12s	-0,077	-0,568	0,414	1,000
			P+12s	7	0,286	0,280		P-8s vs P-12s	0,097	-0,462	0,656	1,000
							P-8s vs P+4s	0,030	-0,461	0,521	1,000	
							P-8s vs P+8s	-0,065	-0,556	0,425	1,000	
							P-8s vs P+12s	-0,077	-0,568	0,414	1,000	
							P-12s vs P+4s	-0,067	-0,490	0,355	1,000	
							P-12s vs P+8s	-0,163	-0,585	0,260	1,000	
							P-12s vs P+12s	-0,175	-0,597	0,248	1,000	
							P+4s vs P+8s	-0,095	-0,423	0,232	1,000	
							P+4s vs P+12s	-0,107	-0,434	0,220	1,000	
							P+8s vs P+12s	-0,012	-0,339	0,315	1,000	
		Cambio	P-4s	2	0,208	0,059	0,381	P-4s vs P-8s	0,042	-0,512	0,595	1,000
			P-8s	2	0,167	0,000		P-4s vs P-12s	0,125	-0,380	0,630	1,000
			P-12s	3	0,083	0,144		P-4s vs P+4s	0,025	-0,438	0,488	1,000
	P+4s		5	0,183	0,070	P-4s vs P+8s		-0,125	-0,604	0,354	1,000	
	P+8s		4	0,333	0,152	P-4s vs P+12s		0,092	-0,371	0,555	1,000	
	P+12s		5	0,117	0,247	P-8s vs P-12s		0,083	-0,422	0,588	1,000	
						P-8s vs P+4s	-0,017	-0,480	0,446	1,000		
						P-8s vs P+8s	-0,167	-0,646	0,313	1,000		
						P-8s vs P+12s	0,050	-0,413	0,513	1,000		

							P-12s vs P+4s	-0,100	-0,504	0,304	1,000	
							P-12s vs P+8s	-0,250	-0,673	0,173	0,857	
							P-12s vs P+12s	-0,033	-0,437	0,371	1,000	
							P+4s vs P+8s	-0,150	-0,521	0,221	1,000	
							P+4s vs P+12s	0,067	-0,283	0,417	1,000	
							P+8s vs P+12s	0,217	-0,155	0,588	0,902	
PS	Evaluación inicial	P-4s	2	0,100	0,000	0,321	P-4s vs P-8s	0,000	-0,026	0,026	1,000	
		P-8s	2	0,100	0,000		P-4s vs P-12s	0,000	-0,024	0,024	1,000	
		P-12s	3	0,100	0,000		P-4s vs P+4s	-0,010	-0,032	0,012	1,000	
		P+4s	5	0,110	0,014		P-4s vs P+8s	0,000	-0,022	0,022	1,000	
		P+8s	4	0,100	0,000		P-4s vs P+12s	-0,005	-0,027	0,017	1,000	
		P+12s	5	0,105	0,005		P-8s vs P-12s	0,000	-0,024	0,024	1,000	
							P-8s vs P+4s	-0,010	-0,032	0,012	1,000	
							P-8s vs P+8s	0,000	-0,022	0,022	1,000	
							P-8s vs P+12s	-0,005	-0,027	0,017	1,000	
							P-12s vs P+4s	-0,010	-0,029	0,009	1,000	
							P-12s vs P+8s	0,000	-0,020	0,020	1,000	
							P-12s vs P+12s	-0,005	-0,024	0,014	1,000	
							P+4s vs P+8s	0,010	-0,007	0,027	0,959	
							P+4s vs P+12s	0,005	-0,011	0,021	1,000	
							P+8s vs P+12s	-0,005	-0,022	0,012	1,000	
		Post inducción periodontitis	P-4s	2	0,108	0,012	0,315	P-4s vs P-8s	-0,013	-0,068	0,043	1,000
			P-8s	2	0,121	0,018		P-4s vs P-12s	0,003	-0,048	0,054	1,000
			P-12s	3	0,106	0,005		P-4s vs P+4s	-0,008	-0,053	0,036	1,000
			P+4s	7	0,117	0,008		P-4s vs P+8s	-0,010	-0,054	0,035	1,000
			P+8s	7	0,118	0,012		P-4s vs P+12s	-0,023	-0,067	0,022	1,000
	P+12s		7	0,131	0,028	P-8s vs P-12s		0,015	-0,036	0,066	1,000	
						P-8s vs P+4s	0,004	-0,041	0,049	1,000		
						P-8s vs P+8s	0,003	-0,042	0,048	1,000		
						P-8s vs P+12s	-0,010	-0,055	0,035	1,000		
						P-12s vs P+4s	-0,011	-0,050	0,027	1,000		
						P-12s vs P+8s	-0,012	-0,051	0,026	1,000		
						P-12s vs P+12s	-0,025	-0,064	0,013	0,621		
						P+4s vs P+8s	-0,001	-0,031	0,029	1,000		
						P+4s vs P+12s	-0,014	-0,044	0,016	1,000		
						P+8s vs P+12s	-0,013	-0,043	0,017	1,000		
	Cambio	P-4s	2	0,008	0,012	0,396	P-4s vs P-8s	-0,013	-0,048	0,023	1,000	
		P-8s	2	0,021	0,018		P-4s vs P-12s	0,003	-0,030	0,035	1,000	
		P-12s	3	0,006	0,005		P-4s vs P+4s	0,005	-0,025	0,035	1,000	
		P+4s	5	0,003	0,013		P-4s vs P+8s	-0,002	-0,033	0,029	1,000	
		P+8s	4	0,010	0,010		P-4s vs P+12s	-0,005	-0,035	0,025	1,000	
		P+12s	5	0,013	0,005		P-8s vs P-12s	0,015	-0,017	0,048	1,000	
						P-8s vs P+4s	0,018	-0,012	0,047	0,861		
						P-8s vs P+8s	0,010	-0,020	0,041	1,000		
						P-8s vs P+12s	0,008	-0,022	0,037	1,000		
						P-12s vs P+4s	0,002	-0,024	0,028	1,000		

							P-12s vs P+8s	-0,005	-0,032	0,022	1,000
							P-12s vs P+12s	-0,008	-0,034	0,018	1,000
							P+4s vs P+8s	-0,007	-0,031	0,017	1,000
							P+4s vs P+12s	-0,010	-0,032	0,012	1,000
							P+8s vs P+12s	-0,003	-0,027	0,021	1,000
BoP	Post mauccion periodontitis	P-4s	2	0,000	0,000	0,241	P-4s vs P-8s	0,000	-0,094	0,094	1,000
		P-8s	2	0,000	0,000		P-4s vs P-12s	0,000	-0,086	0,086	1,000
		P-12s	3	0,000	0,000		P-4s vs P+4s	0,000	-0,075	0,075	1,000
		P+4s	7	0,000	0,000		P-4s vs P+8s	-0,036	-0,111	0,039	1,000
		P+8s	7	0,036	0,045		P-4s vs P+12s	-0,012	-0,087	0,063	1,000
		P+12s	7	0,012	0,031		P-8s vs P-12s	0,000	-0,086	0,086	1,000
							P-8s vs P+4s	0,000	-0,075	0,075	1,000
							P-8s vs P+8s	-0,036	-0,111	0,039	1,000
							P-8s vs P+12s	-0,012	-0,087	0,063	1,000
							P-12s vs P+4s	0,000	-0,065	0,065	1,000
							P-12s vs P+8s	-0,036	-0,100	0,029	1,000
							P-12s vs P+12s	-0,012	-0,077	0,053	1,000
							P+4s vs P+8s	-0,036	-0,065	0,065	1,000
							P+4s vs P+12s	-0,012	-0,086	0,014	0,427
						P+8s vs P+12s	0,024	-0,026	0,074	1,000	
	Cambio	P-4s	2	0,000	0,000	0,084	P-4s vs P-8s	0,000	-0,075	0,075	1,000
		P-8s	2	0,000	0,000		P-4s vs P-12s	0,000	-0,068	0,068	1,000
		P-12s	3	0,000	0,000		P-4s vs P+4s	0,000	-0,063	0,063	1,000
		P+4s	5	0,000	0,000		P-4s vs P+8s	-0,042	-0,107	0,023	0,615
		P+8s	4	0,042	0,048		P-4s vs P+12s	0,000	-0,063	0,063	1,000
		P+12s	5	0,000	0,000		P-8s vs P-12s	0,000	-0,068	0,068	1,000
							P-8s vs P+4s	0,000	-0,063	0,063	1,000
							P-8s vs P+8s	-0,042	-0,107	0,023	0,615
							P-8s vs P+12s	0,000	-0,063	0,063	1,000
							P-12s vs P+4s	0,000	-0,055	0,055	1,000
							P-12s vs P+8s	-0,042	-0,099	0,016	0,343
							P-12s vs P+12s	0,000	-0,055	0,055	1,000
							P+4s vs P+8s	-0,042	-0,092	0,009	0,169
							P+4s vs P+12s	0,000	-0,047	0,047	1,000
						P+8s vs P+12s	0,042	-0,009	0,092	0,169	

n = número de animales; DE= desviación estándar; IC = intervalo de confianza; inf= inferior; sup = superior; IP = índice de placa; IG = índice gingival; PS = profundidad de sondaje; BoP= sangrado al sondaje.

Tabla 1: Variables clínicas periodontales iniciales, post-inducción de periodontitis y cambio: IP, IG, PS, BoP

6.2.2. Análisis de la pérdida ósea

El análisis de la pérdida ósea muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y periodontitis para ninguna de las dos medidas analizadas tanto con medidas morfométricas como con micro-CT. Las medidas morfométricas muestran que la distancia LAC-cresta ósea en su punto más apical y a nivel de la furca mayor en el grupo P-8s. En contraposición, el micro-CT muestra que es el grupo P+8s el que mayor pérdida ósea presenta. Los resultados se pueden observar en la tabla 2.

TABLA 2: ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA ÓSEA

Grupo	n	Media	DE	Valor p (ANOVA)	Comparación Post-hoc				
					Intervalo de confianza al 95%				Post-hoc valor p (ANOVA)
					Comparación específica	Media	IC inf	IC sup	
Medidas morfométricas: Distancia LAC-cresta ósea en mm									
P-4s	2	1,011	0,011	0,689	P-4s vs P-8s	-0,104	-0,495	0,288	1,000
P-8s	2	1,115	0,050		P-4s vs P-12s	-0,057	-0,414	0,301	1,000
P-12s	3	1,068	0,147		P-4s vs P+4s	0,003	-0,311	0,317	1,000
P+4s	7	1,008	0,083		P-4s vs P+8s	-0,058	-0,372	0,256	1,000
P+8s	7	1,069	0,111		P-4s vs P+12s	-0,093	-0,407	0,221	1,000
P+12s	7	1,104	0,158		P-8s vs P-12s	0,047	-0,310	0,404	1,000
					P-8s vs P+4s	0,107	-0,207	0,420	1,000
					P-8s vs P+8s	0,046	-0,268	0,360	1,000
					P-8s vs P+12s	0,011	-0,303	0,325	1,000
					P-12s vs P+4s	0,060	-0,211	0,330	1,000
					P-12s vs P+8s	-0,001	-0,271	0,269	1,000
					P-12s vs P+12s	-0,036	-0,306	0,234	1,000
					P+4s vs P+8s	-0,060	-0,270	0,149	1,000
					P+4s vs P+12s	-0,095	-0,305	0,114	1,000
					P+8s vs P+12s	-0,035	-0,244	0,174	1,000
Micro-CT: Distancia LAC-cresta ósea en mm									
P-4s	2	1,077	0,007	0,471	P-4s vs P-8s	0,015	-0,255	0,285	1,000
P-8s	2	1,062	0,011		P-4s vs P-12s	-0,021	-0,267	0,226	1,000
P-12s	3	1,098	0,098		P-4s vs P+4s	0,034	-0,182	0,250	1,000
P+4s	7	1,043	0,058		P-4s vs P+8s	-0,055	-0,272	0,161	1,000
P+8s	7	1,132	0,093		P-4s vs P+12s	-0,029	-0,245	0,188	1,000
P+12s	7	1,106	0,097		P-8s vs P-12s	-0,036	-0,282	0,210	1,000
					P-8s vs P+4s	0,019	-0,198	0,235	1,000
					P-8s vs P+8s	-0,071	-0,287	0,146	1,000
					P-8s vs P+12s	-0,044	-0,261	0,172	1,000
					P-12s vs P+4s	0,055	-0,132	0,241	1,000
					P-12s vs P+8s	-0,035	-0,221	0,152	1,000

P-12s vs P+12s	-0,008	-0,194	0,178	1,000
P+4s vs P+8s	-0,089	-0,234	0,055	0,810
P+4s vs P+12s	-0,063	-0,207	0,081	1,000
P+8s vs P+12s	0,026	-0,118	0,171	1,000

Medidas morfométricas: Distancia LAC-cresta ósea en furca en mm									
P-4s	2	1,011	0,011	0,625	P-4s vs P-8s	-0,150	-0,468	0,169	1,000
P-8s	2	1,115	0,050		P-4s vs P-12s	-0,041	-0,331	0,250	1,000
P-12s	3	1,068	0,147		P-4s vs P+4s	-0,075	-0,330	0,181	1,000
P+4s	7	1,008	0,083		P-4s vs P+8s	-0,071	-0,327	0,184	1,000
P+8s	7	1,069	0,111		P-4s vs P+12s	-0,107	-0,363	0,148	1,000
P+12s	7	1,104	0,158		P-8s vs P-12s	0,109	-0,182	0,400	1,000
					P-8s vs P+4s	0,075	-0,180	0,331	1,000
					P-8s vs P+8s	0,078	-0,177	0,334	1,000
					P-8s vs P+12s	0,042	-0,213	0,298	1,000
					P-12s vs P+4s	-0,034	-0,254	0,186	1,000
					P-12s vs P+8s	-0,031	-0,251	0,189	1,000
					P-12s vs P+12s	-0,067	-0,287	0,153	1,000
					P+4s vs P+8s	0,003	-0,167	0,174	1,000
					P+4s vs P+12s	-0,033	-0,203	0,138	1,000
					P+8s vs P+12s	-0,036	-0,206	0,134	1,000
Micro-CT: Distancia LAC-cresta ósea a nivel de la furca en mm									
P-4s	2	0,983	0,020	0,241	P-4s vs P-8s	-0,008	-0,344	0,327	1,000
P-8s	2	0,991	0,087		P-4s vs P-12s	-0,074	-0,380	0,233	1,000
P-12s	3	1,056	0,052		P-4s vs P+4s	0,088	-0,181	0,357	1,000
P+4s	7	0,895	0,071		P-4s vs P+8s	-0,030	-0,299	0,239	1,000
P+8s	7	1,013	0,137		P-4s vs P+12s	-0,002	-0,271	0,267	1,000
P+12s	7	0,985	0,110		P-8s vs P-12s	-0,066	-0,372	0,241	1,000
					P-8s vs P+4s	0,096	-0,173	0,365	1,000
					P-8s vs P+8s	-0,022	-0,291	0,247	1,000
					P-8s vs P+12s	0,006	-0,263	0,275	1,000
					P-12s vs P+4s	0,162	-0,070	0,393	0,472
					P-12s vs P+8s	0,044	-0,188	0,275	1,000
					P-12s vs P+12s	0,071	-0,160	0,303	1,000
					P+4s vs P+8s	-0,118	-0,297	0,061	0,623
					P+4s vs P+12s	-0,090	-0,270	0,089	1,000
					P+8s vs P+12s	0,028	-0,152	0,207	1,000

Tabla 2: Análisis de la pérdida ósea: medidas morfométricas y micro-CT

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la inducción de periodontitis por lavados orales no ha conseguido obtener diferencias estadísticamente significativas a las 4, 8 y 12 semanas con respecto al control tanto en las variables clínicas como en el análisis de la pérdida ósea. Esto se muestra en contraposición con los resultados positivos obtenidos en estudios anteriores, en los que si encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Martínez y cols., 2021; Virto y cols., 2018). No obstante, el grupo P+8s y P+12s son los dos grupos que mayor pérdida ósea e inflamación presentan con respecto al resto.

Cabe mencionar que la ausencia de diferencias estadísticamente significativas no impide que el estudio tenga relevancia clínica. Esto ha sido comentado por diferentes autores como Palombo y cols. (2021), que sugieren que, con el objetivo de respetar el principio de las 3R de la ética animal, las investigaciones preclínicas se realizan frecuentemente con un tamaño muestral insuficiente para obtener diferencias estadísticamente significativas (Palombo y cols., 2021). De hecho, el cálculo del tamaño muestral realizado en el presente estudio *in vivo* toma como consideración parámetros de neuroinflamación del estudio previo publicado por el grupo de investigación (Martínez y cols., 2021), lo que puede haber contribuido a no incluir suficientes animales para obtener diferencias entre los grupos.

Los modelos de inducción de periodontitis por lavados orales muestran numerosos beneficios con respecto a otros modelos a la hora de estudiar de forma más precisa la posible relación entre la periodontitis y los diferentes estados sistémicos. La inflamación sistémica generada es desencadenada únicamente por la presencia de bacterias periodontopatógenas y su uso no se asocia a la presencia de trauma tisular (Virto y cols., 2017; Martínez y cols., 2021). Sin embargo, el empleo de lavados orales presenta ciertas limitaciones a tener en cuenta, entre las que podemos encontrar: (1) el tiempo empleado para la inducción de periodontitis; (2) el registro de las variables clínicas y el análisis de la pérdida ósea; (3) las condiciones ambientales de los animales de experimentación y (4) las cepas bacterianas empleadas.

El **tiempo** de lavados orales necesario para la inducción de periodontitis es variable, mostrando gran heterogeneidad en los estudios. Algunos autores realizan los lavados con patógenos orales en tan 3 días consecutivos (Polak y cols., 2009, Polak y cols., 2018).

Otros autores como Liu y cols. (2022) realizan 6 aplicaciones de lavados orales cada dos días durante un tiempo de 5-8 semanas (Liu y cols., 2022). Del mismo modo, Boyer y cols. (2020) realizan un protocolo de lavados durante 5 semanas, pero tan solo 3 días por semana (Boyer y cols., 2020). En los estudios previos realizados por el grupo de investigación ETEP, el protocolo de lavados se realiza durante 12 semanas (Virto y cols., 2017, 2018; Martínez y cols., 2021). En este protocolo, se requiere realizar lavados diarios de forma individual, lo cual supone un gran esfuerzo a nivel de tiempo. Es por ello, que la búsqueda de un nuevo modelo de lavados en el que la inducción de periodontitis se realizase en menor tiempo ha sido el objetivo del grupo de investigación. Los resultados del presente estudio sugieren que se podría valorar el uso de un modelo durante 8 semanas, ya que el grupo experimental P+8s obtuvo los mayores valores de pérdida ósea, así como de determinados registros clínicos.

En cuanto a las **mediciones de las variables periodontales**, no todos los estudios analizan las mismas variables, y cuando lo hacen, no de la misma forma. En el estudio de Virto y cols. (2017) en el que se valora la posible relación entre obesidad y periodontitis, únicamente se valoró la presencia de periodontitis a partir de registros clínicos (IG y PS). En el estudio se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de periodontitis-obesidad y periodontitis-control con respecto a los respectivos grupos control. El grupo experimental más similar a nuestro experimento obtuvo valores de PS de 0,63 mm, y una media del IG de 1,71, ampliamente superiores a nuestros resultados (Virto y cols., 2017). En un estudio posterior empleando el mismo protocolo de inducción de periodontitis, se analizó la pérdida ósea mediante micro-CT en 6 superficies dentarias, midiendo la distancia entre el LAC y la cresta ósea. Los resultados mostraron que los grupos con periodontitis mostraban una mayor pérdida ósea con respecto a los grupos control en todas las superficies dentarias (Virto y cols., 2018).

En otro estudio *in vivo* siguiendo el mismo protocolo de lavados, Martínez y cols. (2021) valoraron la presencia de periodontitis mediante el registro de variables clínicas y se realizó un análisis de la pérdida ósea mediante medidas morfométricas, midiendo la distancia entre el LAC y la cresta ósea en tres niveles (a nivel de la furca, a nivel de la cúspide y a nivel apical) así como la distancia desde el punto de contacto a la cresta ósea. En cuanto a las variables clínicas, se obtuvieron diferencias entre los grupos control y periodontitis en las tres variables analizadas (IG, BoP y PS). El grupo experimental más similar a nuestro experimento obtuvo de media valores de PS de 0,26 mm, del IG de 0,38

y de BoP de 0,08, lo que se muestra ligeramente superior a los valores encontrados en este experimento en el grupo P+12s. El análisis de la pérdida ósea demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos únicamente a nivel de la furca, siendo estas diferencias mayores a las reportadas en el presente experimento. (Martínez y cols., 2021). Una de las fortalezas del presente estudio frente a otros estudios es que a la hora de realizar las medidas morfométricas se realizó un entrenamiento previo y una calibración de las medidas, obteniendo unos coeficientes de correlación inter-examinador superiores al 90%.

Esta discrepancia en las mediciones tanto a nivel clínico como del registro de la pérdida ósea se manifiesta también en otros grupos de investigación. Polak y cols. (2009) analizan la pérdida ósea mediante micro-CT realizando tanto medidas volumétricas en superficie vestibular de la raíz distal y mesial, ofreciendo resultados de cuanto nivel óseo queda por encima del LAC en milímetros cúbicos (mm³). Otros autores como Boyer y cols., (2020) analizan mediante micro-CT la distancia desde el LAC a la cresta ósea a nivel interproximal entre los molares, y calculan la pérdida ósea en función de la longitud de la raíz.

En nuestro estudio pese a no poder comparar el análisis de la pérdida ósea entre ambas técnicas, se puede apreciar como las diferentes técnicas muestran que la pérdida ósea afecta en mayor medida a un grupo diferente. La orientación de los dientes de forma perpendicular al suelo, las variaciones anatómicas de la posición y tamaño de los dientes y la realización de mediciones en dos dimensiones de un modelo en 3 dimensiones son limitaciones inherentes a la técnica. La falta de un protocolo claro a la hora de realizar las mediciones de la pérdida ósea explica la heterogeneidad encontrada entre los diferentes estudios.

También cabe resaltar que los resultados negativos del presente estudio se pueden deber a ciertas **modificaciones ambientales** realizadas en el protocolo, como por ejemplo el cambio de alimentación. En un primer lugar se pensó que un cambio de alimentación a *pellets* triturados con consistencia blanda podría favorecer la acumulación de biofilm y evitar el efecto de limpieza provocado por la estimulación salival al masticar elementos duros. Sin embargo, se ha observado durante todo el experimento un mayor estado de agitación y nerviosismo por parte de los animales lo cual se puede deber a la falta de elementos para roer.

No hemos encontrado información en la literatura acerca de las posibles consecuencias del cambio a alimentación blanda. No obstante, el estrés y la depresión de los animales provocados por los cambios ambientales, como se ha demostrado en experimentos *in vivo* previos, puede desencadenar un estado de inflamación sistémica, favoreciendo la aparición de periodontitis y posiblemente ocultando las diferencias entre grupos (Breivik y cols., 2006; Martínez y cols., 2021).

En cuanto a las **cepas bacterianas**, las dos cepas tradicionalmente más empleadas para la inducción de periodontitis han sido *P. gingivalis* W83 y W50 debido a la alta virulencia de las cepas (Liu y cols., 2022). En nuestro estudio se ha empleado *P. gingivalis* ATCC W83K1 y *F. nucleatum* DMSZ 20482. Como indican Igboin y cols. (2009), la cepa W83 se clasifica como virulenta, mostrando una asociación fuerte con la periodontitis. Sin embargo, otros autores como Polak y cols., (2009) han utilizado otras cepas de *P. gingivalis* (ATCC 33277), con resultados positivos, siendo esta cepa menos virulenta que la primera (Chen y cols., 2004; Igboin y cols., 2009; Polak y cols., 2009)).

Algunos autores han sugerido que el empleo de cepas más virulentas podría inducir periodontitis de forma más severa y rápida. Boyer y cols. (2020) compararon la inducción de periodontitis mediante lavados orales mediante el empleo de las cepas *P. gingivalis* W83 y *P. gingivalis* TDC60, obteniendo una mayor pérdida ósea en el grupo en el que se administró W83 (Boyer y cols., 2020). Otros autores como Liu y cols., (2022), han demostrado que la administración de *P. gingivalis* KUMC-P4 muestra una mayor capacidad de co-agregación con las bacterias comensales, provocando una mayor pérdida ósea con respecto a otras cepas de *P. gingivalis* (Liu y cols., 2022). El empleo de cepas más virulentas y que posean una mayor capacidad de co-agregación y por tanto de formar un biofilm patogénico puede valorarse en un futuro a la hora de realizar la inducción de periodontitis por lavados orales.

Por último, pese a la falta de evidencia en el modelo murino, se sugiere que pueda existir cierta **susceptibilidad genética** al desarrollo de periodontitis entre las diferentes ratas. Como se ha demostrado en el modelo humano, existen ciertos genes que favorecen el desarrollo de periodontitis, lo que puede extrapolarse al modelo animal y explicar cómo no se observan diferencias entre los grupos experimentales (Shungin y cols., 2019; Munz y cols., 2017).

6.1. Relevancia clínica del estudio

Este estudio pone de manifiesto ciertas consideraciones a la hora de poner a punto un modelo de inducción de periodontitis por lavados orales. La elección del tiempo de duración, las cepas bacterianas, las condiciones ambientales y la valoración de los registros clínicos y óseos son aspectos que pueden influenciar los resultados. La ausencia de resultados significativos pone de manifiesto que es necesario realizar ciertas modificaciones con respecto a este protocolo con el objetivo de lograr inducir periodontitis de una forma reproducible y más rápida.

6.2. Limitaciones del estudio

En cuanto a **limitaciones** del presente estudio cabe resaltar:

- a) Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* animal pueden no ser extrapolables al modelo humano.
- b) El registro de las variables clínicas se realizó mediante el empleo de una sonda periodontal estándar y magnificación. Sin embargo, debido a las dimensiones de los dientes del modelo animal, pueden no ser lo suficientemente precisas.
- c) Las medidas morfométricas y el micro-CT solo pueden ser obtenidas al finalizar el experimento, por lo que no se puede valorar la pérdida ósea con respecto al estado inicial. Del mismo modo en el presente estudio no se incluyen resultados volumétricos.
- d) El análisis de la pérdida ósea es sensible a ciertas limitaciones, comentadas anteriormente, en las que destaca principalmente las variaciones anatómicas, la colocación del modelo y la falta de referencias claras a la hora de tomar medidas 2D en un modelo 3D.
- e) El cálculo del tamaño muestral se realizó en base a los resultados previos de marcadores de neuro inflamación y no en base de registros periodontales lo que puede dar a una falta de potencia de la muestra.

6.3. Futuras líneas de investigación

Se sugieren nuevos estudios en los que se realicen modificaciones en el modelo de lavados orales, empelando cepas más virulentas, disminuyendo el tiempo de aplicación a 8 semanas y realizando un análisis de la pérdida ósea mediante un protocolo claro de Micro-CT.

También sería interesante realizar comparaciones del modelo de ligaduras con respecto a nuevos protocolos de lavados.

6.4. Papel del alumno en la presente la investigación

En la presente investigación he participado en los procesos de inducción de periodontitis mediante lavados orales inmovilizando a los animales y administrando los lavados en el animalario. También me he encargado de participar en el registro de variables clínicas al inicio y final del experimento, antes de la eutanasia de los animales. Además, he contribuido en el proceso de eutanasia de los animales preparando las dosis de anestésico y realizando la inyección del mismo.

Del mismo modo, he contribuido a la realización de las medidas de pérdida ósea mediante medidas morfométricas, preparando las muestras y realizando las medidas oportunas. Finalmente me he encargado de recoger las variables registradas y ordenarlas en base a una plantilla en una hoja de cálculo de Excel, con el objetivo de hacer la estadística.

8. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente estudio se pueden resumir en:

- (1) Las variables clínicas (inflamación) y radiológicas (pérdida ósea) obtenidas con el modelo de inducción modificada a 4, 8 y 12 semanas no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a las obtenidas por el grupo control. No obstante, los grupos P+8s y P+12s son los que mayor pérdida ósea e inflamación presentan.
- (2) Las variables clínicas (inflamación) y radiológicas (pérdida ósea) obtenidas con el modelo de inducción modificada a 12 semanas no muestran diferencias con respecto a las obtenidas por 4 u 8 semanas.
- (3) Se sugiere que el tiempo de 8 semanas puede ser adecuado a la hora de realizar un protocolo de lavados orales. Se requiere realizar modificaciones en el protocolo de lavados para lograr resultados más concluyentes y obtener un modelo más reproducible.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35.

Beck JD. Methods of assessing risk for periodontitis and developing multifactorial models. *J Periodontol*. 1994 May;65(5 Suppl):468-78.

Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:188-202.

Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res*. 2020 04;99(4):362-73.

Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Periodontol*. 2018 06;89 Suppl 1:S140-S158.

Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000*. 2018 02;76(1):43-50.

Bouchard P, Carra MC, Boillot A, Mora F, Rangé H. Risk factors in periodontology: a conceptual framework. *J Clin Periodontol*. 2017 02;44(2):125-31.

Boyer E, Leroyer P, Malherbe L, Fong SB, Loréal O, Bonnaure Mallet M, et al. Oral dysbiosis induced by *Porphyromonas gingivalis* is strain-dependent in mice. *J Oral Microbiol*. 2020 Oct 12;12(1):1832837.

Breivik T, Gundersen Y, Myhrer T, Fonnum F, Osmundsen H, Murison R, et al. Enhanced susceptibility to periodontitis in an animal model of depression: reversed by chronic treatment with the anti-depressant tianeptine. *J Clin Periodontol*. 2006 Jul;33(7):469-77.

Carasol M, Llodra JC, Fernández-Meseguer A, Bravo M, García-Margallo MT, Calvo-Bonacho E, et al. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J Clin Periodontol*. 2016 07;43(7):548-56.

Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, et al. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 2004 Aug;186(16):5473-9.

de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):465-77.

de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech*. 2018 Dec;81(12):1412-21.

de Souza AB, Okawa RT, Silva CO, Araújo MG. Short-term changes on C-reactive protein (CRP) levels after non-surgical periodontal treatment in systemically healthy individuals. *Clin Oral Investig*. 2017 Jan;21(1):477-84..

Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019 01;5(1):eaau3333.

Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, Borgnakke WS, Dye BA, Genco RJ. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *J Am Dent Assoc*. 2018 Jul;149(7):576-588.e6.

Figuero E, Han YW, Furuichi Y. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Mechanisms. *Periodontol 2000*. 2020 06;83(1):175-88.

Figuero E, Lindahl C, Marín MJ, Renvert S, Herrera D, Ohlsson O, et al. Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *J Periodontol*. 2014 Sep;85(9):1182-93.

Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2011 Oct;82(10):1469-77.

Gao J, Cai S, Wang Z, Li D, Ou M, Zhang X, et al. The optimization of ligature/bone defect-induced periodontitis model in rats. *Odontology*. 10.1007/s10266-022-00715-7

Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Feb;35(2):89-105.

Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol*. 2012;15:117-32.

Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct;10(10):717-25.

- Hill GB. Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Ann Periodontol.* 1998 Jul;3(1):222-32.
- Igboin CO, Griffen AL, Leys EJ. Porphyromonas gingivalis strain diversity. *J Clin Microbiol.* 2009 Oct;47(10):3073-81.
- Imai K, Iinuma T, Sato S. Relationship between the oral cavity and respiratory diseases: Aspiration of oral bacteria possibly contributes to the progression of lower airway inflammation. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021 Nov;57:224-30.
- Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jun 22;3:17038.
- Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1560-8.
- Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulsk-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):687-93.
- Kuraji R, Fujita M, Ito H, Hashimoto S, Numabe Y. Effects of experimental periodontitis on the metabolic system in rats with diet-induced obesity (DIO): an analysis of serum biochemical parameters. *Odontology.* 2018 Apr;106(2):162-70.
- Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol.* 2007 Jun;78(6):1120-8.
- Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *Int Dent J.* 1973 Sep;23(3):432-7.
- Liu M, Choi Y. A murine periodontitis model using coaggregation between human pathogens and a predominant mouse oral commensal bacterium. *J Periodontal Implant Sci.* 2022 Apr;52(2):141-54.
- Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clin Prev Dent.* 1986 Jan-Feb;8(1):3-6
- Loe H, Theilade E, Jensen Sb. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol (1930).* 1965 May-Jun;36:177-87.
- Martín-Hernández D, Caso JR, Bris ÁG, Maus SR, Madrigal JL, García-Bueno B, et al. Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology.* 2016 Apr;103:122-33.

Martínez M, Martín-Hernández D, Virto L, MacDowell KS, Montero E, González-Bris Á, et al. Periodontal diseases and depression: A pre-clinical in vivo study. *J Clin Periodontol.* 2021 04;48(4):503-27.

Munz M, Willenborg C, Richter GM, Jockel-Schneider Y, Graetz C, Staufenbiel I, et al. A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis. *Hum Mol Genet.* 2017 07 1;26(13):2577-88.

Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 1996 Oct;67(10 Suppl):1103-13.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol.* 1972 Jan;43(1):38.

Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:754857.

Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Jul;78(7 Suppl):1387-99.

Palombo D, Rahmati M, Vignoletti F, Sanz-Esporrin J, Haugen HJ, Sanz M. Hard and soft tissue healing around implants with a modified implant neck configuration: An experimental in vivo preclinical investigation. *Clin Oral Implants Res.* 2021 Sep;32(9):1127-41.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 06;89 Suppl 1:S173-S182.

Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2008 Apr;35(4):277-90.

Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000.* 2012 Oct;60(1):15-39.

Pirih FQ, Hiyari S, Barroso AD, Jorge AC, Perussolo J, Atti E, et al. Ligature-induced peri-implantitis in mice. *J Periodontal Res.* 2015 Aug;50(4):519-24.

Polak D, Shmueli A, Brenner T, Shapira L. Oral infection with *P. gingivalis* exacerbates autoimmune encephalomyelitis. *J Periodontol.* 2018 12;89(12):1461-6.

Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol*. 2009 May;36(5):406-10.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):21-31.

Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017 Dec;44(12):1182-91.

Romandini M, Baima G, Antonoglou G, Bueno J, Figuero E, Sanz M. Periodontitis, Edentulism, and Risk of Mortality: A Systematic Review with Meta-analyses. *J Dent Res*. 2021 01;100(1):37-49.

Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020 03;47(3):268-88.

Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020 03;47(3):268-88.

Shungin D, Haworth S, Divaris K, Agler CS, Kamatani Y, Keun Lee M, et al. Genome-wide analysis of dental caries and periodontitis combining clinical and self-reported data. *Nat Commun*. 2019 06 24;10(1):2773.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2002 Mar;29(3):260-8.

Stødle IH, Verket A, Høvik H, Sen A, Koldsland OC. Prevalence of periodontitis based on the 2017 classification in a Norwegian population: The HUNT study. *J Clin Periodontol*. 2021 09;48(9):1189-99.

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 06;89 Suppl 1:S159-S172.

Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2005 Jan;7(1):3-7.

Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Zheng D, Aukhil I, Lucas AR, et al. Periodontal pathogens invade gingiva and aortic adventitia and elicit inflammasome activation in $\alpha\beta6$ integrin-deficient mice. *Infect Immun*. 2015 Dec;83(12):4582-93.

Vignoletti F, Abrahamsson I. Quality of reporting of experimental research in implant dentistry. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation. *J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39 Suppl 12:6-27.

Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, González J, Esquifino AI, et al. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *J Periodontol*. 2018 02;89(2):176-85.

Virto L, Haugen HJ, Fernández-Mateos P, Cano P, González J, Jiménez-Ortega V, et al. Melatonin expression in periodontitis and obesity: An experimental in-vivo investigation. *J Periodontal Res*. 2018 Oct;53(5):825-31.

Zhang B, Yang Y, Yi J, Zhao Z, Ye R. Hyperglycemia modulates M1/M2 macrophage polarization via reactive oxygen species overproduction in ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res*. 2021 Oct;56(5):991-1005.

