

# Papel del receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II en la remodelación ósea que ocurre durante la periodontitis experimental en la rata

## Role of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor in bone remodeling that occurs during experimental periodontitis in rats

MARÍA GABRIELA MATOS<sup>1</sup>, LOURDES PERDOMO<sup>2</sup>, MARCO ÁLVAREZ<sup>2</sup>, ANITA ISRAEL<sup>1</sup>,  
MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO<sup>1</sup>

### RESUMEN

La periodontitis es una patología inflamatoria, de origen infeccioso, cuyo factor etiológico primario es la formación de la biopelícula bacteriana, que conduce a la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes. La periodontitis puede ser inducida en las ratas por inyección de toxinas bacterianas como los lipopolisacáridos (LPS), que inducen la infiltración de leucocitos polimorfonucleares en los tejidos periodontales inflamados, la estimulación de los osteoclastos y la destrucción del colágeno. Se ha reportado que la angiotensina II (ANG II) puede actuar como un factor proinflamatorio aunque se desconoce su papel y el de su receptor AT<sub>1</sub> en la periodontitis. Por ello, se evaluó el papel de la ANG II/AT<sub>1</sub> en un modelo animal de periodontitis inducida por LPS en la rata, mediante el uso de un bloqueante de los receptores AT<sub>1</sub>, el valsartán (VAL). Se emplearon ratas machos *Sprague Dawley*, las cuales se sacrificaron por decapitación y se tomaron muestras de sangre periférica para determinar el número de leucocitos y su recuento diferencial. Los maxilares inferiores fueron disecados, fijados, desmineralizados y deshidratados para la evaluación de la pérdida ósea. Se determinó la movilidad dentaria. Se evaluó la presencia de fibras colágenas mediante tinción Tricrómico de Masson, los depósitos de calcio mediante la tinción de Von-Kossa, y se realizó el recuento de osteoclastos en tejido. Los datos demuestran que los animales no mostraron signos aparentes de enfermedad sistémica a los 7 días. El tratamiento con LPS indujo una pronunciada leucocitosis, pérdida ósea considerable por la disminución de los depósitos de calcio y de fibras de colágeno y aumento del recuento de osteoclastos. Todos estos efectos del LPS fueron prevenidos por el tratamiento crónico con valsartán. Los resultados confirman que la inyección de LPS en la encía de la rata produce una respuesta inflamatoria que progresa rápidamente a periodontitis, y sugieren que la respuesta del huésped en la periodontitis puede ser prevenida mediante el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub>. Esto abre oportunidades terapéuticas en la investigación clínica y el tratamiento de enfermedades inflamatorias como es el caso de la periodontitis.

**Palabras clave:** Angiotensina II, valsartán, periodontitis, resorción ósea.

### ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory disease, of infectious origin, which the primary etiologic factor is bacterial biofilm formation that leads to destruction of the supporting structures of the teeth. Periodontal disease can be induced in rats by injecting bacterial toxins such as lipopolysaccharides (LPS), which induces polymorphonuclear leukocyte infiltration in the inflamed periodontal tissues, stimulation of osteoclasts and collagen destruction. It has been reported that angiotensin II (ANG II) can act as a proinflammatory factor, although its role and its AT<sub>1</sub> receptor in periodontitis is unknown. Therefore, we assessed the role of Ang II / AT<sub>1</sub> in an animal model of LPS-induced periodontitis in the rat, using an AT<sub>1</sub> receptor blocker, valsartan (VAL). *Sprague Dawley* male rats were used, which were sacrificed by decapitation and peripheral blood samples were taken to determine the number of leukocytes and their differential counting. The mandibles were dissected, fixed, demineralized and dehydrated to assess bone loss. Tooth mobility was determined. The presence of collagen fibers by Masson's trichrome staining, calcium deposits by the Von-Kossa staining was evaluated, and the count of osteoclasts in tissue was performed. The data demonstrate that the animals showed no apparent signs of systemic disease after 7 days. LPS treatment resulted in a pronounced leukocytosis, sig-

<sup>1</sup> Laboratorio de Neuropéptidos. Facultad de Farmacia.

<sup>2</sup> Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela.

E-mail: [mrqarrido1@hotmail.com](mailto:mrqarrido1@hotmail.com) oficina: 0212-58-6052689.

nificant bone loss by decreasing the calcium deposits and collagen fibers and increased osteoclast count. All these effects of LPS were prevented by chronic treatment with valsartan. The results confirm that injection of LPS into rat gingiva produces an inflammatory response to a progressive periodontitis, and suggest that the host response in periodontitis can be prevented by blocking the AT<sub>1</sub> receptor. This opens up therapeutic opportunities in clinical research and treatment of inflammatory diseases such as periodontitis.

**Key words:** Angiotensin II, valsartán, periodontitis, bone resorption.

## Introducción

Las enfermedades periodontales son patologías de origen infeccioso con una alta prevalencia en la población mundial. Estas patologías pueden presentarse de forma aguda, crónica e incluso agresiva y conducen a la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes con graves consecuencias tanto funcionales como estéticas, llegando incluso a la pérdida de las piezas dentales como es el caso de la periodontitis (Papapanou, 1996; Flemmig, 1999).

El factor etiológico primario de la enfermedad periodontal es la formación de la biopelícula bacteriana, donde predominan las bacterias Gram negativas, las cuales poseen una plétora de componentes tanto estructurales como secretados que pueden causar directamente la destrucción del tejido periodontal o estimular a las células del hospedador para activar un amplio rango de respuestas inflamatorias. Estas respuestas están encaminadas a eliminar el agresor bacteriano pero a menudo pueden causar daño posterior (Guilarte y Perrone, 2004).

La patogénesis de la periodontitis crónica es un proceso secuencial que se inicia con la infección del surco gingival por bacterias Gram negativas anaerobias (estrictas o facultativas), seguida por la formación del saco periodontal, la destrucción del tejido conectivo y la pérdida de hueso alveolar (Bascones y González, 2003).

Como se sabe, el hueso es un tejido metabólicamente activo y altamente organizado que consiste de una fase mineral de hidroxiapatita y de una matriz orgánica. A su vez, la matriz orgánica ósea está constituida por un componente orgánico formado por fibras de colágeno, un componente inorgánico en forma de hidroxiapatita de calcio y 5% de agua. La resorción ósea involucra una serie de fases celulares dirigidas hacia la disolución de los constituyentes minerales o inorgánicos y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea por parte de los osteoclastos y controlada por los osteoblastos (Cochran, 2008). El equilibrio entre estos dos eventos puede ser alterado en situaciones patogénicas. Específicamente a nivel bucal, las endotoxinas de las bacterias Gram negativas, más otros metabolitos bacterianos

en la placa dental, son capaces de producir una cascada inflamatoria que causa pérdida en la altura de la cresta ósea (Page y Kornman, 1997). La asociación entre la microflora Gram negativa y la pérdida ósea es de suma importancia puesto que la pérdida de la cresta ósea alveolar es un evento característico en la progresión de la periodontitis que involucra un desequilibrio entre la formación y la resorción ósea (remodelado óseo) (Fleisch, 1997). Igualmente, los productos bacterianos pueden también inducir la secreción de mediadores inflamatorios por parte de las células del hospedador, alterando el estado de equilibrio entre la formación y la resorción ósea (Bascones y González, 2003).

Por otra parte, se sabe que adicionalmente a su papel en la regulación hidromineral y del control de la presión arterial, el sistema renina-angiotensina (SRA) es un mediador clave en los procesos inflamatorios (Saavedra y col., 2011). Efectivamente, se ha demostrado que la angiotensina II (ANG II), a través de su receptor AT<sub>1</sub>, es capaz de iniciar una cascada inflamatoria mediada por la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación del factor nuclear κB (NF-κB) (Kim y col., 2011; 2012). Ahora bien, existe evidencia creciente de la presencia de un sistema renina-angiotensina local a nivel de tejidos periodontales que podría estar involucrado en los procesos inflamatorios. Así, se ha demostrado la presencia de los componentes del SRA, especialmente la presencia de receptores de la ANG II en la pulpa dental (Souza y col., 2007), el tejido gingival y en cultivo de fibroblastos de diversas especies (Santos y col., 2009). Aun más, se ha descrito la presencia de todos los componentes del SRA en el tejido gingival de la rata, el cual es capaz de generar la ANG II y péptidos derivados (Santos y col., 2009). Se desconoce hasta el presente el papel de la ANG II en los procesos inflamatorios implicados en la periodontitis. Por ello resulta de interés obtener un modelo experimental en animales que permita el estudio de las manifestaciones y mecanismos involucrados en la patogénesis de la periodontitis. Se han implementado diferentes modelos experimentales en animales. Así, la periodontitis puede ser inducida en las ratas por manipulación

dietética (Galvão y col., 2003), introducción de microorganismos patógenos (Graves y col., 2012), colocación de ligaduras que conducen a la acumulación de placa bacteriana y la invasión de patógenos en el tejido conectivo (Lima y col., 2004), o por inyección de toxinas bacterianas (Vardar y col., 2004). De estas últimas, los lipopolisacáridos (LPS), constituyentes de la pared celular de virtualmente todas las bacterias Gram negativas subgingivales (Wang y Quinn, 2010), constituyen un estímulo potente en la iniciación de la respuesta inmune innata, induciendo inflamación y síntesis de citoquinas proinflamatorias, osteoclastogénesis y pérdida ósea alveolar (Vardar y col., 2004).

Empleando el modelo experimental de periodontitis inducida por LPS en ratas, en el presente estudio se evaluó la pérdida ósea y los cambios histológicos durante la periodontitis inducida por LPS, así como el posible papel del sistema renina angiotensina local mediante el uso de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II (valsartán).

## Material y métodos

Como animales de experimentación se utilizaron ratas macho, de la cepa *Sprague-Dawley*, de 280-300 g de peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (UCV, Caracas), mantenidos bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina<sup>®</sup>) hasta el momento del experimento. Los experimentos fueron realizados bajo la supervisión de la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV y de acuerdo al Código de bioética y bioseguridad sobre el manejo de animales de experimentación del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.

### INDUCCIÓN DE LA PERIODONTITIS

La periodontitis se indujo mediante inyecciones repetidas en el tejido gingival de endotoxina de acuerdo al método de Ramamurthy y col. (1985). La inflamación periodontal fue inducida 24 horas antes del inicio del tratamiento con el antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (valsartán) (VAL). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60 mg/kg) e inyectadas directamente en la encía vestibular entre el primer y segundo molar con 10 mL (1 mg/mL) de LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*), purificado cromatográficamente (Sigma, St. Louis, MO), cada dos días para un total de 4 inyecciones en un período de 7 días de tratamiento. Las ratas fueron distribuidas en los siguientes grupos: (1) CONTROL, (2) LPS, (3) VALSARTÁN (VAL), (4) LPS+VAL (L+V). EL VAL fue administrado vía oral (10 mg/Kg). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60 mg/Kg) y eutanizadas por deca-

pitación. Los maxilares inferiores fueron disecados y fijados en solución de formalina neutra al 10% por 24 h y desmineralizados con Osteomoll<sup>®</sup> (Merck), seguido de la deshidratación. Los especímenes fueron embebidos en parafina y seccionados a lo largo de los molares en un plano mesiodistal, para el posterior análisis histológico. Los tejidos gingivales de las arcadas inferiores de cada rata fueron escindidos y recogidos juntos por grupo experimental.

### RECUESTO DE LEUCOCITOS

Se sacrificaron los animales por decapitación se tomaron muestras de sangre periférica (2 mL aproximadamente) y se colocaron en tubos estériles para extracción de sangre al vacío, con EDTA-K<sub>2</sub> (1,2 a 2,0 mg/mL de sangre). Posteriormente se colocaron en un tubo eppendorf 20 µL de sangre y 380 µL de reactivo de Turk para un volumen total de 400 µL, se mezcló cuidadosamente, se dejaron en reposo por un período no mayor de una hora y se procedió a llenar la cámara de Neubauer, llevándola al microscopio con un objetivo de 10X y realizándose el conteo de los 4 cuadrados exteriores, de 1 mm de lado cada uno. El número de leucocitos fue calculado tomando la suma de las células contadas multiplicado por 25 y el recuento de leucocitos fue expresado como células/mm<sup>3</sup>.

### RECUESTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

Para el recuento diferencial de leucocitos se realizaron los frotis sanguíneos, se tiñeron con Giemsa, se esperó 5 minutos, se lavaron y se secaron, luego se colocaron en aceite de cedro para ser observados al microscopio con un objetivo de 40X. El recuento diferencial de leucocitos fue expresado como el porcentaje (%) de cada tipo de glóbulo blanco.

### ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Se evaluó tanto cualitativa como cuantitativamente la pérdida ósea. Para ello, después de cumplido el protocolo de la inducción de la periodontitis, los animales fueron sacrificados y los maxilares extraídos e inmediatamente colocados en una solución de formol buffer al 10%. Una vez fijados se pasaron por concentraciones crecientes de alcohol isopropílico y luego por xilol por varias horas para así lograr la deshidratación del tejido. Posteriormente las muestras fueron incluidas en bloques de parafina y se realizaron cortes con la ayuda de un micrótom (MICROTOME PLUS, Triangle Biomedical Science TBS), a fin de obtener secciones de 3 µm. A continuación, el tejido fue desparafinado mediante lavados sucesivos con xilol y concentraciones decrecientes de etanol.

Para la observación y registro de los cortes de tejido se empleó un microscopio NIKON con cámara digital Olympus conectado a una computadora. Las imágenes fueron digitalizadas y los análisis morfométricos realizados según el programa Image J (versión 1.36), lo cual permitió la obtención de resultados cuantitativos (estadísticos) a partir de la imagen. Las imágenes procesadas fueron cuantificadas a través de histogramas de densidad. Para la cuantificación de las variaciones densitométricas se calculó el % de variación del N° de píxeles presentes entre el grupo control y tratado.

#### TINCIÓN CON TRICROMICO DE MASSON

La tinción de Tricrómico de Masson que tiñe principalmente el colágeno tipo I, que forma las gruesas fibras de colágeno existentes en los espacios extracelulares y estromas de todos los órganos. Las fibras de colágeno son los elementos más frecuentemente hallados en el tejido conectivo. El Tricrómico de Masson combina la hematoxilina férrica y la fucsina ácida de Biebrich, tiñendo las fibras colágenas en general de color verde. Las secciones fijadas en formalina y parafinadas fueron tratadas con una solución de Bouin por una hora en estufa a 56 °C, se dejaron enfriar por 10 min y se lavaron con agua destilada hasta que desapareció el color amarillo. Se tiñó con hematoxilina férrica durante 10 min, y luego se lavaron con agua destilada y posteriormente fueron teñidas con solución ácida de escarlata-fucsina de Biebrich durante 2-5 min.

#### TINCIÓN DE VON KOSSA

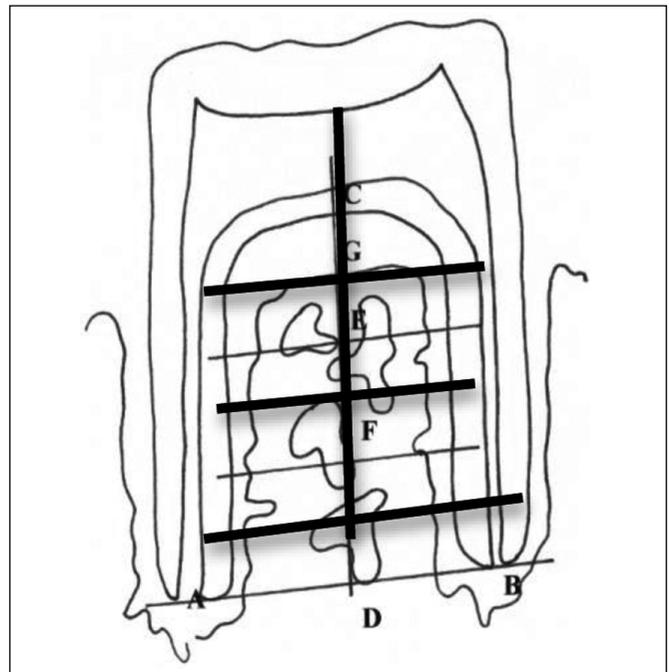
La tinción de Von-Kossa se utilizó para observar los depósitos de calcio. Para lo cual las muestras fueron desparafinadas e hidratadas con agua. Se incubaron las secciones con 5% de solución de nitrato de plata en la oscuridad durante 1 hora, seguidamente se enjuagaron y se colocaron en solución de tiosulfato de sodio durante 5 minutos, se revelaron con solución para revelado fotográfico, hasta que los cortes tornaron el color marrón, se enjuagaron con agua destilada. Se contrastaron durante 5 minutos luego se enjuagaron con agua destilada y se deshidrataron en alcohol y xileno, y por último se montaron en cubreobjetos. La tinción de Von Kossa permite ver las sales de calcio en negro o marrón-negro, los núcleos en rojo, y el citoplasma en rosa.

#### DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE OSTEOCLASTOS

Para la determinación del recuento de osteoclastos se utilizó el kit de fosfatasa ácida de Sigma-Aldrich el cual se utiliza para demostración de la actividad de la fosfatasa ácida en tejido, ésta se basa en el

uso de Baftol AS-BI fosfato y sal de Fast Garnet GBC, el ácido tartárico se utiliza para demostrar la presencia de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP+), manifestándose como gránulos de color apurpurados o rojo oscuro en el citoplasma de la mayoría de los osteoclastos. El recuento de osteoclastos se realizó mediante la evaluación microscópica Confocal Olympus utilizando un lente de inmersión de aceite (900X) y contando en la zona a estudiar el número de osteoclastos presentes y se expresó como número de osteoclastos / área.

Para la definición del área de estudio, sobre la proyección de los cortes histológicos se trazó el segmento AB tangente a los ápices de las raíces mesial y distal. Desde el punto medio de AB, se trazó hacia el punto medio de la furcación el segmento CD. Éste a su vez se dividió en tres segmentos iguales por los puntos E y F por los que se trazaron dos líneas paralelas a AB, las que dividieron al espacio interradicular en los tercios cervical, medio y apical. El segmento CD, determinó el punto G en su intersección con la cresta del hueso interradicular. La pérdida ósea se determinó sobre el segmento CD según la siguiente relación:  $PO = CG/CD \times 100$  (Figura 1).



**Figura 1. Definición del área de estudio, sobre la proyección de los cortes histológicos.**

#### DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD DENTAL

La movilidad dental, como reflejo de la severidad de la periodontitis (pérdida de colágeno en los tejidos periodontales más pérdida de hueso alveolar), fue determinada usando un forceps para mover cada diente, de acuerdo al siguiente sistema de anotación:

0 = ningún movimiento; 1 = movimiento ligero (vestíbulo-palatino); 2 = movimiento moderado (vestíbulo-palatino y mesio-distal); 3 = movimiento severo (movilidad vertical dentro y fuera del alvéolo).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media ( $X \pm$  EEM) y fueron graficados y analizados mediante el programa GraphPadPrism versión 4.1. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el uso de la prueba de "t" de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### Resultados

Los animales en estudio ganaron peso durante el período de tratamiento. Así la ganancia expresada en g y en % fue: Control: 9 (100%); LPS: 4 (55,6%); VAL: 8 (1,18%) y LPS+VAL: 7 (1,28%). Tal como se observa en la Figura 2, el tratamiento con LPS, VAL o LPS+VAL durante 7 días, no alteró significativamente los valores de presión arterial media (PAM).

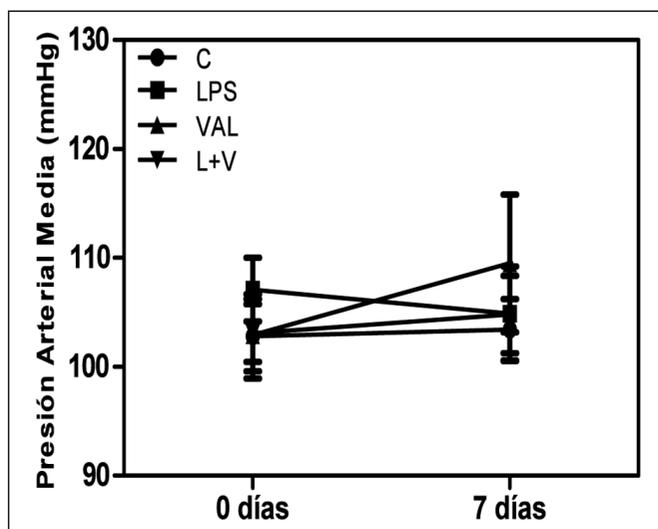


Figura 2. Presión arterial media (PAM). Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M.

#### RECuento DE LEUCOCITOS

Los animales no mostraron signos aparentes de enfermedad sistémica a los 7 días. Sin embargo el tratamiento con LPS produjo una pronunciada leucocitosis cuando se compara con el grupo control (C:  $8023 \pm 364,78$ ; LPS:  $13262 \pm 175,97$ ) (N=13) (Figura 3). El tratamiento crónico con VAL a los animales que recibieron LPS, fue capaz de prevenir el incremento del número de leucocitos observado en el grupo con periodontitis inducida por LPS. El recuento diferencial de leucocitos mostró que el incremento de leuco-

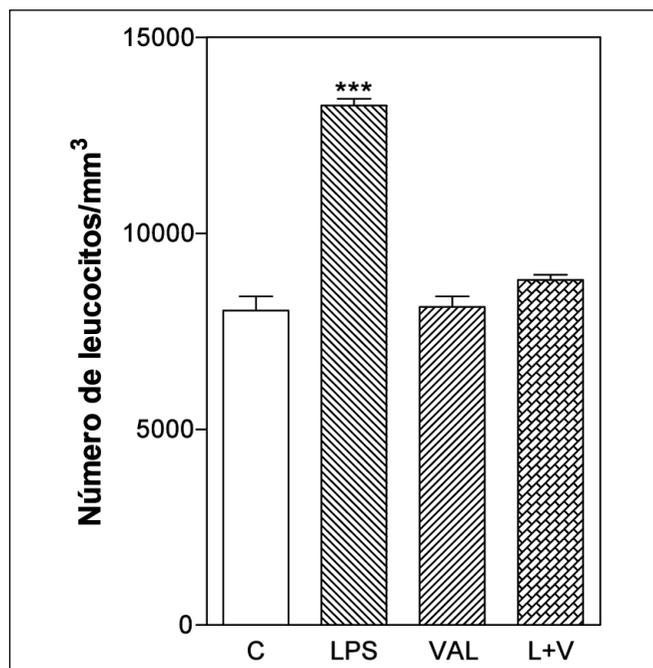


Figura 3. Recuento de leucocitos. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control.

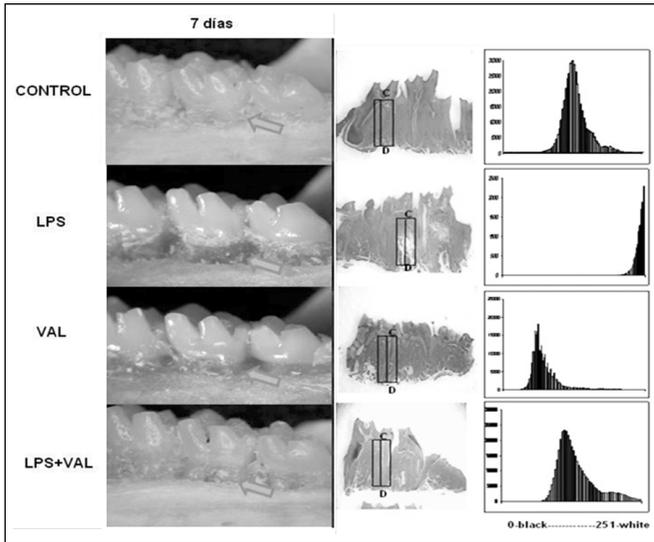
citosis observado en los animales tratados con LPS se debe principalmente a un incremento de los neutrófilos (Tabla I).

#### ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA PÉRDIDA ÓSEA

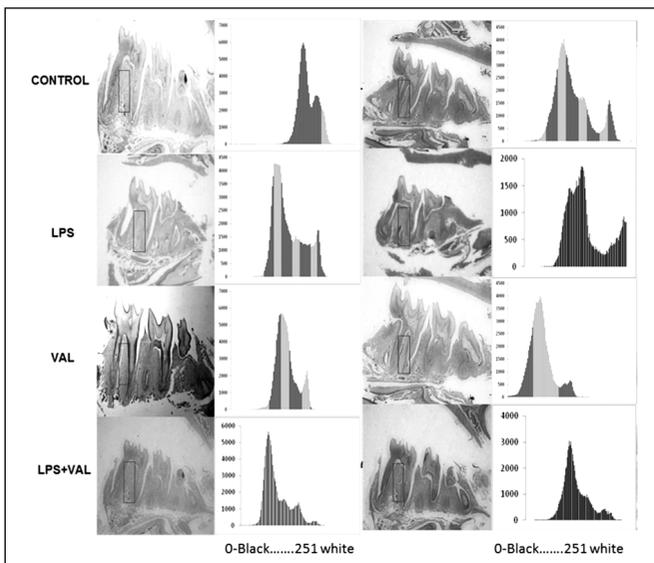
La Figura 4 muestra el aspecto macroscópico de las mandíbulas de rata en los cuatro grupos experimentales (panel izquierdo), la flecha señala el área donde se induce la EP la cual se manifiesta por la retracción del hueso en el grupo LPS comparado con el grupo control (panel central e izquierdo). Los valores de pérdida ósea en la periodontitis inducida por LPS (en % respecto al control), fue de 47,83%. Este valor fue drásticamente reducido en el grupo LPS+ VAL mostrando una clara preservación del proceso alveolar.

La Figura 5 muestra la tinción de Tricrómico de Masson (panel izquierdo), la cual tiñe a las fibras colágenas en color verde. Se observa una disminución de la intensidad de coloración de un 53,96% en el grupo LPS comparado con el grupo control, indicando una disminución de las fibras colágenas. Este efecto fue revertido en el grupo LPS+VAL, 24,39% (Tabla II). El panel derecho de la Figura 5 se muestra la tinción de Von-Kossa, la cual permite distinguir el ribete de

osteóide en rojo intenso y el hueso mineralizado en color negro. Observamos una disminución de la intensidad de coloración de un 28,50% en el grupo LPS comparado con el grupo control, indicando disminución de los depósitos de calcio. Este efecto fue revertido en el grupo LPS+VAL en un 5,51 % (Tabla II).



**Figura 4.** Registros fotográficos de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas. Aspectos macroscópicos de un maxilar de los cuatro grupos experimentales (panel izquierdo). Aspecto microscópico donde se representa el área de pérdida (panel central) e histograma resaltando la pérdida ósea en el maxilar de las ratas a los 7 días de tratamiento (panel derecho). Tinción de hematoxilina y eosina.

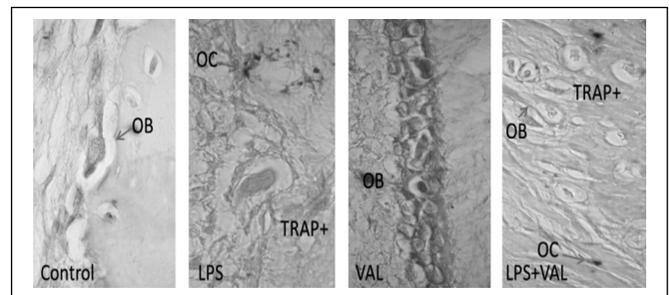


**Figura 5.** Registros histológicos de diferentes tinciones. Tinción con Tricrómico de Masson (fibras colágeno tipo IV) (panel izquierdo). Tinción de Von-Kossa (fosfatos de calcio) (panel derecho).

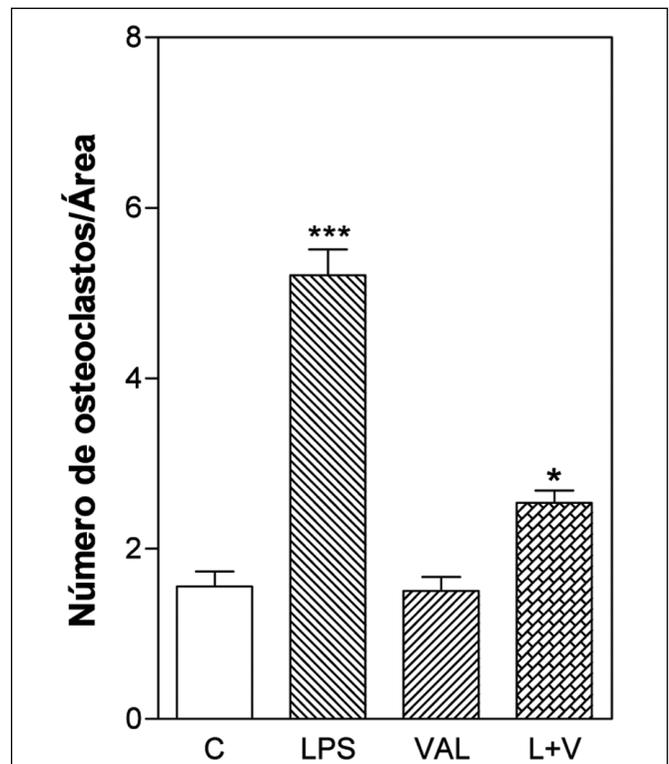
#### RECuento DE OSTEÓCLASTOS

Las Figuras 6 y 7 muestran el aspecto microscópico y el recuento de osteoclastos realizado mediante la prueba citoquímica para la detección de la fosfa-

tasa ácida resistente a tartrato (TRAP<sup>+</sup>) como marcador específico de osteoclastos y pre-osteoclastos, con el fin de cuantificar la osteoclastogénesis. Podemos observar un incremento del marcaje positivo de esta enzima en el grupo tratado con LPS cuando son comparados con su control, indicativo de actividad osteoclástica. El valsartán previno dicho efecto, observándose que el marcaje disminuyó en intensidad en el grupo tratado con LPS+VAL. Cuando se realizó el recuento del número de osteoclastos, se observó un aumento significativo en el grupo tratado con LPS (LPS: 5,21±0,30; N=14), comparado con el grupo control (C: 1,56±0,17; N=9). Este efecto fue prevenido con el tratamiento con el VAL (VAL: 1,50±0,17; N=10; L+V: 2,54±0,14; N=13) (Figura 7).



**Figura 6.** Aspecto microscópico de muestras de tejido gingival mostrando la presencia de osteoclastos y osteoblastos. Tinción por la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP<sup>+</sup>) como marcador específico de osteoclastos y osteoblastos.



**Figura 7.** Recuento de osteoclastos. Cada barra representa la media ± E.E.M. \*\*\*p<0,001 respecto al grupo control. \*p<0,05 respecto al grupo VAL.

Tabla I  
**Recuento diferencial de leucocitos**

7 días				
Parámetro	CONTROL	LPS	VAL	L+V
Neutrófilos (%)	23	31	23	26
Linfocitos (%)	76	68	75	73
Otros (%)	2	1	2	1

Tabla II  
**Variación de la densidad de los histogramas en todos los grupos con la tinción de Tricrómico de Masson y con la tinción de Von-Kossa**

	CONTROL	LPS	VAL	L+V
	Valores absolutos y porcentuales			
Tricrómico de Masson	4038 (100%)	1859 (53,96%)	3980 (1,43%)	3053 (24,39%)
Von-Kossa	5989 (100%)	4282 (28,50%)	5721 (4,47%)	5659 (5,51%)

#### DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD DENTARIA

La Tabla III muestra un incremento en la movilidad dentaria en las ratas inyectadas con LPS, presentando un grado de 1 y 2 en el grupo de 7 días de tratamiento, en comparación con la casi nula movilidad exhibida por las ratas en el grupo control donde presentaron grado 0. La movilidad dentaria disminuyó con el tratamiento LPS+VAL.

Tabla III  
**Grado de movilidad dentaria en los cuatro grupos de experimentación**

7 días n=10	Grado 0 n (%)	Grado 2 n (%)	Grado 1 n (%)	Grado 3 n (%)
Control	7 (70%)	3(30%)	0 (0%)	0 (0%)
LPS	0 (0%)	2(20%)	8(80%)	0(0%)
VAL	6(60%)	4(40%)	0(0%)	0(0%)
L+V	0(0%)	8(80%)	2(20%)	0(0%)

#### Discusión

La EP se caracteriza por la degradación del tejido conectivo y del hueso alveolar como consecuencia de la respuesta del hospedador a la biopelícula dental. La destrucción tisular puede ser inducida directamente por las toxinas y productos del metabolismo microbiano, sin embargo, la mayor parte del daño está asociada a la respuesta inflamatoria que ocurre en el hospedador (Cochran, 2008).

Se han empleado diferentes modelos animales para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la periodontitis y su posible tratamiento. La administración sistémica de

endotoxinas bacterianas como los LPS de bacterias Gram negativas a roedores, constituye hoy en día un sistema bien caracterizado de inflamación, reproduciéndose así los aspectos clínicos, radiográficos e histológicos de la periodontitis en humanos, constituyéndose en una herramienta útil en el estudio de las enfermedades periodontales (Galvão y col., 2003). La inducción de periodontitis con LPS tiene la ventaja sobre otros métodos, de presentar ya a los dos días de iniciado el tratamiento, una pérdida significativa de hueso alveolar, además de ser un método de bajo costo, menor duración y menor manipulación de los animales (Dumitrescu, 2006).

Los LPS son moléculas que reconocidamente inducen infiltración de leucocitos polimorfonucleares en los tejidos periodontales inflamados, edema y dilatación vascular, ausencia de osteoblastos, desaparición de osteocitos y un efecto estimulador sobre los osteoclastos y sobre la destrucción del colágeno. La presencia de infiltrado inflamatorio es una característica constante en la enfermedad periodontal, donde la relación leucocito-tejido periodontal tiene un doble aspecto. Así, el papel de estas células en la contención de las bacterias gingivales y sus productos, debe balancearse con la destrucción hística debida a la liberación de radicales libres y proteasas. De esta forma, un mecanismo defensivo, bajo la interacción de diferentes factores, puede tornarse en lesivo para los tejidos periodontales, y por lo tanto están involucrados en la etiopatogenia de la Enfermedad Periodontal (García-Triana y col., 1998). A medida que el estímulo microbiano aumenta, las bacterias y sus productos interactúan con el epitelio y penetran dentro del tejido conectivo subyacente, en respuesta, hay un aumento de la permeabilidad vascular y los leucocitos trasvasan las vénulas post-capilares. En consecuencia, hay un incremento en el número de leucocitos, especialmente neutrófilos, los cuales migran a través del epitelio de unión hacia el surco gingival (Page y Kornman, 1997).

Los leucocitos, podrían migrar al torrente circulatorio sistémico. Efectivamente, nuestros resultados en un modelo periodontitis en rata demuestran que el tratamiento durante 7 días de LPS produjo un aumento de la leucocitosis con neutrofilia evidente, acompañada de disminución de la ganancia de peso corporal y sin alteración de los valores de la PAM, lo que sugiere una repercusión sistémica de la periodontitis debido a las bacterias Gram negativas viables en la biopelícula, a los LPS y citocinas proinflamatorias que pueden ingresar al torrente sanguíneo e influir en la salud general y en la susceptibilidad a ciertas enfermedades. En efecto, numerosos informes basados en estudios epidemiológicos, indican

que las infecciones buco-dentales están asociadas y pueden desempeñar un papel coadyuvante en el desarrollo de enfermedades sistémicas, reportándose una relación estadísticamente significativa entre la enfermedad periodontal y un riesgo aumentado de padecer arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Bullon y col., 2011), accidentes vasculares cerebrales y artritis reumatoide (Esen y col., 2012), lo cual está en concordancia con resultados relativos a los recuentos elevados de leucocitos en la sangre venosa de los pacientes con la enfermedad periodontal que confirma la presunción de que la EP causa inflamación sistémica de bajo grado inducida por la respuesta del hospedero a las bacterias periodontales (Žilinskas y col., 2011).

Se ha reportado que el uso de LPS de origen bacteriano como modelo experimental de inducción de periodontitis se encuentra asociado a la pérdida de volumen óseo mandibular en la rata (Rogers y col., 2007; Cheng y col., 2010). Nuestros resultados apuntan a esa posibilidad ya que demuestran un incremento en la pérdida de hueso alveolar y del tejido conectivo, debida a un incremento de la osteoclastogénesis en el área donde se indujo la enfermedad periodontal. Aunado a ello está la demostración mediante el examen histológico de las mandíbulas de las ratas, de una disminución de las tinciones de Von Kossa y Tricrómico de Masson, como índices de reducción de los depósitos de calcio y del colágeno, respectivamente. Estos cambios histológicos estuvieron asociados a un incremento de la movilidad dentaria producto de la pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar, que involucra una serie de cambios en los tejidos de soporte caracterizados por la activa remodelación del tejido periodontal y óseo adyacente a la pieza dentaria, que permiten el desplazamiento de los dientes a través del proceso alveolar. La remodelación de este componente tisular es llevada a cabo por osteoclastos (Droghetti y col., 2010). Resultados similares han sido descritos en estudios histológicos realizados en conejos bajo diferentes modelos de inducción de la enfermedad periodontal (ligadura, inyecciones con *P. gingivalis*, ligadura + inyecciones con *P. gingivalis*), donde se observaron incrementos en el número de osteoclastos (Hasturk y col., 2006), o en modelos en rata mediante inyecciones con LPS (Kirkwood y col., 2007).

La angiotensina II, el efector principal del sistema renina-angiotensina, además de ser un mediador fisiológico de la respuesta circulatoria, está hoy reconocido como un factor de crecimiento, regulando el crecimiento celular y la fibrosis. Adicionalmente, datos recientes sugieren que la ANG II está involucrada en eventos claves del proceso inflamatorio (Suzuki y

col., 2003). En apoyo a esto se ha demostrado la actividad antiinflamatoria de los bloqueantes de receptores de la ANG II en la vasculatura tanto periférica (Benicky y col., 2009), como central (Hiromichi y col., 2004), y en patologías inducidas por el estrés como las úlceras gástricas (Bregonzio y col., 2003). Esta acción antiinflamatoria de los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub>, ha sido igualmente demostrada en la inducción de la inflamación por LPS en tejidos ricos en macrófagos tales como el bazo, la glándula suprarrenal y la hipófisis (Sánchez-Lemus 2008, 2009a, 2009b), en cerebro (Benicky y col., 2009) y en monocitos humanos (Larrayoz y col., 2009).

Específicamente a nivel del tejido periodontal, se han reportado diversos efectos de la ANG II tales como incremento del número de fibroblastos en cultivos de células del ligamento periodontal (Lundergan y col., 1999), la regulación del flujo sanguíneo pulpar (Berggreen y Heyeraas, 2003) y la regulación de los niveles de receptores de angiotensina II en la pulpa dental (Souza y col., 2007). Adicionalmente, se ha reportado que el bloqueo del SRA, mediante el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o de los bloqueantes de los receptores AT<sub>1</sub>, es capaz de ejercer importantes efectos relacionados con procesos inflamatorios tales como la inhibición de la liberación de prostaglandina E2 en cultivos de fibroblastos gingivales humanos (Segawa y col., 2003) o la proliferación de cultivos de fibroblastos gingivales de conejos (Ohuchi y col., 2004) y cobayos (Ohuchi y col., 2002). Sin embargo poco se sabe acerca de los efectos del bloqueo de los receptores de la angiotensina II sobre los tejidos periodontales.

Consistente con el reporte de Santos y col., (2009) sobre la existencia de un sistema renina-angiotensina funcional en el tejido gingival de la rata, nuestros resultados, en los que se demuestra que el tratamiento con el bloqueante de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II, el valsartán, previene de modo significativo la pérdida de tejido conectivo y la resorción del hueso alveolar, así como de otros parámetros tales como pérdida de peso, leucocitosis y signos generales de inflamación en ratas a las que se les indujo la periodontitis mediante la inyección de LPS, confirman y extienden la importancia de este hallazgo y sugieren que la respuesta del hospedador en la periodontitis puede ser modificada por la administración de un bloqueante selectivo de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II.

Aún no está claro el mecanismo mediante el cual el valsartán ejerce las acciones antes mencionadas. La evidencia conduce a considerar que en la periodontitis, los factores etiológicos generales que provocan la ruptura de sistemas fisiológicos de inhibición

de la peroxidación lipídica, crean un bajo nivel de protección antioxidante de los tejidos periodontales. En estas condiciones, los factores locales conducen a la migración de neutrófilos hacia la encía y el fluido gingival. La activación de la fagocitosis de estos leucocitos, provoca la liberación de especies reactivas de oxígeno, que conlleva al desencadenamiento de la peroxidación lipídica de los tejidos blandos del periodonto y a la activación de proteasas. Esta peroxidación lipídica constituye el mecanismo que permite el desarrollo de cambios morfofuncionales en el periodonto y sus vasos, lo cual resulta en destrucción del colágeno y resorción ósea. Por ello, el efecto preventivo del valsartán observado en la periodontitis experimental podría asociarse al efecto antioxidante de los bloqueantes de los receptores AT<sub>1</sub>. Al respecto, en un modelo de periodontitis inducida por ligadura en rata, se demostró que el telmisartán fue capaz de atenuar la formación de especies reactivas de oxígeno, íntimamente asociadas a la activación de genes proinflamatorios, la inflamación, y a la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y la pérdida ósea (Araújo y col., 2013). Aun más, nosotros demostramos que el valsartán es capaz de prevenir el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes en la mandíbulas de la rata con periodontitis inducida por la administración del LPS (Matos y col., 2012).

En conclusión, el efecto del valsartán sugiere una nueva aplicación terapéutica de los antihipertensivos en la prevención de la progresión de la inflamación y la pérdida ósea en la enfermedad periodontal que abre nuevas oportunidades para la investigación clínica y el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Bani Caraballo por su asistencia técnica. Este trabajo fue financiado por el CDCH proyectos PI-06-7368-2008-1 y PG-007349-2001 etapas 1 y 2, y Misión Ciencia (FONACIT-MPPCT) No. 2007001585.

## Referencias bibliográficas

Araújo AA, Souza TO, Moura LM, Brito GAC, Aragao KS, Araújo LS, Medeiros CAX, Alves MSCF, Araújo Jr RF. 2013. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9, and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol* 40: 1104-1111.

Bascones A, González, M. 2003. Mecanismos inmunológicos de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Avances en Periodoncia* 15(3): 121-138.

Benicky J, Sánchez-Lemus E, Pavel J, Saavedra J. 2009. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. *Cell Mol Neurobiol* 29(6-7): 781-792.

Berggreen E, Heyeraas KJ. 2003. Role of K<sup>+</sup>ATP channels, endothelin A receptors, and effect of angiotensin II on blood flow in oral tissues. *J Dent Res* 82(1): 33-38.

Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra J. 2003. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(2): G414-423.

Bullon P, Cordero M, Quiles J, Morillo J, Ramírez M, Battino M. 2011. Mitochondrial dysfunction promoted by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radic Biol Med* 50(10): 1336-1343.

Cheng W, Huang R, Chiang C, Chen J, Liu C, Chu C, Fu E. 2010. Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. *J Periodontol Res* 45(6): 788-795.

Cochran D. 2008. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol* 79: 1569-1576.

Droghetti P, Cruzat F, Smith Ferrer P, Oyarzún Droguett A. 2010. Role of MT1-MMP in the remodeling of the periodontal ligament during tooth movement. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 3(3): 113-117.

Dumitrescu A. 2006. Histological comparison of periodontal inflammatory changes in two models of experimental periodontitis in the rat. A pilot study. *TMJ* 56: 211-217.

Esen C, Alkan B, Kırnar M, Akgül O, Işıkoğlu S, Erel O. 2012. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol* 83(6): 773-779.

Fleisch H. 1997. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med* 29: 55-62.

Flemmig TF. 1999. Periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1): 32-88.

Galvão M, Chapper A, Rösing C, Ferreira M, de Souza M. 2003. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras* 17(1): 56-62.

García-Triana B, García-Piñeiro J, Saldaña-Bernabeu A. 1998. La peroxidación lipídica en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev Cubana Estomatol* 35(1): 25-29.

Graves D, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. 2012. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol* 15:117-132.

Guilarte C, Perrone M. 2004. Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta Odontol Venez* 42(3): 213-217.

Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CD, Van Dyke TE. 2006. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 20(2): 401-403.

Hiromichi A, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra J. 2004. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35: 1726-1731.

Kim J, Heo H, Ha Y, Ye B, Lee E, Choi Y, Yu B, Chung H. 2012. Mechanism of Ang II involvement in activation of

- NF- $\kappa$ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)* 34(1): 11-25.
- Kim J, Uehara Y, Choi Y, Ha Y, Ye B, Yu B, Chun H. 2011. Mechanism of attenuation of pro-inflammatory Ang II-induced NF- $\kappa$ B activation by genistein in the kidneys of male rats during aging. *Biogerontology* 12(6): 537-550.
- Kirkwood K, Li F, Rogers J, Otremba J, Coatney D, Kreider J, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter A, Medicherla S 2007. A p38 alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 320(1): 56-63.
- Larrayoz I, Pang T, Benicky J, Pavel J, Sánchez-Lemus E, Saavedra J. 2009. Candesartan reduces the innate immune response to lipopolysaccharide in human monocytes. *J Hypertens* 27(12): 2365-2376.
- Lima V, Vidal F, Rocha F, Brito G, Ribeiro R. 2004. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol Res* 75: 162-168.
- Lundergan W, Ferry D, Kobayashi H, Snowdowne K. 1999. Angiotensin-II increases cytoplasmic calcium, cell number and total DNA for human periodontal ligamental cells *in vitro*. *J Periodontol Res* 34(4): 223-228.
- Matos M, Varela M, Stern A, Garrido M. 2012. Efecto del estrés oxidativo sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la enfermedad periodontal inducida por la administración de lipopolisacáridos en ratas. *Periodontia y Osteointegración* 22(2): 97-104.
- Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, Taniguchi Y, Iwamoto K, Sano M, Murakami H. 2004. Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 137(3): 281-289.
- Ohuchi N, Koike K, Sano M, Kusama T, Kizawa Y, Hayashi K, Taniguchi Y, Ohsawa M, Iwamoto K, Murakami H. 2002. Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132(4): 451-460.
- Page RC, Kornman K. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14: 9-11.
- Papapanou PN. 1996. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1:1-36.
- Ramamurthy N, Greenwald R, Schneir M, Golub L. 1985. The effect of alloxan diabetes on prolyl and lysyl hydroxylase activity in uninflamed and inflamed rat gingiva. *Arch Oral Biol* 30: 679-683.
- Rogers J, Li F, Coatney D, Rossa C, Bronson P, Krieder J, Giannobile W, Kirkwood K. 2007. Actinobacillus actinomycescomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol* 78(3): 550-558.
- Saavedra J, Sánchez-Lemus E, Benicky J. 2011. Blockade of brain angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinol* 36(1): 1-18.
- Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Larrayoz I, Zhou J, Baliano M, Nishioku T, Saavedra J. 2009a. Angiotensin II AT<sub>1</sub> blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5): R1376-1384.
- Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Saavedra J. 2009b. *In vivo* angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockade selectively inhibits LPS-induced innate immune response and ACTH release in rat pituitary gland. *Brain Behav Immun* 23(7): 945-957.
- Sánchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz-Roldan I, Moughamian A, Pavel J, Nishioku T, Saavedra J 2008. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinol* 149(10): 5177-5188.
- Santos C, Akashi E, Dionisio T, Sipert C, Didier D, Greene A, Oliveira S, Pereira H, Becari C, Oliveira E, Salgado M. 2009. Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol* 80: 130-139.
- Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiyama H, Furuyama S. 2003. Angiotensin II induces prostaglandin E<sub>2</sub> release in human gingival fibroblasts. *Life Sci* 72(7): 795-803.
- Souza P, Fukada S, Cunha F, Costa C, Costa C. 2007. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Reg Peptides* 140: 27-31.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. 2003. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35(6): 881-900.
- Vardar S, Buduneli E, Türkoğlu O, Berdeli A, Baylas H, Başkesen A, Atilla G 2004. Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 75:1640-1646.
- Wang X y Quinn P. 2010. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* 49(2): 97-107.
- Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, Žekonis J. 2011. Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. *Medicina (Kaunas)* 47(4): 193-199.