

# INFLUENCIA DE LA DIETA Y EL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL HUESO ALVEOLAR DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA



Facultad de Odontología. Universidad de Sevilla

Trabajo Fin de Grado

Autor: Rafael de la Torre Torres

Tutor: Pedro Bullón Fernández

Sevilla, 2016

## Agradecimientos

Al Dr. Pedro Bullón Fernández, tutor de este trabajo Fin de Grado por todo el apoyo y ayuda recibidos para poder confeccionar este proyecto. Agradecerle su confianza en mi persona y esperar no haberle defraudado con todo mi esfuerzo y trabajo.

No querría abandonar mis estudios de grado y presentar un trabajo de tal envergadura sin hacer una pequeña mención a todos aquellos profesores que me han estimado y han creído en mí. A todas las personas implicadas en la facultad que han hecho posible que a día de hoy, mis compañeros y yo, estemos a las puertas de ser graduados universitarios, con el prestigio que ello conlleva.

Por todos aquellos personajes de una historia que en ocasiones quedan relegados a un segundo plano, involucrados con las distintas materias. Profesores colaboradores, asociados, equipos docentes y clínicos.

Estas palabras van dedicadas a la figura del investigador. Ámbito que descubrí en primera persona desde el pasado curso. Incansable efigie que siembra y aguarda pacientemente para ver como al cabo del tiempo tras mucha dedicación puede orgulloso recoger sus frutos.

Quiero aprovechar este escrito para mencionar a todos mis compañeros y agradecerles estos cinco maravillosos años. En especial a dos personas. Gloria, mi querida compañera de prácticas, por aguantarme, saber escucharme y ayudar a formarme como profesional. Andrea, mi pareja, la cual no habría conocido de no haber sido por esta preciosa formación, por muchos años más como actualmente.

Por último, y no por ello menos importante, a todo mi entorno fuera del ámbito universitario. Mis amigos por darme ánimos para continuar. Mi familia, con todos los altibajos sufridos a lo largo de este periodo, penas y alegrías, siempre ha estado presente cuando más lo he necesitado.

A todos, de todo corazón, GRACIAS.

El Dr. Pedro Bullón Fernández, Catedrático de Universidad del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, hace constar:

Que el proyecto que lleva por título: INFLUENCIA DE LA DIETA Y EL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL HUESO ALVEOLAR DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA, ha sido realizado por el alumno D. RAFAEL DE LA TORRE TORRES, bajo su tutela y dirección, estando conforme para su presentación como Trabajo Fin de Grado en Odontología.

Y para que conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Sevilla a 18 de mayo de 2016.

Fdo.: Pedro Bullón Fernández

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
Hipótesis .....	7
Objetivos.....	7
Materiales y método .....	8
Dieta.....	8
Envejecimiento .....	12
Resultados.....	13
Dieta.....	13
Envejecimiento .....	19
Discusión .....	22
Conclusiones.....	26
Bibliografía.....	26

**Resumen:** La pérdida de altura de hueso alveolar (HA) es un indicador de destrucción periodontal. Existen patologías asociadas a malos hábitos de vida como la dieta. Esta agresión al organismo provoca una inflamación sistémica que se potencia durante el envejecimiento, provocando reabsorción ósea. Uno de los factores involucrados en la inflamación es el inflammasoma. El objetivo de este proyecto fue determinar el papel del inflammasoma NLRP3 sobre la pérdida ósea secundaria a dietas no saludables y al envejecimiento. Dividimos a un grupo de 40 ratones hembra C57Bl/6J de 6 semanas en dos subgrupos: *Wild Type* con inflammasoma activado (WT) e inflammasoma inhibido genéticamente (NLRP3). Se subdividieron cada uno en 4 grupos: dieta estándar, obesogénica, hiperglucídica y la combinación de las dos últimas. Los del grupo de envejecimiento (20 ratones) se dividieron en WT y NLRP3 y fueron sacrificados a los 3 y 20 meses. Se realiza análisis bioquímico, procesado de las mandíbulas e interpretación de resultados. En el grupo dieta seguían un patrón similar de pérdida ósea, no se aprecian diferencias entre WT y NLRP3 a corto plazo. Se intuye una discreta tendencia. En el grupo envejecimiento apreciamos diferencias a priori estadísticamente significativas entre WT y NLRP3 mostrando un incremento de la pérdida ósea en ratones WT. La inhibición del inflammasoma NLRP3 protege de esa pérdida.

**Abstract:** Alveolar bone (AB) loss is an indicator of periodontal destruction. There are diseases associated with insane habits such as diet. This aggression causes a systemic inflammation that increases during aging, causing bone resorption. One of the factors involved in inflammation is the inflammasome. The purpose of this study was to determine the role of the inflammasome NLRP3 in the bone resorption secondary to insane diets and aging. We divided a group of 40 female mice C57BL/6J, 6 weeks old into two subgroups: Wild Type with activated inflammasome (WT) and genetically inhibited inflammasome (NLRP3). Each of them were divided into 4 groups: standard diet, obesogenic, rich in carbohydrates and the combination of the last two. The aging group (20 mice) was divided into WT and NLRP3 and were sacrificed at 3 and 20 months. We did biochemical analysis, jaws processing and results interpretation. In the diet group we observed a similar bone loss pattern. There were no differences between WT and NLRP3 in a short term. A discrete trend was shown. In the aging group we observed priori statistically significant differences between WT and NLRP3 showing an increase of bone loss in WT mice. The inflammasome NLRP3 inhibition protects against this bone resorption.

## Introducción

El principal reto de la odontología moderna no son las carillas estéticas o los implantes, temas que están en auge, sino la prevención y el control de las dos principales patologías como son la caries y la enfermedad periodontal. La creciente cantidad de azúcares que consumimos es ideal para la desmineralización del esmalte y así favorecer una enfermedad bacteriana como la caries o un estado como la obesidad<sup>1</sup>. Existe una correlación entre la prevalencia de caries dental y un alto porcentaje de masa corporal<sup>2</sup>.

La periodontitis o enfermedad periodontal está relacionada con trastornos metabólicos o estados como la ya comentada obesidad, la Diabetes Mellitus o el Síndrome Metabólico, todos ellos directamente relacionados con la ingesta de alimentos y los hábitos<sup>4</sup>. También es importante destacar el aumento de la prevalencia de la enfermedad periodontal conforme escogemos grupos de mayor edad debido a que han estado expuestos durante más tiempo a los factores promotores de destrucción periodontal (en especial de hueso alveolar).

A día de hoy, tenemos una dieta muy distinta a la de nuestros antepasados. El paso del tiempo ha instalado muchos cambios en nuestros hábitos, mentalidad y procesado de los alimentos desde que los obtenemos como materia prima hasta que los consumimos. Actualmente predominan los alimentos industriales ricos en azúcares refinados y grasas saturadas sobre los naturales o frescos.

A lo largo del paleolítico, los homínidos consumían menor cantidad de grasas con una relación de ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados, mucho más favorable. Los cambios en los hábitos dietéticos son una parte muy importante de la elevada prevalencia que existe de personas que padecen enfermedades crónicas, las cuales se encuentran más frecuentemente en el llamado “primer mundo”, en las sociedades supuestamente más civilizadas. Estas patologías han sido bastante menos frecuentes en generaciones anteriores, siendo su incremento fruto de unos hábitos de vida menos saludables a los de nuestros antepasados<sup>5,6</sup>.

Tanto la obesidad como un alto porcentaje de grasa corporal son temas muy importantes para el sistema sanitario. En Estados Unidos, se ha visto aumentado el número de personas obesas y con sobrepeso por el aumento en el consumo de grasas<sup>7</sup>. Se ha observado un incremento de personas obesas pero además desde edades muy tempranas. Se trata de un riesgo para padecer numerosos trastornos ya sea a nivel físico o mental.

Es importante destacar la edad a partir de la cual los jóvenes empiezan a tomar sus propias decisiones acerca de su alimentación. Apreciamos como a partir de los primeros años de universidad existe un incremento en la masa corporal. Es un periodo crítico el comprendido entre los 18 y 29 años, etapa marcada por importantes transiciones y momentos, destacando sobre todo aquellos jóvenes que marchan del hogar familiar, los cuales pueden desarrollar hábitos insanos que les perjudiquen en un futuro<sup>8</sup>.

Por todos es conocida la famosa pirámide alimenticia de la saludable dieta mediterránea. Propuesta como protectora de enfermedad coronaria, alteraciones metabólicas o cáncer.

De acuerdo a nuestras tradiciones, herencia cultural y la evidencia científica podemos afirmar que en la base de dicha pirámide deberían encontrarse los alimentos de tipo cereal con un bajo índice glucémico y ricos en fibra. Por el contrario, en la parte más alta de la pirámide deberían estar presentes los alimentos compuestos por granos refinados, con elevados índices glucémicos y los amiláceos.

La pirámide nutricional tal y como la conocemos fue creada en el año 1992 por el Departamento de Agricultura de los E.E.U.U. para ofrecer recomendaciones nutricionales a la población norteamericana, de forma que se redujera la prevalencia de ciertas patologías crónicas directamente relacionadas con la dieta<sup>9</sup>.

A pesar de estar considerada como una de las mejores y más sanas dietas en todo el mundo, incluso los países cuyas costas están bañadas por el mar que le da nombre a esta dieta están perdiendo su esencia, se está abandonando. Aunque pueda parecer menos importante hay que destacar lo fundamental que resulta la realización de todas las ingestas a lo largo del día, con gran importancia, el desayuno, mostrando diferencias de peso significativas<sup>10</sup>.

Tal es el nivel de ignorancia al que se ha llegado que se propone un modelo de doble pirámide invertida. Dicho modelo nos pretende hacer ver como los alimentos que se recomiendan comer más frecuentemente son aquellos que tienen menor impacto social, sobre todo en edades en las que las personas pueden ser fácilmente influenciables en aspectos alimenticios. En cambio los alimentos que mayor impacto social provocan son aquellos que se recomiendan comer en menor medida<sup>11</sup>.

Dietas basadas en productos cárnicos son más positivas socialmente hablando, además de estar íntimamente ligadas con mayores niveles de ciertos marcadores de inflamación como la interleuquina-6 (IL-6) o el fibrinógeno. La dieta mediterránea está asociada a unos bajos niveles de estos biomarcadores sugiriendo una acción antiinflamatoria y antioxidante<sup>12, 13</sup>.

Una dieta de calidad y equilibrada está asociada con unos menores niveles de inflamación sistémica. El riesgo de cáncer y de problemas cardiovasculares en un futuro están directamente relacionados con los niveles de inflamación<sup>14</sup>.

La inflamación es una respuesta de defensa del organismo frente a un ataque o peligro externo como agentes infecciosos o estrés celular. El objetivo de la inflamación es el control de las infecciones y la posterior reparación de los tejidos. Se trata de un proceso controlado que cuando aparecen alteraciones puede conllevar un serio problema inmunopatológico. Se producen múltiples citocinas, quimioquinas y mediadores inflamatorios. Las citocinas de la familia de las IL-1 $\beta$  son muy importantes. Necesitan para su funcionamiento de la activación de la caspasa-1, controlada por el complejo multimolecular del inflamasoma<sup>15</sup>.

El inflamasoma interviene tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Destacamos de la inmunidad innata su gran capacidad de reconocimiento gracias a una serie de proteínas conocidas como receptores de reconocimiento de patrones o PRR (*pattern recognition receptors*). Los PRR reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP (*pathogen associated molecular patterns*). Hay muchos tipos de PRR pero vamos a destacar los de tipo NOD, citosólicos y liberados en respuesta a alteraciones celulares denominados DAMP (*damage/ danger associated molecular patterns*) que incluyen a los: NOD1 y 2, NLRC y los NLRP (*nucleotidebinding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein*)<sup>16</sup>.

Los NLR son receptores que regulan la inflamación y la apoptosis. Las citocinas de la familia IL-1 son principalmente proinflamatorias y controlan la inducción de fiebre, cambios vasculares o alteraciones en la presión y el flujo sanguíneo<sup>16</sup>.

Se conocen 4 subunidades de inflamasomas, los cuales requieren la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) para reclutar y activar la caspasa-1. La activación de IL-1 $\beta$  e IL-18 requiere como mínimo la activación de uno de los cuatro inflamasomas<sup>16</sup>.

El inflamasoma más estudiado es el NLRP3, cuya activación permite el reclutamiento de ASC para activar a la caspasa-1, y esta a su vez lo necesario para conseguir formas biológicamente activas de IL-1 $\beta$  e IL-18. Para una activación eficiente del NLRP3 se requieren la activación de dos señales: un *priming* o una señal preestimuladora y una segunda (específica del inflamasoma NLRP3) que lleva al ensamblaje de dicho inflamasoma, aunque a día de hoy no se sabe por completo como se produce<sup>16</sup>.

Informes recientes resaltan el papel del inflamasoma en la fisiopatología de ciertas enfermedades, sobre todo de aquellas con un componente inflamatorio como la DM tipo II y la aterosclerosis. Además de desordenes metabólicos<sup>16</sup>.

Una dieta pobre e insana ha sido catalogada como factor de riesgo para padecer algunas enfermedades crónicas, muchas de ellas relacionadas con patologías orales o con la cavidad bucal. Hay pocos estudios que relacionen la dieta con la salud oral.

Una vez más ensalzamos nuestro papel como odontólogos y nos damos cuenta de la importante situación que tenemos, ya que somos nosotros los capacitados para diagnosticar lesiones orales, algunas de las cuales pueden estar relacionadas con la alimentación del individuo. Se reivindica la preparación del odontólogo en conocimientos dietéticos y la del dietista en conocimientos odontológicos pero es verdad que ambos están muy limitados.

La dieta influye en el desarrollo de la cavidad oral, pudiendo ocasionar malformaciones. El aparato estomatognático crece por periodos, existen momentos de crecimiento y otros de remisión y es crítico una buena alimentación cuando se está desarrollando. Incluso el desarrollo del embrión se puede ver alterado por una reducción en la ingesta de vitaminas y minerales por parte de la embarazada<sup>17</sup>.

Nuestra alimentación juega un papel crucial en la prevención de patologías orales graves tales como el cáncer o patologías más prevalentes, como la caries o diversas enfermedades periodontales<sup>18</sup>. La caries es la primera causa de pérdidas dentales, observándose una menor ingesta de alimentos fibrosos tales como frutas o verduras en personas parcial o totalmente edéntulas<sup>19</sup>. Las patologías periodontales suponen la segunda causa de pérdidas dentarias, afectando por encima de los 35 años al 30-40 % de la población en su forma moderada y al 6-10% en su forma avanzada. Siguiendo recomendaciones globales, con una dieta rica en frutas y verduras pero escasa en grasas y azúcares favoreceremos la salud sistémica y bucal<sup>20</sup>.

Diferentes estudios confirman la existencia de una relación directa entre diversas patologías sistémicas, tales como la Diabetes Mellitus o el síndrome metabólico, y la enfermedad periodontal. De esta forma, a través de la inducción experimental de patología sistémica en ratones mediante la dieta, queremos valorar si existe afectación del periodonto<sup>4, 21</sup>.

Algunas patologías mencionadas anteriormente tienen relación con la dieta pero desde luego, también aumentan su prevalencia con la edad, como por ejemplo las enfermedades cardiovasculares o la enfermedad periodontal (principalmente por reabsorción de hueso alveolar).

El envejecimiento es un proceso relacionado con muchas y complejas enfermedades. A pesar de todos los estudios realizados aun a día de hoy no existe un marcador indicativo del proceso de envejecimiento. Se han realizado intentos respecto a esta idea examinando figuras faciales humanas en tres dimensiones obteniendo resultados ilusionantes. Determinan que los cambios morfológicos que sufre la cara son unos muy predecibles biomarcadores de salud sistémica, más incluso que un análisis sanguíneo o la propia edad cronológica de la persona<sup>22</sup>.

Centrándonos a nivel bucofacial, nuestro campo de actuación, podemos afirmar que con la edad se produce una pérdida de la elasticidad de la piel y de los tejidos blandos, mostrando signos propios de una persona envejecida<sup>22</sup>. Además de los tejidos blandos la pérdida de volumen óseo también juega un papel crucial, produciéndose grandes cambios constatados mediante escáneres tomográficos de ciertos ángulos mandibulares<sup>23</sup>.

El envejecimiento se describe como una decadencia endógena y progresiva de los procesos fisiológicos del organismo tras la etapa reproductiva. Es un fenómeno común a todos los organismos multicelulares. Múltiples estudios revelan la relación de la dieta con cambios fisiológicos propios del envejecimiento, sobre todo respecto a una dieta rica en grasas, pero donde también influye el tipo de grasa que se ingiera<sup>24, 25</sup>.

El objetivo de este proyecto es evaluar el papel que juega el inflammasoma en la pérdida de altura de hueso alveolar por un lado en un modelo de dietas perjudiciales y por otro en un modelo de envejecimiento. Resulta muy llamativo según los resultados que expondremos a continuación y nos ilusiona a proseguir en esta senda, pero en una nueva ocasión incluyendo ambas variables a estudiar al unísono, tanto el envejecimiento como la dieta.

## **Hipótesis**

Una dieta rica en grasas y/o azúcares produciría una pérdida de inserción mayor en comparación con la suministrada presente en la dieta estándar de ratones.

Partiendo de esta premisa, planteamos que una dieta combinada rica en grasas y azúcares produciría en los ratones una mayor pérdida de altura de hueso alveolar. Siendo esta mayor en los ratones no mutados genéticamente donde pensamos que la inflamación se vería aumentada y provocaría más reabsorción ósea.

Además, es un hecho constatado que una mayor exposición al proceso de envejecimiento ocasiona una mayor pérdida de hueso alveolar en altura. Tras plantear este hecho proponemos que los ratones mutados, los cuales tienen inhibida parcialmente la inflamación sistémica, tendrán una menor pérdida de altura de hueso alveolar.

## **Objetivos**

Queremos determinar cómo afecta el papel del inflammasoma en la pérdida de altura del hueso alveolar sujeto a dos factores externos: por un lado mediante la dieta (obesogénica, hiperglucídica y la combinación de ambas) y por otro mediante el envejecimiento.

## Materiales y método

### Dieta

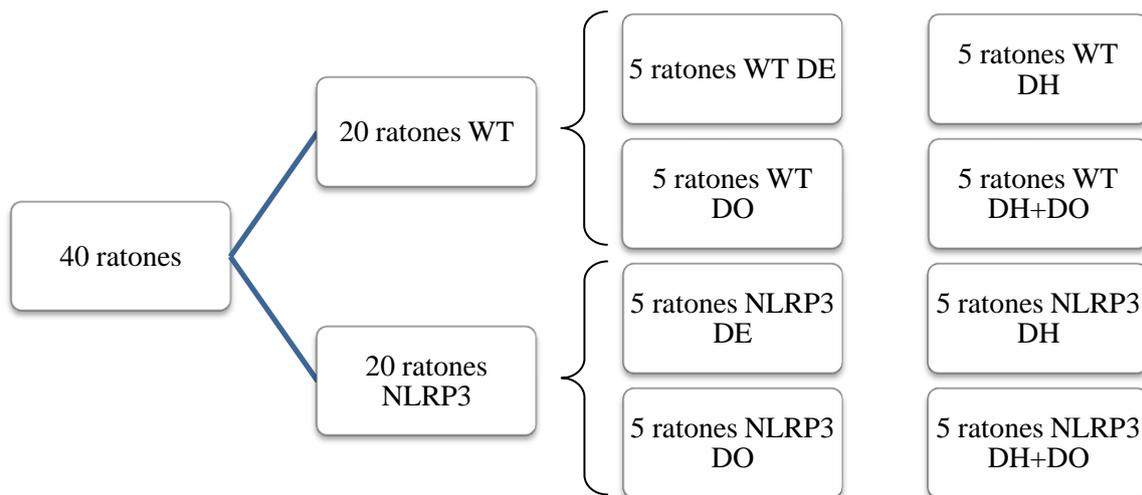
Tras la aprobación por parte del comité de ética de la Universidad de Sevilla se procede a distribuir 40 ratones hembra C57Bl/6J de 6 semanas de edad y aproximadamente 15-20 gramos de peso en 2 grupos diferentes: ratones WT y NLRP3. A su vez cada grupo se distribuirá en 4 subgrupos. Estos animales se encontrarán dentro del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, en jaulas con libre acceso a comida y agua, alternando cada 12 horas luz y oscuridad y a una temperatura constante de 25°C.

Los ratones a los que denominamos NLRP3 son animales mutados genéticamente los cuales tienen inhibido el complejo inflamasoma, productor de inflamación en el organismo conforme se avanza en edad o cuando permanecen malos hábitos de vida.

Distribuiremos a los ratones en 4 grupos (siguiente página):

1. Grupo control con dieta estándar (DE). Continuarán durante dos meses más con la dieta estándar (S.A.F.E., Scientific Animal Food & Engineering, S.L.)
2. Grupo dieta obesogénica (DO). Se alimentarán durante dos meses con una dieta rica en grasas, elaborando una mezcla compuesta por: 200 gramos de grasa, 600 gramos de pienso y 100 mililitros de agua. Inducimos una dieta suplementada en un 25% de grasa.
3. Grupo dieta hiperglucídica (DH). Se alimentarán durante dos meses con una dieta rica en azúcar elaborando una mezcla compuesta por: 320 gramos de azúcar, 680 gramos de pienso y 350 mililitros de agua. Inducimos una dieta suplementada en un 32% de azúcar.

4. Grupo dieta obesogénica + hiperglucídica (DH+DO). Se alimentarán durante 2 meses con una dieta combinada rica en grasa y azúcar elaborando una mezcla compuesta por: 200 gramos de grasa, 256 gramos de azúcar y 344 gramos de pienso. En esta ocasión no se incluyó agua en la elaboración de la mezcla. Inducimos una dieta suplementada en un 25 % de grasa y en un 32 % de azúcar.



El pienso de los ratones era específico para la fase de mantenimiento y su composición era: cebada, trigo, maíz, extracción de terrones de soja, salvado de trigo, proteínas de pescado hidrolizadas, mezcla de vitaminas y minerales, fosfato dicíclico y carbonato cálcico. Su uso está únicamente indicado para animales de experimentación.

La grasa que empleamos para elaborar la comida de los tres últimos grupos fue manteca de cerdo (elaborada en España por *El Pozo* en Murcia) que contenía los antioxidantes E-321 y E-320. La información nutricional para 400 gramos era: un valor energético de 3690,5 KJ o 897,5 Kcal, 99,7 gramos de lípidos de los cuales 37,5 eran grasas saturadas, 0,1 gramos de proteínas y 0 gramos de hidratos de carbono, sal y fibra.

Una vez transcurrido el periodo experimental de 2 meses se sacrificaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico de 200 mg/kg en solución concentrada. Se procederá a la extracción y conservación de las muestras: sangre, suero y mandíbula.

## 1. Procesado y análisis de la sangre:

Centrifugado de la sangre (10000 rpm durante 5 minutos) para separar el suero, que utilizaremos para llevar a cabo los estudios bioquímicos.

Análisis bioquímico de colesterol, azúcar o perfil oxidante-antioxidante y valoración del daño hepático a través de los niveles de transaminasas Glutamato-Oxalacetato Transaminasa (GOT) y Glutamato-Piruvato Transaminasa (GPT).

## 2. Procesado de las mandíbulas:

Las mandíbulas se sumergen en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% durante 3 días para facilitar la retirada de todo el tejido blando sobrante restante. Se retirarán los restos de tejido con ayuda de unas lupas de 10 aumentos (Olympus SZ61) e instrumental de microcirugía.

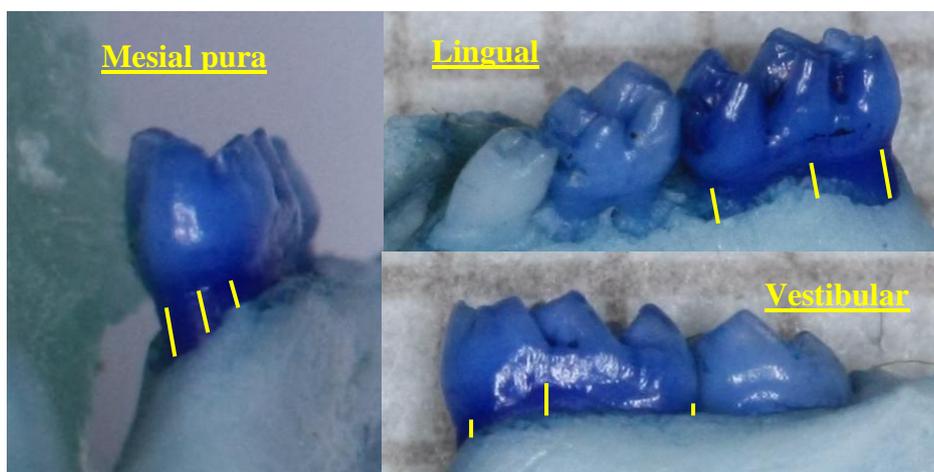
Una vez retirado todo el tejido blando alrededor de los dientes y en particular del primer premolar, se teñirán con azul de metileno al 1% durante 3 días. Posteriormente comenzaremos haciendo lavados con agua de manera diaria hasta que las mandíbulas hayan rechazado el sobrante de colorante transfiriéndoselo al agua.

El momento de la finalización de esta fase lo determinamos observando la mandíbula bajo la lupa comentada con anterioridad, y será en el momento óptimo en el que apreciemos el límite amelocementario (LAC) de los dientes. Los dientes no pueden quedar demasiado teñidos como para que no se aprecie bien el LAC, ni demasiado descoloridos (de ser así podríamos suprimir la fase de la tinción con azul de metileno).

A continuación se procederá a la fotografía del primer premolar de cada hemimandíbula en 3 planos distintos: cara mesial pura (siendo muy complejo ya que interfería la posición del incisivo central), cara lingual y cara vestibular. Pensando en su posterior estudio las fotografías se realizaron sobre papel milimetrado ayudándonos de un cubo hecho de cera para un mejor soporte de las hemimandíbulas. Los instrumentos empleados en este paso fueron: Cámara fotográfica réflex de la marca Canon modelo 450D con los siguientes parámetros: modo M (manual), velocidad de obturación de 1/100, apertura del diafragma f10 y sensibilidad ISO 400. Objetivo de la marca Canon modelo Macro Lens EF 100 mm 1:2.8 USM. Flash de la marca Canon modelo Macro Ring Lite MR-14 EX. Con ayuda del software de la cámara se configuro el flash aumentando su potencia a +1.

Se realizará un análisis morfométrico de las fotografías tomadas con ayuda del software ImageJ, midiendo la distancia existente entre el LAC y el hueso alveolar siguiendo el eje axial del diente.

Se tomaron 3 medidas por plano, una más a mesial, otra en el medio, y una tercera más a distal. Excepto en la cara mesial pura que fueron una vestibular una central y otra lingual. Se seleccionaron como puntos de referencia desde donde hacer las mediciones sitios anatómicos lo mas invariables posible, de manera que no fuera un factor que pudiera sesgar nuestros resultados.

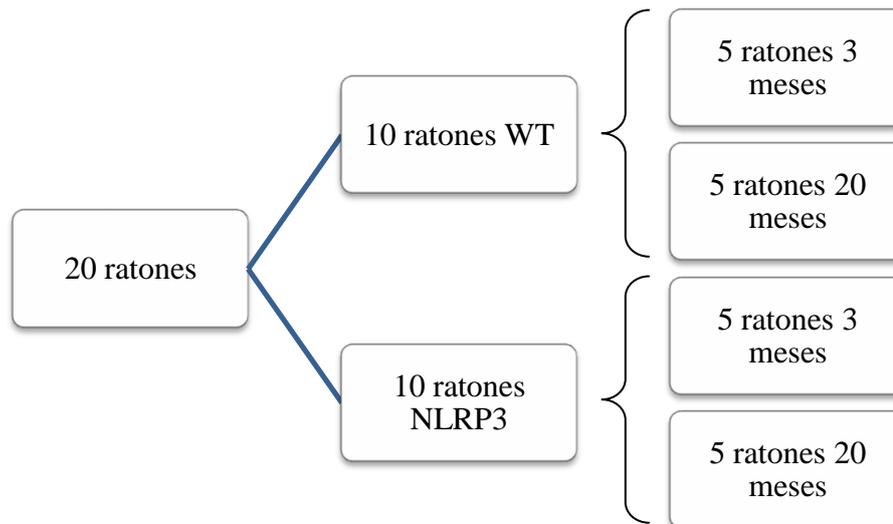


Finalmente gracias al programa Microsoft Office Excel 2007 se agruparon todos los datos en tablas obteniendo las medias y desviaciones estándar de cada una de las caras (mesial pura, vestibular y lingual) separadas por hemimandíbula (derecha e izquierda) y tipo de dieta (estándar, obesogénica, hiperglucídica e hiperglucídica mas obesogénica).

Se procedió al análisis estadístico usando este mismo programa realizando tablas de Columnas en 2D diferenciando por colores cada dieta. En el eje  $x$  se colocaron los distintos sitios donde se habían hecho las mediciones de cada diente (vestibular, centro y lingual para la cara mesial pura, y mesial centro distal para las caras vestibular y palatina) y en el eje  $y$  se colocaron los valores de pérdida de altura de hueso alveolar obtenidos en milímetros. La separación en el eje de coordenadas en todas las graficas es de 0.1 mm y el valor máximo se preestableció en 0.9 mm.

## Envejecimiento

El grupo en el cual estudiamos el envejecimiento estaba compuesto de 20 ratones hembra C57Bl/6J divididos a su vez en dos grupos: 10 sacrificados a los 3 meses y otros 10 a los 20 meses. Además cada subgrupo se volvía a dividir en 2 diferenciando la mitad de ratones NLRP3 y la otra mitad WT.



Dichos ratones permanecieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la universidad de Sevilla en iguales condiciones que los mencionados con anterioridad: temperatura, acceso a comida y agua, horas de luz y oscuridad. La alimentación de todos fue la misma, pienso específico para experimentación animal en laboratorio. En este caso el periodo experimental comenzó a diferencia del estudio anterior desde el nacimiento de los ratones y concluyó con su sacrificio, es decir, toda su vida se consideró como periodo experimental.

El procesamiento de las mandíbulas fue idéntico al que hicimos con el grupo de las dietas usando los mismos aparatos, instrumentos y programas. En esta ocasión también hicimos tablas de columnas en 2D con pequeñas modificaciones: eje x de igual manera diferenciando 3 o 20 meses con columnas de distintos colores, y en el eje y el valor máximo se estableció en 1 mm en vez de 0,9.

## Resultados

### Dieta

Ciertas mandíbulas no han podido ser estudiadas debido a: muerte del animal durante el periodo experimental, alteración anatómica, fractura o ausencia del primer premolar.

### Izquierda WT

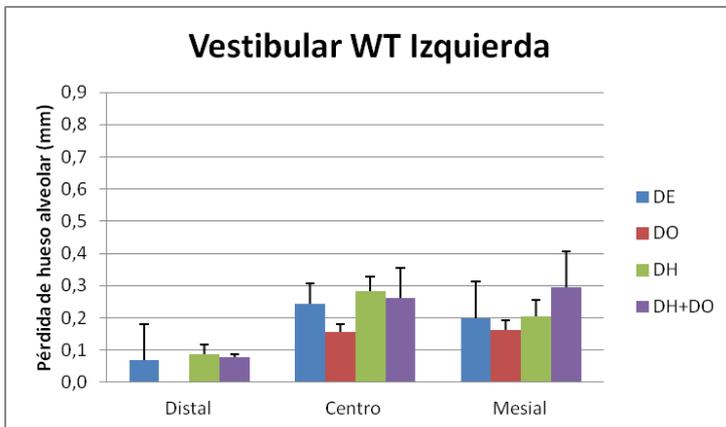


Figura 1

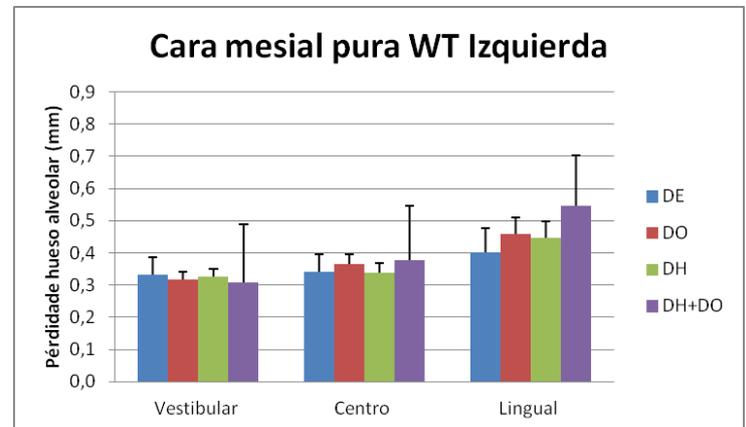


Figura 2

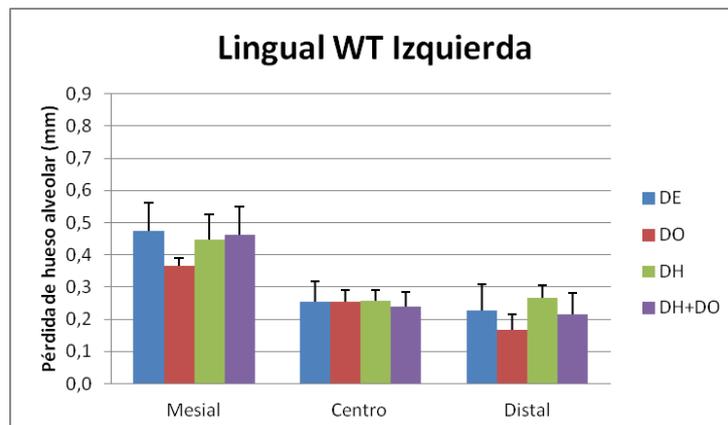


Figura 3

La cara que presenta una mayor pérdida de altura de hueso alveolar es la cara mesial pura (Fig. 2), la que menos la vestibular (Fig1). La posición que más pérdida presenta es la lingual de la cara mesial, la que menos es la distal de la cara vestibular. En una mayoría de las posiciones (5 sobre 9) la DO es la dieta con menores valores. En una mayoría de las posiciones (5 sobre 9) la DH o la DH + DO son las dietas con los valores más altos.

## Derecha WT

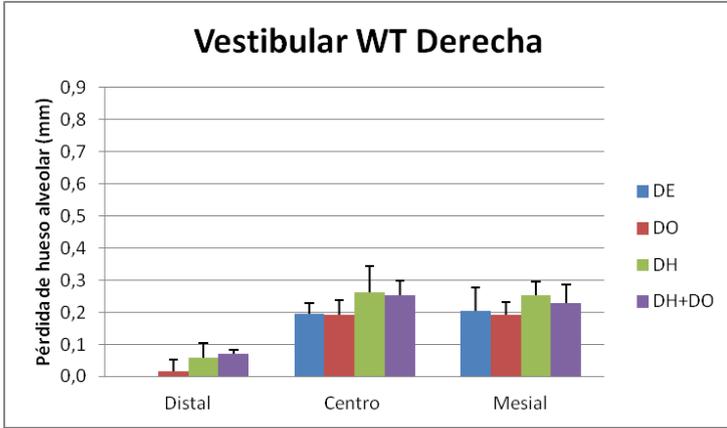


Figura 4

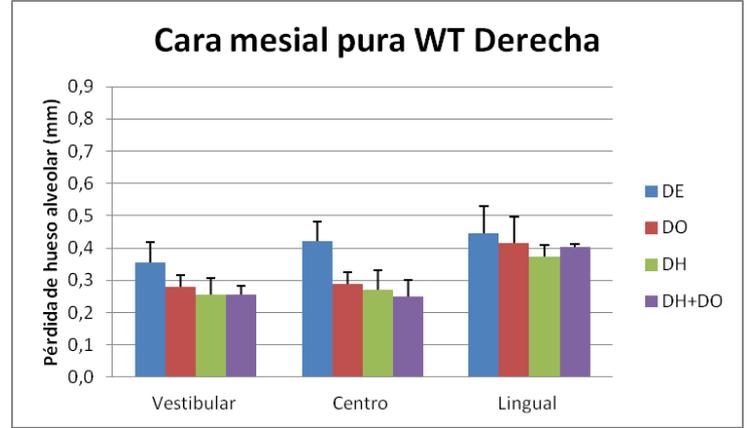


Figura 5

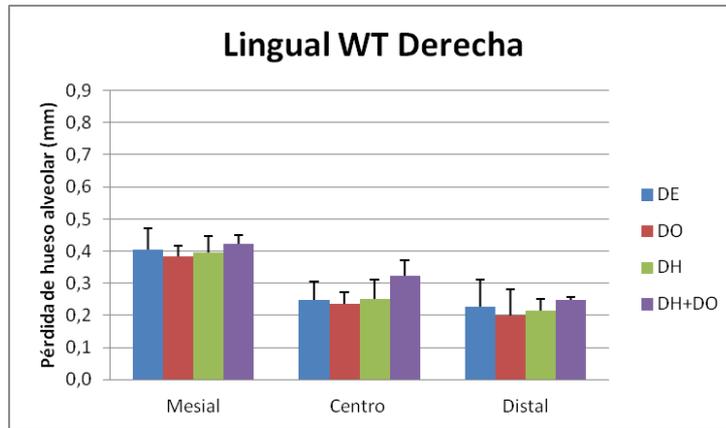


Figura 6

La cara que presenta una mayor pérdida de altura de hueso alveolar es la cara mesial pura (Fig. 5), la que menos la vestibular (Fig. 4). La posición que más pérdida presenta es la lingual de la cara mesial, la que menos es la distal de la cara vestibular. En una mayoría de las posiciones (5 sobre 9) la DO es la dieta con menores valores. En una mayoría de las posiciones (6 sobre 9) la DH o la DH + DO son las dietas con los valores más altos.

## Izquierda NLRP3

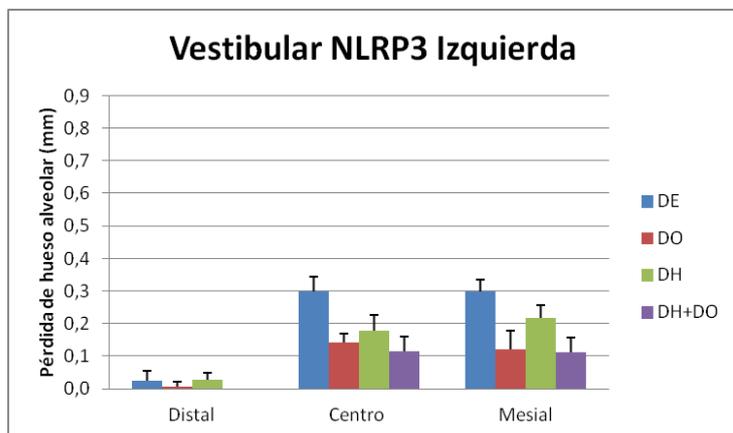


Figura 7

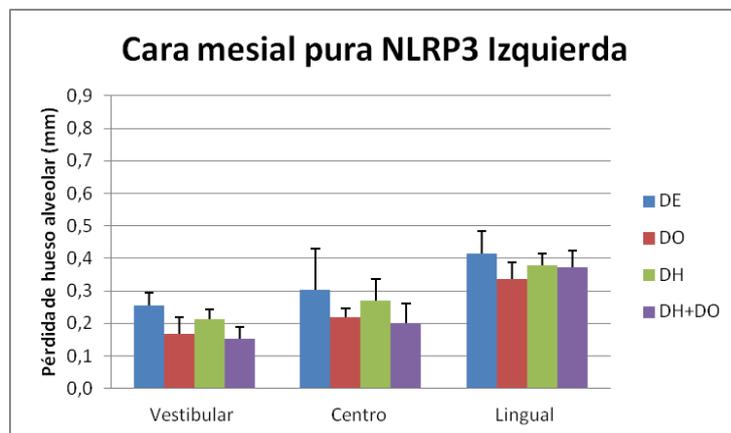


Figura 8

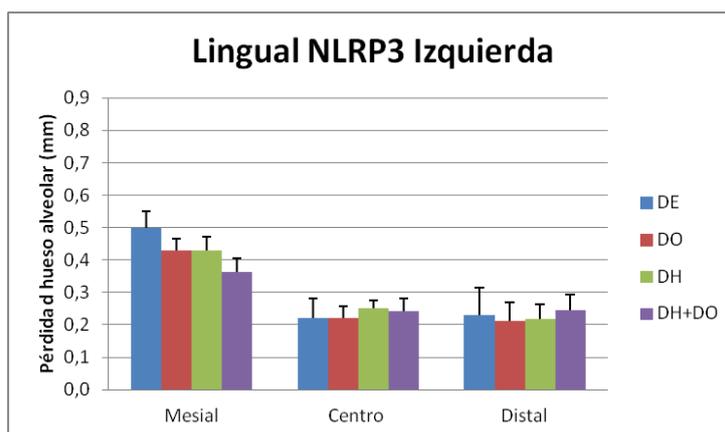


Figura 9

En esta ocasión está menos claro la cara que presenta una mayor pérdida de altura de hueso alveolar, aunque parece ser la lingual (Fig. 9), la que menos la vestibular (Fig. 7). La posición que más pérdida presenta es la mesial de la cara lingual, la que menos es la distal de la cara vestibular. En un considerable porcentaje de las posiciones (4 sobre 9) la DO es la dieta con menores valores. En una mayoría de las posiciones (6 sobre 9) la DE es la dieta con los valores más altos. Comparando las dos últimas dietas cabe destacar que en todas las posiciones excepto en una (distal de la cara lingual), la DH presenta valores más altos que la DH+DO.

## Derecha NLRP3

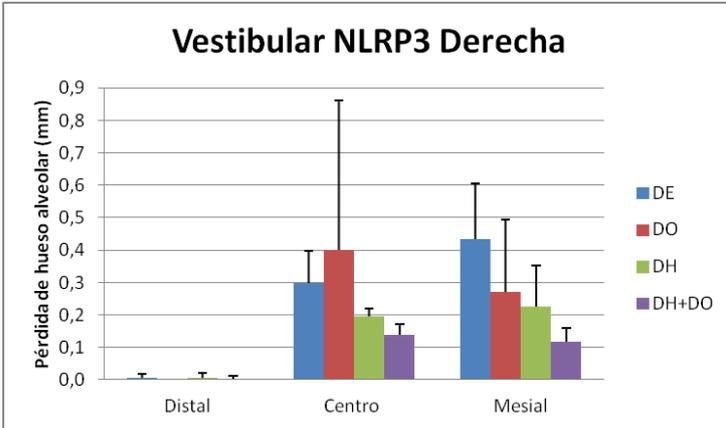


Figura 10

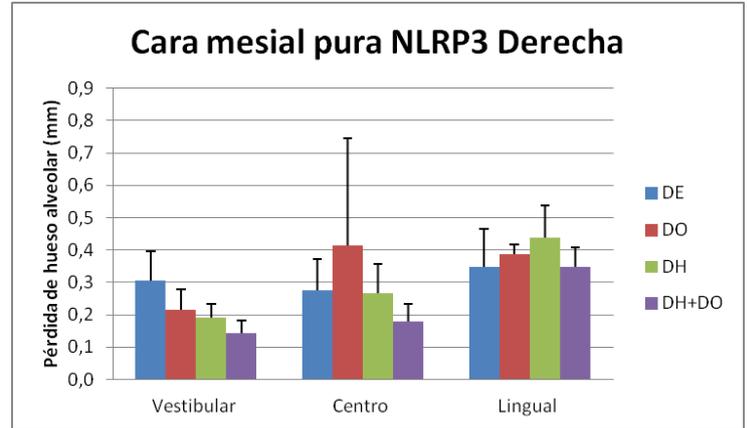


Figura 11

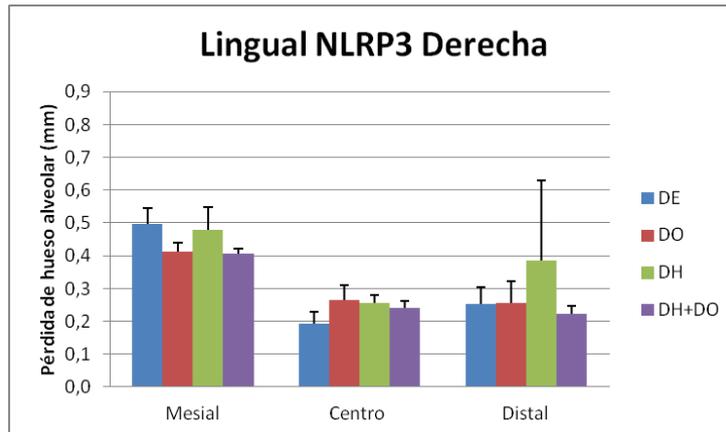


Figura 12

En esta ocasión está menos claro la cara que presenta una mayor pérdida de altura de hueso alveolar, aunque parece ser la lingual (Fig. 12), la que menos la vestibular (Fig. 10). La posición que más pérdida presenta es la mesial de la cara lingual, la que menos es la distal de la cara vestibular. En un considerable porcentaje de las posiciones (7 sobre 9) la DH+DO es la dieta con menores valores.

Existen ciertas características comunes que sería importante destacar;

Como se observa en el conjunto de tablas (Fig. 13), la progresión que seguía la pérdida ósea era similar en todos los casos yendo desde los valores más bajos en distal de la cara vestibular hasta los valores máximos que solían encontrarse en lingual de la cara mesial pura o mesial de la cara lingual. A continuación todos iban decreciendo de mesial a distal de la cara lingual.

Merece una mención especial la tendencia que se observa en los NLRP3 en comparación con los WT, donde apreciamos como levemente en ciertos puntos la pérdida ósea es menor. Esto nos anima a seguir en este camino para obtener resultados estadísticamente significativos, ya que en nuestro proyecto probablemente no sea así.

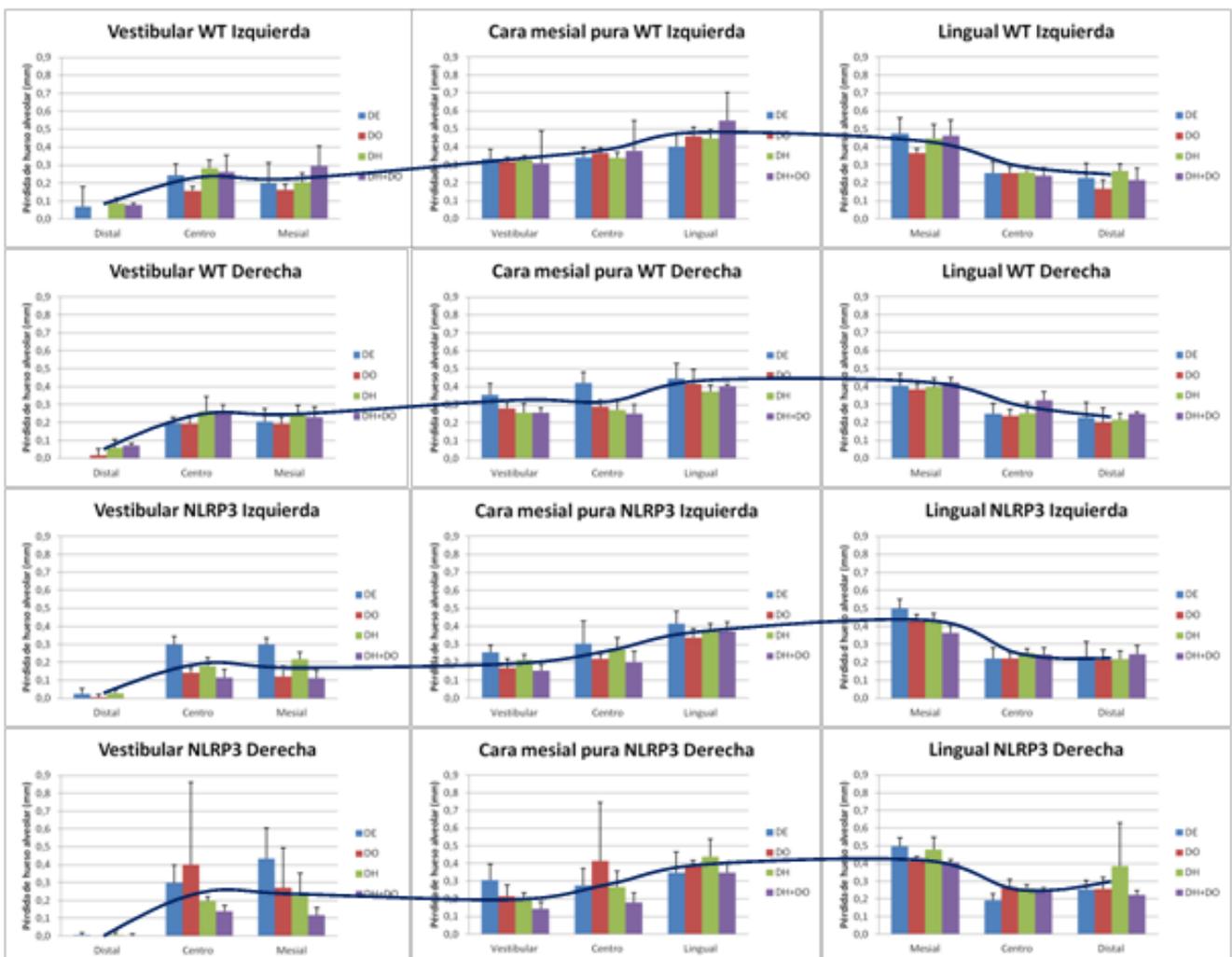


Figura 13

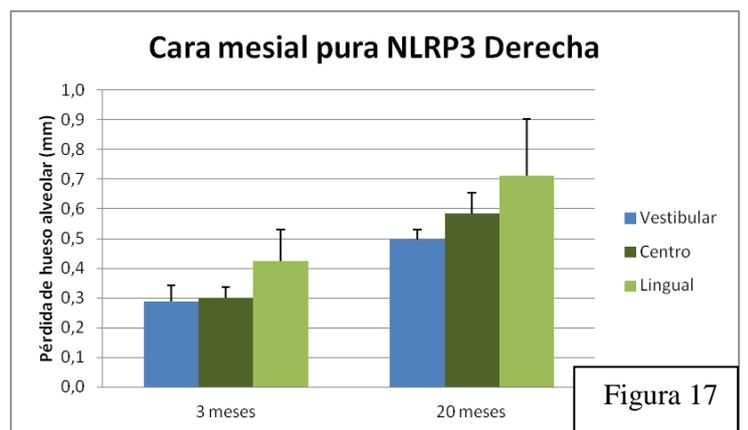
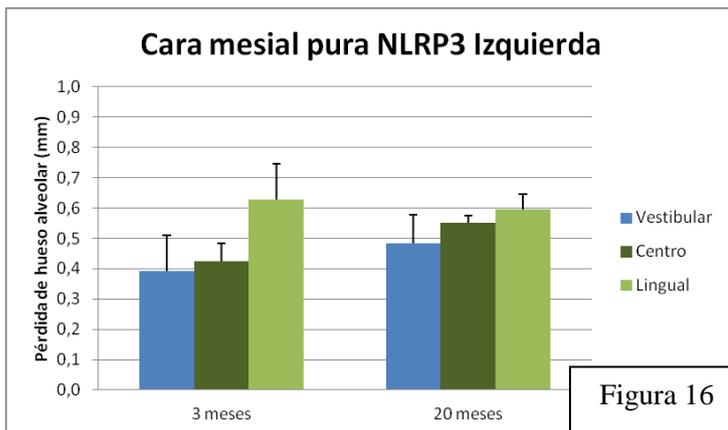
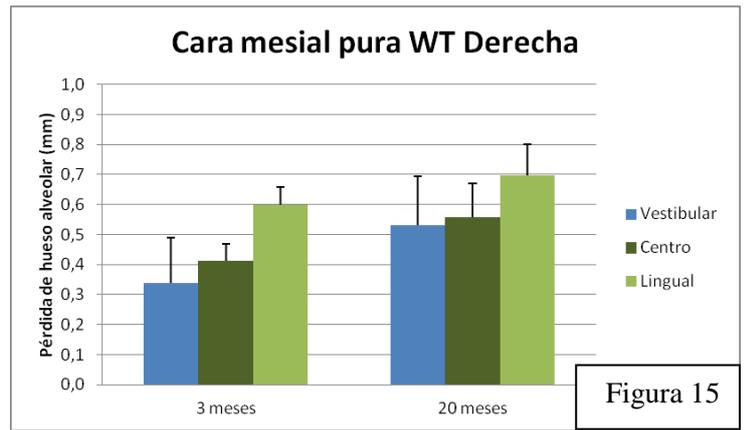
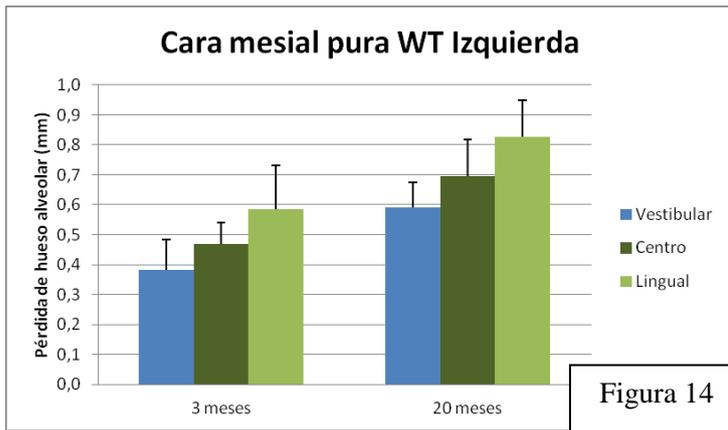
## Resultados bioquímicos

Parámetros	WT				NLRP3			
	DE	DH	DO	DH+DO	DE	DH	DO	DH+DO
Colesterol (mg/dL)	304.9 (10.5)	267.7 (16.7)	364.5 (10.9)	395 (12.3)	285.2 (8.4)	263 (9.2)	300.1 (10.8)	323.2 (11.4)
Triglicéridos (mg/dL)	37.84 (7.3)	32.29 (6.3)	34.02 (7.1)	31.94 (5.2)	48.61 (10.3)	70.13 (11.1)	66.66 (12.3)	29.38 (8.8)
Glucosa (mg/dL)	151.4 (10.5)	195.4 (11.3)	172.9 (10.6)	179.5 (10.8)	127.5 (12.4)	126.3 (10.1)	104 (9.6)	109.6 (9.4)
Albúmina (mg/dL)	2.31 (0.12)	2.02 (0.11)	3.11 (0.11)	1.72 (0.14)	1.93 (0.10)	2.38 (0.12)	2.35 (0.13)	3.04 (0.14)
Bilirrubina (mg/dL)	0.16 (0.01)	0.14 (0.02)	0.17 (0.03)	0.15 (0.02)	0.18 (0.03)	0.15 (0.02)	0.19 (0.03)	0.18 (0.02)
GOT (UL)	320.8 (97)	670.83 (105)	624.16 (115)	414.16 (98)	344.15 (91)	402.5 (99)	431.66 (113)	309.13 (110)
GPT (UL)	321.1 (101)	466.3 (111)	458.5 (105)	364.8 (99)	291.3 (91)	269.5 (101)	333.3 (112)	350 (101)
Lactato deshidrogenasa (UL)	1480 (215)	1121 (283)	4599 (393)	2667 (205)	1325 (198)	915 (101)	1218 (196)	1106 (151)
Creatin-fosfoquinasa (UL)	4436 (1001)	2115 (675)	3714 (745)	2063 (697)	3547 (845)	3857 (431)	6222 (250)	4785 (640)
Ácido Úrico (μMol/dL)	24.24 (2.3)	28.29 (1.3)	32.33 (2.1)	41.08 (1.9)	23.25 (1.5)	24.92 (2.1)	26.94 (1.9)	25.59 (1.8)
Creatinina (mg/dL)	0.64 (0.01)	2.73 (0.51)	1.92 (0.43)	0.96 (0.03)	0.80 (0.05)	1.44 (0.23)	1.12 (0.28)	0.96 (0.04)

Existe un incremento por parte de las dietas no saludables en los niveles de: colesterol, glucosa, GOT, GPT, lactato deshidrogenasa y creatinina, siendo menos significativo en los mutantes, mostrando un daño hepático (GOT y GPT), muscular (lactato deshidrogenasa) y renal (creatinina). Por tanto podemos decir que las dietas no saludables inducen cambios menos significativos cuando tenemos el complejo inflamasoma NLRP3 inhibido.

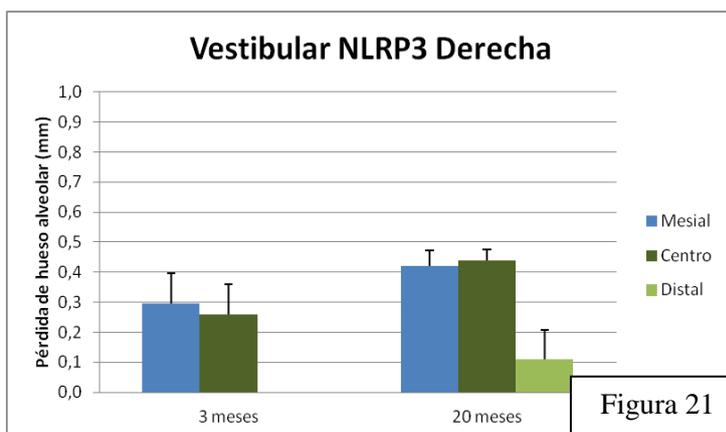
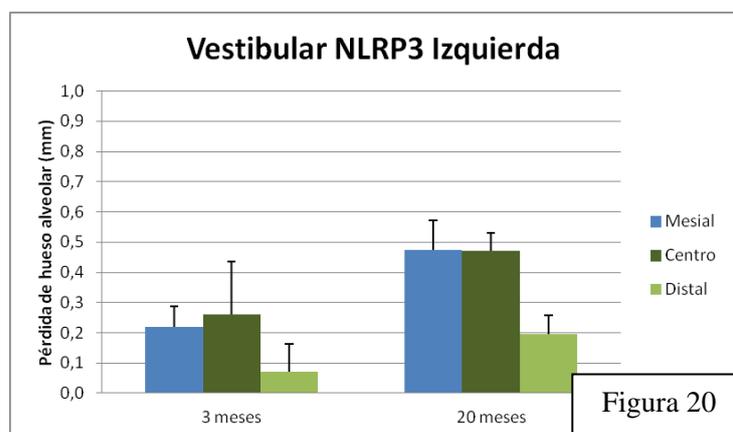
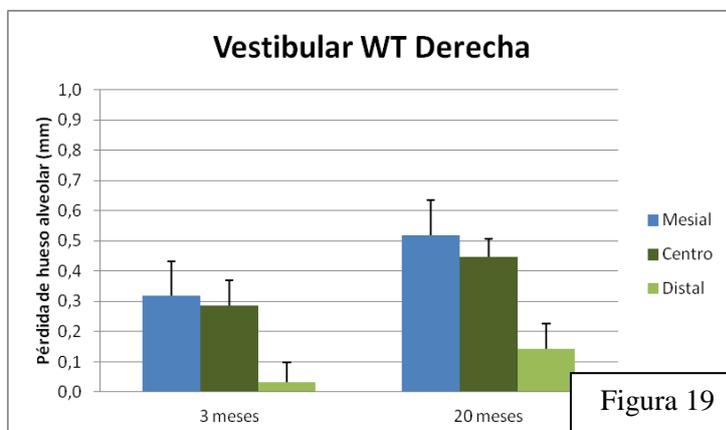
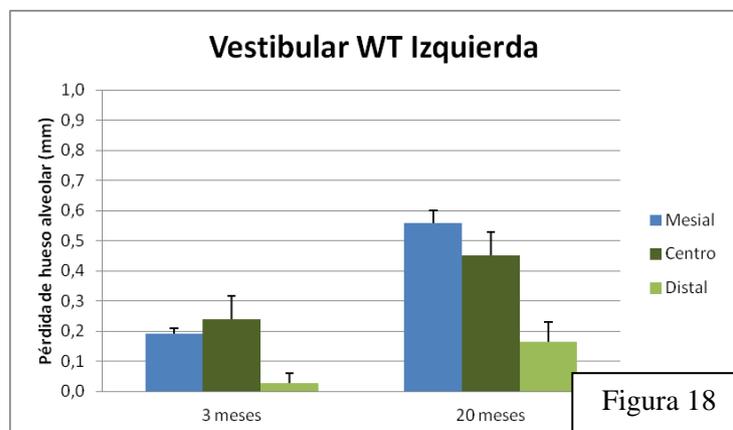
## Envejecimiento

### Cara mesial pura



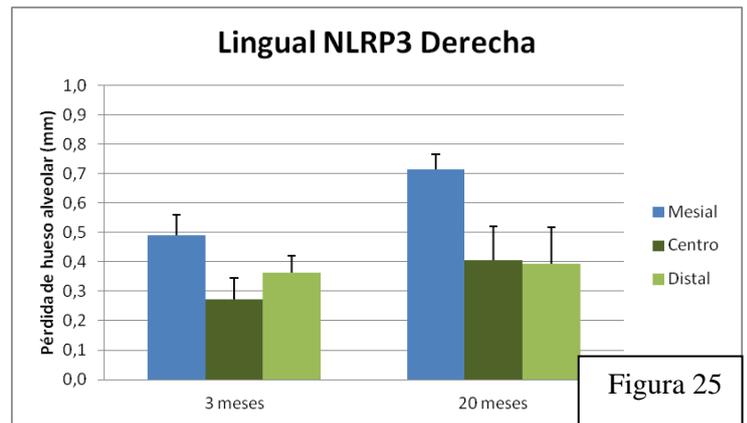
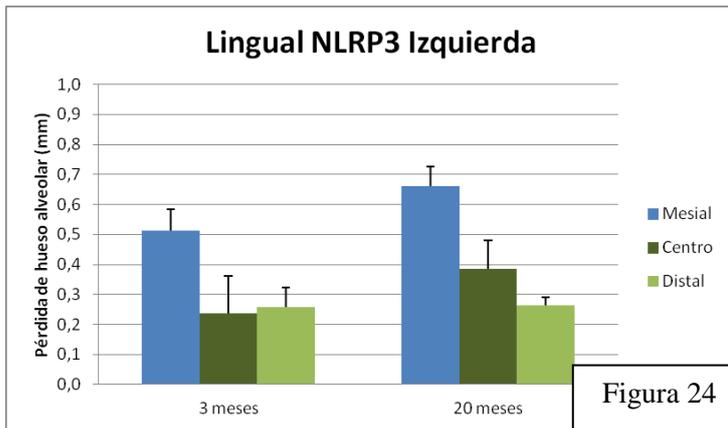
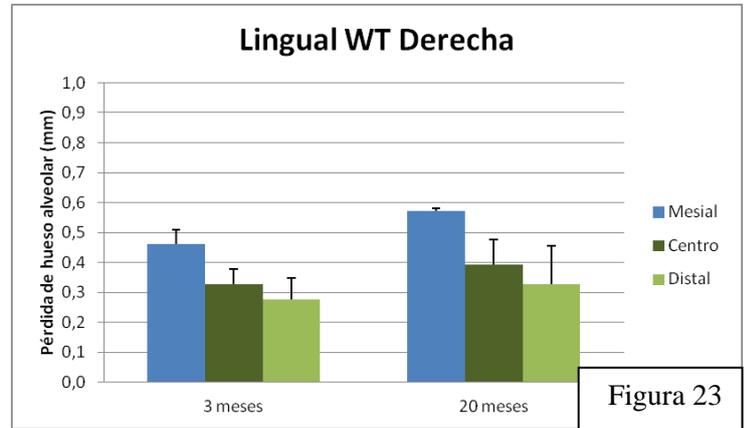
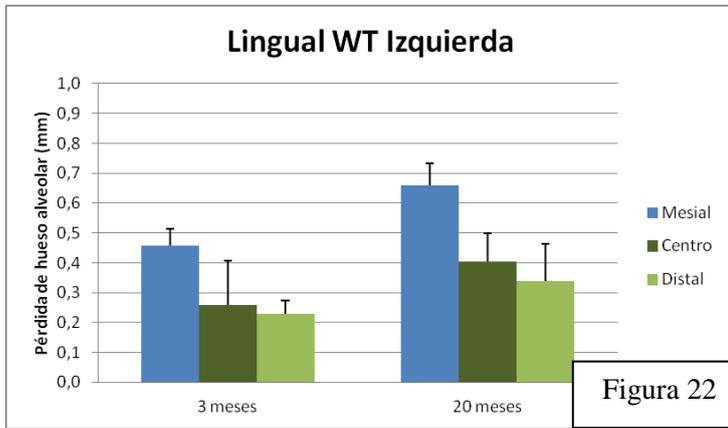
En todas las posiciones se observa cómo ha habido mayor pérdida de hueso alveolar en los ratones sacrificados a los 20 meses en comparación con los sacrificados a los 3. Ocurre en todas excepto en lingual de NLRP3 izquierda (Fig. 16). En la mayoría de las posiciones se muestra como los ratones mutados han tenido valores de pérdida ósea más bajos. Las posiciones siguen todas el mismo patrón de pérdida, siendo la posición vestibular la que menores valores tiene en todas las situaciones y la lingual la que mayores. Entre estas dos se encuentra siempre el valor de la posición centro.

## Vestibular



En todas las posiciones se observa cómo ha habido mayor pérdida de hueso alveolar en los ratones sacrificados a los 20 meses en comparación con los sacrificados a los 3. En muchas de las posiciones se muestra como los ratones mutados han tenido valores de pérdida ósea más bajos. La mayoría de las posiciones (5 sobre 8) siguen el mismo patrón de pérdida, siendo la posición distal la que menores valores suele tener y la mesial la que mayores. Entre estas dos se encuentra en un gran porcentaje de los casos el valor de la posición centro. Cuando no siguen el patrón comentado se intercambian de sitio la posición mesial y la centro, siendo la centro la mayor y la mesial la intermedia.

## Lingual



En todas las posiciones se observa cómo ha habido mayor pérdida de hueso alveolar en los ratones sacrificados a los 20 meses en comparación con los sacrificados a los 3. En algunas de las posiciones se muestra como los ratones mutados han tenido valores de pérdida ósea más bajos. La mayoría de las posiciones (6 sobre 8) siguen el mismo patrón de pérdida, siendo la posición distal la que menores valores suele tener y la mesial la que mayores. Entre estas dos se encuentra en un gran porcentaje de los casos el valor de la posición centro. Cuando no siguen el patrón comentado se intercambian de sitio la posición centro y la distal, siendo la posición centro la menor y la distal la intermedia.

Al igual que se presentara con el estudio de la dieta, existen resultados comparando todas las caras dentro del estudio del envejecimiento que quisiéramos resaltar.

Comparando la cara mesial pura, la vestibular y la lingual se aprecia como la cara que ha tenido una mayor pérdida de altura de hueso alveolar ha sido la cara mesial pura, en particular la posición lingual, que ha sido la mayor en todos los casos con diferencia. Se trataba de la única cara con ese patrón característico de pérdida ósea en el que los valores ascendían de vestibular a lingual. En las demás caras, tal y como se observa en las graficas el patrón se invertía siendo descendente de mesial a distal. La cara que menores valores de pérdida presentaba era la vestibular, en especial la posición distal.

En comparación con el estudio de la dieta, ahora si apreciamos zonas puntuales donde existen diferencias que nos atreveríamos a indicar como estadísticamente significativas entre los ratones WT y los NLRP3, aunque se trataría de una presunción ya que no contamos con el estudio estadístico de los datos.

## Discusión

En Europa, según una estadística recogida en el año 2005, al año se emplean casi 900.000 animales para la experimentación, siendo los ratones el animal que con mayor frecuencia se utiliza. Mas del 50% para ser más exactos, unos 540.000 aproximadamente. Se obtienen para distintos fines pero el principal es para estudios de biología fundamental<sup>26</sup>.

Russel y Burch publicaron en el año 1959 el libro *The Principles of Humane Experimental Technique*. Lo mencionamos por su principio de las tres erres en experimentación animal que quieren decir: Reducción, Refinamiento y Reemplazo. Cada R quiere mostrar una alternativa para controlar y mejorar el uso de animales en experimentación<sup>26</sup>

Con las alternativas de reducción se intenta usar el minimo número de animales posible para obtener datos suficientes que respondan a los objetivos del estudio.

Las alternativas de refinamiento hacen referencia a la cría de animales, procedimientos para reducir dolor, sufrimiento, así como mejorar la vida de estos animales desde su nacimiento hasta su muerte.

Las alternativas de reemplazo aluden a todos los métodos que eviten o sustituyan el uso de animales, tanto reemplazos absolutos (modelos informáticos), como relativos (por ejemplo usar invertebrados en vez de animales vertebrados que tienen una menor percepción del dolor)<sup>26</sup>.

Los roedores, tanto ratones como ratas usados para experimentación, poseen unos patrones muy similares de reabsorción ósea del hueso alveolar si los comparamos con los humanos, sobre todo si queremos relacionarlo<sup>25</sup>. Es este uno de los principales factores por los cuales usamos este tipo de animales para nuestros proyectos. Han sido adecuados ya que inducíamos una alteración sistémica. De haber tenido que examinar la cavidad oral durante la fase experimental debido al reducido tamaño probablemente no hubieran sido los animales más adecuados.

Comparando datos obtenidos en estudios entre ratones hembras y machos a los cuales se les induce una dieta rica en grasas o azúcares se observó que las hembras adquirirían más peso en las primeras 12 semanas y dicho crecimiento se enlentecía desde entonces. El reducido tiempo experimental de nuestro proyecto pudo haber sido un problema, ya que puede que se vieran más cambios metabólicos en un espacio más amplio de tiempo<sup>27</sup>.

Hemos encontrado en bases de datos científicas numerosos estudios que utilizan estos mismo ratones (C57BL/6J) para sus experimentos, tanto hembras como machos. Buscando en ellos queríamos comparar las edades a las que comenzaban los estudios y cuanto duraba el tiempo experimental.

Nuestros ratones tenían 6 semanas de edad al comenzar el periodo experimental, el cual duró 2 meses, 8 semanas. De los estudios que tenían relación con el nuestro el periodo experimental mínimo de todos ellos era de 3 meses, es decir, 12 semanas<sup>28</sup>.

Por ejemplo el estudio realizado por *Zang Y. et. al.* nos propone 92 días como tiempo experimental corto donde se pudieron apreciar variaciones y cambios metabólicos sustanciales cuando valoramos por ejemplo el peso del animal, cantidad de tejido adiposo, niveles de ciertas sustancias séricas o de la sangre<sup>29</sup>.

En concordancia con anteriores publicaciones que demuestran que una dieta rica en grasas favorece la obesidad<sup>30, 31</sup> podemos afirmar como se aprecia una inflamación a niveles de parámetros metabólicos, a nivel del tejido adiposo o el hígado. Tanto el hígado como el tejido adiposo son firmes candidatos para padecer inflamación crónica si persiste el estado de sobrepeso. La inflamación hepática no se vislumbro hasta pasadas las 40 semanas, la inflamación en el tejido adiposo se observó antes<sup>32</sup>.

Un aumento de la masa corporal favorece la inflamación y consecuentemente reabsorción ósea. Promueve un aumento de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF- $\alpha$ . Existía un aumento del número de osteoclastos y de su génesis sugiriendo la reabsorción ósea mencionada. El aumento de la reabsorción ósea de estos ratones es probablemente debido al aumento de la inflamación mediada por la acumulación de adipocitos en la medula ósea, es decir, lipotoxicidad, produciendo osteoclastogénesis y reduciendo el desarrollo de osteoblastos<sup>33</sup>.

Estuvimos comparando artículos para decidirnos por un protocolo a seguir a la hora de valorar la pérdida de altura de hueso alveolar. S.Moretti et al. nos proponían un modelo de medición de áreas en vez de distancias. En su publicación expone la pérdida ósea como un área encerrada bajo el límite amelocementario, la cresta ósea alveolar y los márgenes laterales de la raíz expuesta<sup>34</sup>. Al dar un área de toda la superficie que había sufrido reabsorción no obtenía datos de posiciones específicas. Nosotros optamos por tomar varias posiciones por cada cara pudiendo compararlas entre sí.

Nos pareció muy interesante los datos adicionales que se obtuvieron de estudios similares además de usando la imagen fotográfica y su procesado con el programa de medición correspondiente. En este caso nos referimos a la radiología convencional o la micro tomografía computerizada, pudiendo observar la microarquitectura ósea tridimensionalmente<sup>35</sup>. Además, otros estudios proponen valoraciones de la calidad ósea en regiones distintas a la cavidad oral para comprobar si existen variaciones respecto a una reabsorción en el resto del organismo<sup>35</sup>.

Otro aspecto a valorar son los distintos tipos de dietas, ya que físicamente las características del sustrato de cada una cambiaban. El pienso estándar de los ratones se presentaba en pequeños bloques cilíndricos prensados, que en comparación con los preparados de las otras dietas resultaba bastante más duro.

Con una dieta más dura se ha publicado que puede existir un aumento de la distancia entre el límite amelocementario y la cresta alveolar debido a dos motivos: por un lado una mayor reabsorción ósea del hueso alveolar y por otro una más rápida erupción dentaria debido a la dureza de la dieta<sup>36</sup>. Esto explicaría, en parte, como en ocasiones la dieta estándar posee unos valores tan elevados, incluso por encima de las demás dietas.

Podríamos hacer un símil cuando se comenta que un implante es preservador de hueso. Es cierto que lo es a pesar de necesitar de un fresado, un lecho óseo para su osteointegración. El motivo es que con ello el hueso sigue soportando cargas funcionales, continúa estando activo. Es por ello que en muchos casos es preferible colocar un implante postextracción<sup>37</sup>, de forma que evitemos la reabsorción ósea fisiológica que se produce tras la exodoncia de algún diente.

La cara que más pérdida presentaba en la mayoría de los casos era la mesial pura y lo explicaremos comparándolo a un defecto periodontal. Está estudiado que cuando el defecto es en horizontal la reducción de la profundidad de bolsas y la ganancia de inserción ocurre con más facilidad que cuando tenemos defectos verticales<sup>38</sup>.

Esto es lo que ocurre en un arcada cuando se pierde un diente quedando un tramo edéntulo. Sabemos que la exodoncia de un diente causa una reabsorción ósea del hueso alveolar<sup>39, 40</sup>. Las caras interproximales de los dientes contiguos al tramo desdentado sufren una mayor pérdida de hueso alveolar, mientras que las zonas interproximales opuestas de estos dientes al tener dientes contiguos mantienen el nivel de la cresta alveolar en su posición.

Nuestro caso se asemejaría más a un extremo libre, ya que por la propia anatomía de la mandíbula de estos ratones, a mesial del diente que nosotros estudiamos no existe diente contiguo. Existe un diente anterior por hemimandíbula, un incisivo, pero bastante alejado del diente que tomamos como referencia. Con el mismo fundamento de lo explicado anteriormente podemos decir y así confirmamos que la posición que menor pérdida presentaba era la distal.

La distancia entre el LAC y la cresta alveolar es normal que aumente conforme se avanza en edad. Son cambios fisiológicos que se producen en un periodonto normal el cual ha sido expuesto a factores agresivos a lo largo de toda una vida<sup>41</sup>.

Está muy relacionada con la edad la periodontitis por un tiempo de exposición a factores agravantes aumentado. Además, es importante comentar que en estudios realizados en ratones de esta misma cepa, se observó que los sujetos de mayor edad tenían suprimida la expresión de ciertos inhibidores de la inflamación, dando un descenso en los niveles de citoquinas inhibitorias de la inflamación<sup>42</sup>.

Los esteroides sexuales son fundamentales para el desarrollo del esqueleto, la homeostasis ósea, la función inmunológica y la reproducción. Con la edad se produce un descenso en los niveles de esteroides, incrementando la susceptibilidad a periodontitis y reabsorción alveolar<sup>43</sup>.

Lo aportado por el presente estudio nos alienta a continuar por esta senda en la cual aún queda mucho por hacer. Proponemos aportar datos adicionales así como un análisis estadístico completo y profundo de los resultados. Todo ello y más esperamos que sea objeto de estudio en proyectos futuros de mayor envergadura.

## **Conclusiones**

La inducción de patología sistémica mediante la dieta en un corto espacio de tiempo no supone diferencia de pérdida alveolar respecto a una dieta estándar. En un breve periodo experimental los ratones mutados no presentaron menor pérdida alveolar en comparación con los no mutados.

Ratones de mayor edad tiene mayores pérdidas de altura de hueso alveolar. En algunos ratones con el complejo inflamatorio inhibido se observó una menor destrucción periodontal.

## **Bibliografía**

1. Freeman R. Moderate evidence support a relationship between sugar intake and dental caries. *Evid Based Dent*. 2014 Dec;15(4):98-9.
2. Saido M, Asakura K, Masayasu S, Sasaki S. Relationship Between Dietary Sugar Intake and Dental Caries Among Japanese Preschool Children with Relatively Low Sugar Intake (Japan Nursery School SHOKUIKU Study): A Nationwide Cross-Sectional Study. *Matern Child Health J*. 2016 Mar;20(3):556-66.

3. Costacurta M, DiRenzo L, Sicuro L, Gratteri S, De Lorenzo A, Docimo R. Dental caries and childhood obesity: analysis of food intakes, lifestyle. *Eur J Paediatr Dent*. 2014 Dec;15(4):343-8.
4. Bullon P, Jaramillo R, Santos-Garcia R, Rios-Santos V, Ramirez M, Fernandez-Palacin A, Fernandez-Riejos P. Relation of periodontitis and metabolic syndrome with gestational glucose metabolism disorder. *J Periodontol*. 2014 Feb;85(2):1-8.
5. Gibson TM, Ferrucci LM, Tangrea JA, Schatzkin A. Epidemiological and clinical studies of nutrition. *Semin Oncol*. 2010 Jun;37(3):282-96.
6. Chauveau P, Fouque D, Combe C, Aparicio M. Evolution of the diet from the paleolithic to today: progress or regress?. *Nephrol Ther*. 2013 Jul;9(4):202-8 .
7. Morgan AZ, Keiley MK, Ryan AE, Radomski JG, Gropper SS, Connell LJ, Simmons KP, Ulrich PV. Eating regulation styles, appearance schemas, and body satisfaction predict changes in body fat for emerging adults. *J Youth Adolesc*. 2012 Sep;41(9):1127-41.
8. Morgan AZ, Keiley MK, Ryan AE, Radomski JG, Gropper SS, Connell LJ, Simmons KP, Ulrich PV. Eating regulation styles, appearance schemas, and body satisfaction predict changes in body fat for emerging adults. *J Youth Adolesc*. 2012 Sep;41(9):1127-41.
9. D'Alessandro A, De Pergola G. Mediterranean diet pyramid: a proposal for Italian people. *Nutrients*. 2014 Oct 16;6(10):4302-16.
10. Navarro-González I, López-Nicolás R, Rodríguez-Tadeo A, Ros-Berruezo G, Martínez-Marín M, Doménech-Asensi G. Adherence to the Mediterranean diet by nursing students of Murcia (Spain). *Nutr Hosp*. 2014 Jul 1;30(1):165-72.
11. Ruini LF, Ciati R, Pratesi CA, Marino M, Principato L, Vannuzzi E. Working toward Healthy and Sustainable Diets: The "Double Pyramid Model" Developed by the Barilla Center for Food and Nutrition to Raise Awareness about the Environmental and Nutritional Impact of Foods. *Front Nutr*. 2015 May 4;2:9.
12. Bonaccio M, Cerletti C, Iacoviello L, de Gaetano G. Mediterranean diet and low-grade subclinical inflammation: the Moli-sani study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(1):18-24.
13. Koloverou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Georgousopoulou EN, Grekas A, Christou A, Chatzigeorgiou M, Skoumas I, Tousoulis D, Stefanadis C; ATTICA Study Group. Adherence to Mediterranean diet and 10-year incidence

- (2002-2012) of diabetes: correlations with inflammatory and oxidative stress biomarkers in the ATTICA cohort study. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 Jan;32(1):73-81.
14. Dias JA, Wirfält E, Drake I, Gullberg B, Hedblad B, Persson M, Engström G, Nilsson J, Schiopu A, Fredrikson GN, Björkbacka H. A high quality diet is associated with reduced systemic inflammation in middle-aged individuals. *Atherosclerosis.* 2015 Jan;238(1):38-44.
  15. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 2010 Mar;40(3):599-606.
  16. Hernández J. C. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia* 2012 Dic; 25 (4): 380-390.
  17. Scardina GA, Messina P. Good oral health and diet. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:720692.
  18. Moynihan PJ. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bull World Health Organ.* 2005 Sep;83(9):694-9.
  19. Moynihan P. The interrelationship between diet and oral health. *Proc Nutr Soc.* 2005 Nov;64(4):571-80.
  20. Lanza E, Schatzkin A, Daston C, Corle D, Freedman L, Ballard-Barbash R, Caan B, Lance P, Marshall J, Iber F, Shike M, Weissfeld J, Slattery M, Paskett E, Mateski D, Albert P; PPT Study Group. Implementation of a 4-y, high-fiber, high-fruit-and-vegetable, low-fat dietary intervention: results of dietary changes in the Polyp Prevention Trial. *Am J Clin Nutr.* 2001 Sep;74(3):387-401.
  21. Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? *J Dent Res.* 2009 Jun;88(6):503-18.
  22. Chen W, Qian W, Wu G, Chen W, Xian B, Chen X, Cao Y, Green CD, Zhao F, Tang K, Han JD. Three-dimensional human facial morphologies as robust aging markers. *Cell Res.* 2015 May;25(5):574-87.
  23. Rohrich RJ, Pessa JE. Discussion. Aging of the facial skeleton: aesthetic implications and rejuvenation strategies. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Jan;127(1):384-5.
  24. Bullon P, Battino M, Varela-Lopez A, Perez-Lopez P, Granados-Principal S, Ramirez-Tortosa MC, Ochoa JJ, Cordero MD, Gonzalez-Alonso A, Ramirez-Tortosa CL, Rubini C, Zizzi A, Quiles JL. Diets based on virgin olive oil or fish oil but not on sunflower oil

- prevent age-related alveolar bone resorption by mitochondrial-related mechanisms. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74234.
25. Varela-Lopez A, Bullon P, Battino M, Ramirez-Tortosa M, Ochoa JJ, Cordero MD, Ramirez-Tortosa CL, Rubini C, Zizzi A, Quiles JL. Coenzyme Q Protects Against Age-Related Alveolar Bone Loss Associated to n-6 Polyunsaturated Fatty Acid Rich-Diets by Modulating Mitochondrial Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016 May;71(5):593-600.
  26. Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Adler S, Riebeling C, Luch A. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol*. 2011 Aug;85(8):841-58.
  27. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004 Dec;53 Suppl 3:S215-9.
  28. Collins GT, Chen Y, Tschumi C, Rush EL, Mensah A, Koek W, France CP. Effects of consuming a diet high in fat and/or sugar on the locomotor effects of acute and repeated cocaine in male and female C57BL/6J mice. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2015 Aug;23(4):228-37.
  29. Zang Y, Igarashi K, Yu C. Anti-obese and anti-diabetic effects of a mixture of daidzin and glycitin on C57BL/6J mice fed with a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79(1):117-23.
  30. Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2011 Oct;60(10):2474-83.
  31. Lanthier N, Molendi-Coste O, Cani PD, van Rooijen N, Horsmans Y, Leclercq I. Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *FASEB J*. 2011 Dec;25(12):4301-11.
  32. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, Gruben N, Youssef SA, de Bruin A, Hofker MH, Kleemann R, Koonen DP, Heeringa P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*. 2015 Apr;7(4):256-68.
  33. Halade GV, El Jamali A, Williams PJ, Fajardo RJ, Fernandes G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. *Exp Gerontol*. 2011 Jan;46(1):43-52.

34. Moretti S, Bartolommei L, Galosi C, Renga G, Oikonomou V, Zamparini F, Ricci G, Borghi M, Puccetti M, Piobbico D, Eramo S, Conti C, Lomurno G, Bartoli A, Napolioni V, Romani L. Fine-tuning of Th17 Cytokines in Periodontal Disease by IL-10. *J Dent Res.* 2015 Sep;94(9):1267-75.
35. Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, Resch H, Moser D, Zysset PK, Stulnig TM, Pietschmann P. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism.* 2011 Feb;60(2):243-9.
36. Gustafson GT, Axrup K, Göthson-Gustafson F, Wall S. Studies on dental and periodontal conditions in normal mice and mice with genetic disorders. I. The effect of a hard diet or a soft sucrose-rich diet in the absence or presence of *Streptococcus mutans* in the normal (non-gnotobiotic) mouse, strain C57BL/6J. *Swed Dent J.* 1987;11(5):201-22.
37. Tadi DP, Pinisetti S, Gujjalapudi M, Kakaraparthi S, Kolasani B, Vadapalli SH. Evaluation of initial stability and crestal bone loss in immediate implant placement: An in vivo study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2014 Sep;4(3):139-44.
38. Choi YM, Lee JY, Choi J, Joo JY. Effect of root planing on the reduction of probing depth and the gain of clinical attachment depending on the mode of interproximal bone resorption. *J Periodontal Implant Sci.* 2015 Oct;45(5):184-9.
39. Arai Y, Aoki K, Shimizu Y, Tabata Y, Ono T, Murali R, Mise-Omata S, Wakabayashi N. Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. *Eur J Pharmacol.* 2016 Jul 5;782:89-97.
40. Mays S. Resorption of mandibular alveolar bone following loss of molar teeth and its relationship to age at death in a human skeletal population. *Am J Phys Anthropol.* 2014 Apr;153(4):643-52.
41. Vizzotto MB, Rösing CK, de Araujo FB, Silveira HE. Radiographic evaluation of alveolar bone height in the primary dentition: a retrospective follow-up study. *Pediatr Dent.* 2011 Jul-Aug;33(4):312-5.
42. Jin Y, Wang LY, Liu DX, Lin XP. Characteristics of the immune status in aged mice with experimental periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2014 Dec;23(6):669-74.
43. Shiau HJ, Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Influence of sex steroids on inflammation and bone metabolism. *Periodontol 2000.* 2014 Feb;64(1):81-94.

