

# Actividad de las enzimas antioxidantes en la enfermedad periodontal en ratas espontáneamente hipertensas. Efecto del Valsartán

Antioxidant enzymes activity in periodontal disease in spontaneously hypertensive rats. Effect of Valsartan

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

## Resumen

Diversas enfermedades sistémicas como la diabetes, el hipertiroidismo, la osteoporosis y la dislipidemia pueden influir en la enfermedad periodontal (EP). Poco se conoce acerca de la relación entre la hipertensión arterial (HTA) y la periodontitis. La EP es una condición inflamatoria que destruye las fibras de los ligamentos periodontales y el hueso alveolar. La respuesta del hospedero incluye la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). Si las EROs se producen en exceso inducen reacciones en cadena, capaces de dañar a moléculas de importancia biológica. Se sabe que la angiotensina II (ANGII) puede actuar como un agente pro-inflamatorio y pro-oxidante, pero su participación en la EP inducida durante la hipertensión es elusiva. Por ello, se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes y el papel de la ANGII/RAT<sub>1</sub> en la EP experimental en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas *Wistar Kyoto* (WKY). Se emplearon ratas macho WKY y SHR con EP-inducida mediante la inyección de lipopolisacárido (LPS), y se determinó el efecto del antagonista del receptor AT<sub>1</sub> sobre la presión arterial, el recuento de leucocitos y la actividad de tres enzimas antioxidantes de la mucosa bucal: la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx). Los animales fueron divididos en cuatro grupos: 1: WKY+LPS sin tratamiento; 2: SHR+LPS sin tratamiento; 3: WKY + LPS+VAL (11 días); 4: SHR + LPS+ VAL (11 días). Se determinó la presión arterial al comienzo y al final del tratamiento. Los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se tomaron muestras de sangre para el recuento de leucocitos. La actividad de la CAT, la SOD y la GPx fue determinada por espectrofotometría. Los maxilares inferiores fueron disecados, fijados, desmineralizados y deshidratados para el estudio histológico. Nuestros resultados demuestran la presencia de EP más marcada en las ratas SHR que se manifestó por la pérdida ósea. La EP se acompañó de un aumento en el número total de leucocitos y de la actividad de la CAT y SOD, lo que sugiere un incremento del estrés oxidativo. Igualmente se observó una disminución de la actividad de la GPx, posiblemente debido a la reducción de la concentración de glutatión en las ratas hipertensas. Todos estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con VAL, indicando un papel de la ANGII/RAT<sub>1</sub> en la patogénesis de la EP asociada a la hipertensión.

**Palabras clave:** Enfermedad periodontal, enzimas antioxidantes, hipertensión arterial, valsartán, receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina.

## Abstract

Various systemic diseases such as diabetes, hyperthyroidism, osteoporosis, and dyslipidemia can influence periodontal disease (PD). Few is known about the relationship between arterial hypertension (AH) and periodontitis. PD is an inflammatory condition that destroys the fibers of the periodontal ligaments and the alveolar bone. The host response includes the production of reactive oxygen species (ROS). If ROS are produced in excess, they induce chain reactions, capable of damaging molecules of biological importance. It is known that angiotensin II (ANGII) can act as a pro-inflammatory and pro-oxidant agent, but little is known about its role in PD induced during hypertension. Therefore, the activity of antioxidant enzymes and the role of ANGII / RAT<sub>1</sub> in experimental PD were evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR) and *Wistar Kyoto* rats (WKY). For this, in male WKY and SHR rats with EP-induced by injection of lipopolysaccharide (LPS), the effect of the AT<sub>1</sub> receptor antagonist was determined, on blood pressure, leukocyte count, and the activity of three oral mucosa antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The animals were divided into four groups: 1: WKY + LPS without treatment; 2: SHR + LPS without treatment; 3. WKY + LPS + VAL (11 days); 4. SHR + LPS + VAL (11 days). Blood pressure was determined at the beginning and the end of the treatment. The animals were sacrificed by decapitation and blood samples were taken for the leukocyte count. The activity of CAT, SOD, and GPx was determined by spectrophotometry. The lower jaws were dissected, fixed, demineralized, and dehydrated for histological study. Our results demonstrate the presence of a more marked PD in SHR rats manifested by bone loss. PD was accompanied by an increase in the total number of leukocytes and CAT and SOD activity, suggesting an increase in oxidative stress. Likewise, a decrease in GPx activity was observed, possibly due to the reduction in glutathione concentration in hypertensive rats. All these effects were reversed by VAL treatment, indicating a role for ANGII / RAT<sub>1</sub> in the pathogenesis of PD associated with hypertension.

**Keywords:** Periodontal disease, antioxidant enzymes, arterial hypertension, valsartan, angiotensin AT<sub>1</sub> receptors.

1. Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 2. Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: gbrielamatos@hotmail.com

ORCID: \*0000-0001-7290-5237; \*\*0000-0003-3865-5355 ; \*\*\*0000-0003-1812-0759; \*\*\*\*0000-0001-9662-4405

## Introducción

La enfermedad periodontal (EP) es un término general utilizado para describir de forma integral a un grupo de alteraciones complejas de carácter inflamatorio e infeccioso que afectan a la encía, tejido conectivo de soporte, cemento y hueso alveolar. Es una enfermedad destructiva, indolora, de progresión lenta, caracterizada por la colonización bacteriana de la superficie dental adyacente a la encía, por organismos Gram-negativos y Gram-positivos, los cuales tienen un papel importante en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis, al participar en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico, que se refleja en inflamación y destrucción de hueso, movilidad y pérdida de dientes. Una vez establecida la periodontitis, se forma un infiltrado inflamatorio constituido por diferentes tipos celulares como macrófagos y linfocitos, que producirán distintos subtipos de citocinas, mediadores biológicos responsables de la inmunopatología de diversas enfermedades (Bascones Martínez y Figuero Ruiz, 2005; Gaurilcikaite y col., 2017).

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica común que se manifiesta como un incremento anormal y persistente de la presión arterial sistémica (PA), y constituye el factor de riesgo modificable más importante de morbilidad y mortalidad que se asocia con un mayor riesgo de otras enfermedades, fundamentalmente cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular (Oparil y col., 2018). La hipertensión es una enfermedad multifactorial sin un mecanismo simple que explique por completo el aumento de la PA (Czopek y col., 2019). En su desarrollo se ha

involucrado al estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial, que se manifiesta por cambios de los niveles de endotelina y óxido nítrico. A pesar del prominente papel que se le atribuye al sistema inmunológico en modelos experimentales (Guzik y col., 2007) y en estudios clínicos (Itani y col., 2016), los mecanismos exactos que inician estas respuestas siguen sin estar claros (Drummond y col., 2019).

Cada día se acepta más que la EP se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV), como los accidentes cerebrovasculares (ACV), enfermedad coronaria (CHD) y posiblemente enfermedad arterial periférica e hipertensión, independientemente de los factores de riesgo tradicionales como el tabaquismo y la obesidad (DeStefano y col., 1993; Demmer y Papapanou, 2000; Hujoel y col., 2000; Beck y Offenbacher, 2001; Bahekar y col., 2007; Chen y col., 2008; Humphrey y col., 2008; Bouchard y col., 2010; Tsioufis y col., 2011; Tonetti y Dyke, 2013).

La interacción entre la carga bacteriana y la respuesta del huésped es el mecanismo biológico más plausible que vincula la periodontitis con una serie de factores de enfermedades crónicas sistémicas, como la diabetes mellitus, ECV y enfermedades neurológicas como el Alzheimer (Southerland, 2013; Tonetti y Dyke, 2013; Dominy y col., 2019). Estos pacientes a menudo presentan inflamación sistémica y disfunción endotelial (Tonetti y col., 2007) que mejora después de un tratamiento periodontal adecuado. No obstante, la alta prevalencia de la HTA y de su importancia, la mayoría de los estudios que evalúan su relación con la EP son estudios transversales, a menudo subanálisis de grandes cohortes y con grandes variaciones de diseño y

número de participantes (Papapanou y col., 2018; Konkel y col., 2019; Pietropaoli y col., 2020).

Varios estudios parecen apoyar una relación entre la periodontitis severa y la HTA; y dado que la periodontitis es la principal causa por la que ocurre extracción y pérdida de dientes en adultos, se ha sugerido la existencia de posibles mecanismos fisiopatológicos que relacionan la periodontitis y la HTA (Inoue y col., 2005; Holmlund y col., 2006; Desvarieux y col., 2010; Tsakos y col., 2010; Tsioufis y col., 2011; Zeigler y col., 2015; Martin-Cabezas y col., 2016; Aguilera y col., 2020). En este sentido, se ha demostrado que la presión sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se encuentran más elevada en los pacientes con EP que entre los individuos sin periodontitis (Desvarieux y col., 2010; Tsakos y col., 2010); demostrándose asociación positiva entre la PAS y periodontitis severa en personas de mediana edad (Tsakos y col., 2010), hallándose valores de PA más altos en aquellos individuos que han perdido dientes (Taguchi y col., 2004; Völzke y col., 2006).

Se ha postulado que esta relación causal es tanto indirecta, ya que es bien conocido que la periodontitis y la hipertensión comparten factores de riesgo comunes tales como la edad, el tabaquismo, el estrés y factores socioeconómicos; como directa a través de efectos sistémicos entre los cuales se incluye un proceso inflamatorio generalizado (Beck y Offenbacher, 2001; De Nardin y col., 2001). A su vez, la hipertensión puede afectar de modo significativo la severidad de la EP, incrementando la carga inflamatoria del huésped, induciendo alteraciones tales como un incremento del estrés oxidativo y de la activación del sistema renina-angiotensina (SRA) (Macedo Paizan y Vilela-Martin, 2014).

Los mecanismos por los cuales la EP puede ejercer efectos sistémicos se deben tanto a la invasión bacteriana de tejidos remotos (acción directa), como a una acción indirecta mediante la producción de mediadores de inflamación en la cavidad oral que luego son liberados a la circulación (El Kholly y col., 2015). Diferentes estudios poblacionales y la data experimental implican a diversos mediadores inflamatorios en el desarrollo de la hipertensión (Sesso y col., 2003; Chrysohoou y col., 2004), y a su vez la respuesta inflamatoria sistémica que acompaña a la EP ha sido propuesta como la conexión entre periodontitis, aterosclerosis y otras ECV (Nakajima y col., 2009; Sanz y col., 2010). Marcadores de inflamación tales como la proteína C reactiva (PCR) se encuentran elevados en la periodontitis moderada a severa. Asimismo, el incremento de los niveles de este marcador es pronóstico de desarrollo de hipertensión, independientemente de otros factores de riesgo (Sesso y col., 2003; Gani y col., 2009). También se ha reportado incrementos de otros marcadores de inflamación tales como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en la periodontitis cuando se comparan con controles sanos (Gani y col., 2009). Los mecanismos que subyacen en la asociación entre la EP y la hipertensión son hasta el momento especulativos. La proximidad anatómica del periodonto con el flujo sanguíneo puede facilitar la bacteriemia y la diseminación sistémica de productos bacterianos, reactantes de fase aguda, complementos e inmunocomplejos que pueden llevar a lesión vascular y aterosclerosis. A su vez, el proceso aterosclerótico induce un incremento de la resistencia al flujo sanguíneo y consecuentemente, al incremento de la PA (Macedo Paizan y Vilela-Martin, 2014).

El estrés oxidativo juega un papel vital en la etiopatogénesis de todas las enfermedades sistémicas. La periodontitis, como cualquier enfermedad inflamatoria crónica, está indisolublemente ligada al desequilibrio oxidativo-reductor (Kimura y col., 1993). De hecho, durante el proceso inflamatorio inducido por los patógenos periodontales la estimulación de los neutrófilos y macrófagos durante el proceso de fagocitosis, conduce a un "estallido respiratorio" resultando en un incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs); y su producción excesiva conduce a estrés oxidativo con un incremento en la formación de radicales libres, así como una disminución de los niveles de antioxidantes (Kimura y col., 1993; Toczewska y col., 2020). Muchos estudios han demostrado que el estrés oxidativo es directamente responsable de la degradación de los componentes de la matriz extracelular del tejido periodontal, incluyendo colágeno, elastina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (como el ácido hialurónico) (Kimura y col., 1993), lo que lleva a la destrucción del tejido de soporte del periodonto (Knaś y col., 2013; Tóthová y Celec, 2017; Wang y col., 2017). Sin embargo, el estrés oxidativo también inicia y promueve la respuesta inflamatoria en la periodontitis. Bajo la influencia de EROs, se genera un aumento en la producción de citocinas y factores de crecimiento como las IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Tóthová y Celec, 2017). De hecho, en pacientes con EP, la actividad de NAD(P)H oxidasa aumenta, lo que no sólo incrementa la producción de radicales libres, pero también es una fuente importante de citocinas pro-inflamatorias (Giannopoulou y col., 2008). El estrés oxidativo también conduce a la liberación de enzimas lisosomales responsables de la destrucción local de tejidos. Estudios recientes indican que, en pacientes con periodontitis con

comorbilidades, el desbalance óxido-redox salivales se encuentran exacerbados. En casos de EP y enfermedad coronaria, se ha demostrado incrementos de los niveles de malondialdehído salival y sérico (marcador de peroxidación de lipídica), así como de la dimetilarginina asimétrica (ADMA, un inhibidor endógeno del óxido nítrico) en comparación con sujetos sanos y casos de cardiopatía coronaria. Esto se acompañó de una disminución de la vitamina C, un importante antioxidante (Isola y col., 2019 a,b; 2020).

Las EROs producidas por la infiltración local de neutrófilos participan en la destrucción del tejido periodontal. El desequilibrio en la actividad oxidante / antioxidante dentro de la cavidad oral influye de manera adversa en el estado oxidativo sistémico, como se refleja en el aumento de los niveles séricos de EROs y la reducción de los antioxidantes (Brock y col., 2004; D'Aiuto y col., 2010). El estrés oxidativo, a su vez, está implicado en el desarrollo de la hipertensión, ya que las EROs pueden considerarse mediadoras de la vasoconstricción y la inflamación vascular; y la biodisponibilidad del óxido nítrico está estrechamente relacionada con el estado redox (Touyz, 2004a; Androulakis y col., 2009). En la hipertensión, tanto las pequeñas como las grandes arterias presentan una vasorelajación dependiente del endotelio y una distensibilidad disminuidas, una vasoconstricción incrementada, mayor remodelaje e inflamación (Touyz, 2004b).

Entre los muchos factores vasoactivos involucrados en la fisiopatología de la hipertensión, está la angiotensina II (ANG II), que es considerada actualmente como un agente pro-inflamatorio (Labandeira-García y col., 2017). Así, la administración

de bloqueantes del receptor  $AT_1$  de la ANG II ha demostrado efectos anti-inflamatorios en procesos tales como la inflamación vascular subyacente a la artritis reumatoide (Price y col., 2007), la aterosclerosis (Phillips y Kagiya, 2002), en procesos de inflamación vascular subyacentes a hipertensión y otras patologías (Marchesi y col., 2008). Se ha demostrado que la ANG II, a través de su receptor  $AT_1$ , es capaz de iniciar una cascada inflamatoria mediada por la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa, la generación de EROs y la activación del  $NF\kappa B$  (Mollnau y col., 2002; Matos y col., 2013). Las células poseen varios mecanismos de defensa capaces de prevenir o contener los efectos deletéreos de las EROs (Förstermann, 2008); sin embargo, cuando se excede la capacidad del sistema de defensa antioxidante [superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), heme oxigenasa (HO), paraoxonasa (PON)], se desemboca en estrés oxidativo. Por lo tanto, las manipulaciones farmacológicas dirigidas a la prevención del estrés oxidativo son de gran interés terapéutico. Estas incluyen a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y a los bloqueantes del receptor  $AT_1$  de la ANG II (Li y col., 2011).

La evidencia indica la presencia de los componentes de un SRA local en la encía de la rata, capaz de generar ANG II *in vitro*, siendo este sistema completamente funcional tanto en ratas como en humanos (Santos y col., 2009, 2015). Así, Matos y col. (2013, 2014), demostraron que el bloqueo de los receptores  $AT_1$ , previene la progresión de la EP en etapas tempranas de la patología ya que previene significativamente la pérdida de hueso, revierte el aumento en el conteo de leucocitos y de la actividad enzimática de la CAT, la SOD, la GPx y la NOS inducido

por lipopolisacárido (LPS). Igualmente, el valsartán fue capaz de prevenir el incremento inducido por el LPS de los niveles salivales de la PCR, de citocinas pro-inflamatorias como las IL- $1\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6, IL-17, el TNF- $\alpha$ ; las quimiocinas RANTES y MIP- $3\alpha$ , y de prevenir la reducción de la citocina anti-inflamatoria IL-4 (Matos y col., 2014, 2016, 2019). Todos estos hallazgos permiten establecer la existencia de una relación entre los marcadores de estrés oxidativo y de marcadores inflamatorios y la EP; y sugiere un papel de la ANGI/RAT $_1$  en la patogénesis de la EP inducida con LPS en ratas (Matos y col., 2014; Santos y col., 2015; Dionisio y col., 2019).

Dada la gran prevalencia tanto de la EP como de la hipertensión, la morbimortalidad asociada a ambas, y tomando en cuenta la alta incidencia de una asociación entre ambas patologías; se acrecienta la necesidad de investigar sobre el reconocimiento del periodonto como un foco de infección con efectos sistémicos potenciales y de amplio alcance. Por ello, empleando modelos experimentales de hipertensión arterial y a fin de examinar la asociación entre hipertensión y la EP, en el presente trabajo se evaluó la influencia de la HTA sobre cambios morfológicos e inflamatorios en el periodonto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) comparándolas con su control *Wistar Kyoto* (WKY) a las que se le indujo EP experimentalmente con LPS. Asimismo, se evaluaron las posibles alteraciones de la actividad de las enzimas antioxidantes y el papel de la ANGI/RAT $_1$  en la EP en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas *Wistar Kyoto* (WKY) (Control). Para ello se determinó el efecto del antagonista del receptor  $AT_1$ , el valsartán (VAL), sobre la HTA, el recuento de leucocitos, la actividad

de tres enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GPx.

## Materiales y métodos

Se utilizaron ratas macho de 16 semanas de las cepas espontáneamente hipertensas (SHR) y *Wistar Kyoto* (WKY), de 280-300 g de peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), mantenidas bajo libre acceso al agua y comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento. Los cuales fueron realizados bajo la supervisión de la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV y de acuerdo con el Código de bioética y bioseguridad sobre el manejo de animales de experimentación del Ministerio de Ciencias y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.

### INDUCCIÓN DE LA PERIODONTITIS

La periodontitis se indujo mediante inyecciones repetidas de la endotoxina en el tejido gingival, de acuerdo con el 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  $\mu$ L (1 mg/mL) de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (*E. coli*), purificado cromatográficamente (Sigma, St. Louis, MO), cada dos días, para un total de 5 inyecciones en un período de 11 días de tratamiento. EL VAL fue administrado por vía oral (10mg/Kg) mediante el uso de una sonda intragástrica. Las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos: 1. WKY+LPS tratadas con vehículo; 2. SHR+LPS tratadas con vehículo; 3. WKY+LPS+VAL (11 días); 4. SHR+LPS+VAL (11 días).

### DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Se midió la PA al comienzo y al final del tratamiento. El registro de los parámetros cardiovasculares, PA y frecuencia cardíaca se realizó en las ratas conscientes por un método no invasivo mediante el uso de un plestismógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5002 LETICA®, Panlab, S.L. Barcelona-España), registrándose la PAS, PAD y la presión arterial media (PAM). La semana previa al experimento, se determinó diariamente la PA y frecuencia cardíaca, para minimizar el estrés asociado al manejo y al movimiento de la cola (período de adaptación a la toma de la PA y de la frecuencia cardíaca).

### RECUESTO DE LEUCOCITOS

Al final de los 11 días, 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  $\mu$ L de sangre y 380  $\mu$ L de reactivo de Turk para un volumen total de 400  $\mu$ L, se mezcló cuidadosamente, se dejaron en reposo, y se procedió a llenar la cámara de Neubauer, llevándola al microscopio con un objetivo de 10X y realizándose el conteo de los 5 cuadrados de 1 mm de lado cada uno. El número de leucocitos fue calculado tomando la suma de las células contadas multiplicado por 40 y el recuento de leucocitos fue expresado como células/mm<sup>3</sup>.

### OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUCOSA BUCAL

Después de que las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se aisló la

encia del maxilar inferior. La mucosa bucal fue colocada en una solución amortiguadora fría de fosfatos (NaCl al 0,9% en buffer de fosfatos 0,01 M; pH 7,0). Para la medición de las enzimas antioxidantes los trozos de mucosa fueron colocados en 2 volúmenes de una solución fría (PBS 0,01 M, EDTA 1mM, aprotinina al 0,05% y ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  100 mM), sonicados y centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el procesamiento de la muestra.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

##### ***Determinación de la actividad de la SOD total***

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolium (NBT) por los  $\text{O}_2^-$  generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley y Spitz, 1984). Se preparó una mezcla de reacción con la siguiente composición: xantina 0,122 mM, EDTA 0,122 mM, NBT 30,6  $\mu\text{M}$ , albúmina 0,006% y bicarbonato de sodio 4 mM. Se añadió 33  $\mu\text{L}$  del tejido de interés homogenizado y diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7), al cual se le añadió 166  $\mu\text{L}$  de la mezcla de incubación (xantina 0,03 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150mM, albúmina 0,1% y  $\text{NaHCO}_3$  400 mM), manteniéndose a  $27^\circ\text{C}$ . La reacción se inició con la adición de 10  $\mu\text{L}$  de la enzima xantina oxidasa. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos, pero sin xantina oxidasa; asimismo, se preparó un tubo de 100% de reducción, el cual contenía xantina oxidasa sin muestra. Los tubos se incubaron por 30 minutos, seguidamente se adicionó 1 mL de cloruro de cobre (II) 0,8 mM y se midió

la absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

##### ***Determinación de la actividad de la catalasa***

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1982), la cual cuantifica la disminución de la absorbancia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  debido a su degradación por la CAT presente en la muestra. Para ello, se añadió 25  $\mu\text{L}$  de homogenizado del tejido gingival a 725  $\mu\text{L}$  de la mezcla de incubación conteniendo 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un buffer fosfato 10 mM a pH 7, monitoreando el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 60, 120 y 180 segundos, utilizando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:  $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$ , donde t es el intervalo de tiempo medido (seg),  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ . Los resultados se expresan como k/mg de proteína.

##### ***Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa***

La actividad de la GPx fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé (1984), mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. El glutatión reducido es empleado por la GPx para reducir el peróxido de hidrógeno, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado y NAD(P)H, y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. Los resultados se expresan promediando los cambios de

absorbancia por minuto, multiplicando este promedio por 0,16 (este factor se obtiene tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H a 340 nm es de 6,22 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada y los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

### ***Determinación de las proteínas tisulares***

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón.

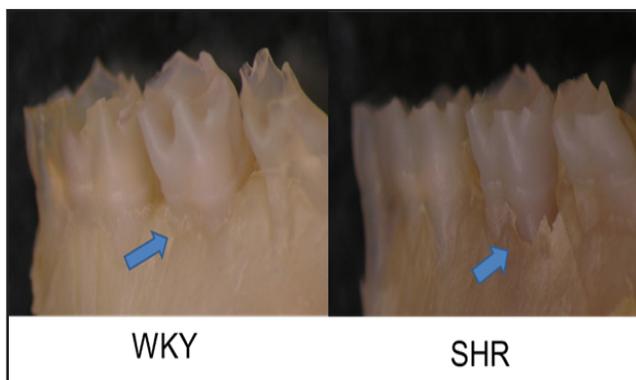
### **Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media ( $X \pm E.E.M.$ ) y fueron graficados y analizados mediante el programa GraphPad Prism versión 4.1. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el análisis post hoc de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## **Resultados**

### **RESORCIÓN ÓSEA**

En la Figura 1 se observa el registro fotográfico de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas WKY y SHR tratadas con LPS, donde se muestra el aspecto macroscópico de los maxilares de ambos grupos. Las flechas representan el área donde se produjo la pérdida ósea con las inyecciones inter diarias de LPS, la cual fue



**Figura 1.** Registros fotográficos de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas. Aspectos macroscópicos de un maxilar de ratas WKY y SHR. Las flechas representan el área de pérdida ósea (Matos y col., 2015)

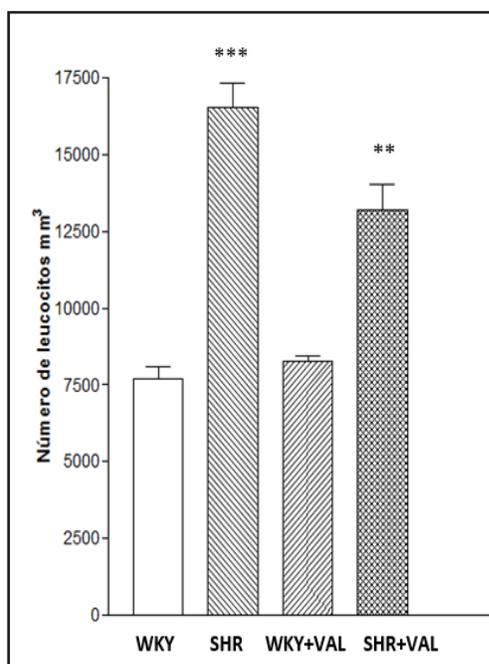
más marcada en el grupo de ratas SHR al compararlas con las ratas WKY tratadas con LPS.

### **RECUESTO DE LEUCOCITOS**

Como se observa en la Figura 2, aún cuando las ratas no mostraron signos aparentes de enfermedad sistémica a lo largo de los 11 días de tratamiento, las inyecciones con LPS produjeron leucocitosis, la cual fue mucho más pronunciada y significativa en el grupo de ratas SHR (+113%,  $p < 0,001$ ). El bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> con valsartán redujo parcial y significativamente el incremento del número de leucocitos contados en sangre periférica inducido por LPS en las ratas SHR.

### **PRESIÓN ARTERIAL MEDIA**

En las ratas SHR tratadas con LPS se observan valores de PAM significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que, en su contrapartida, las ratas WKY. El bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> con valsartán revertió los valores incrementados de la PAM en las ratas SHR tratadas con LPS (Figura 3).



**Figura 2.** Contaje de leucocitos en los grupos sometidos a 11 días de tratamiento. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. N=6-10. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , respecto al grupo WKY

### **Actividad de las enzimas antioxidantes de la mucosa bucal en ratas WKY y SHR con EP inducida por inyecciones locales de LPS**

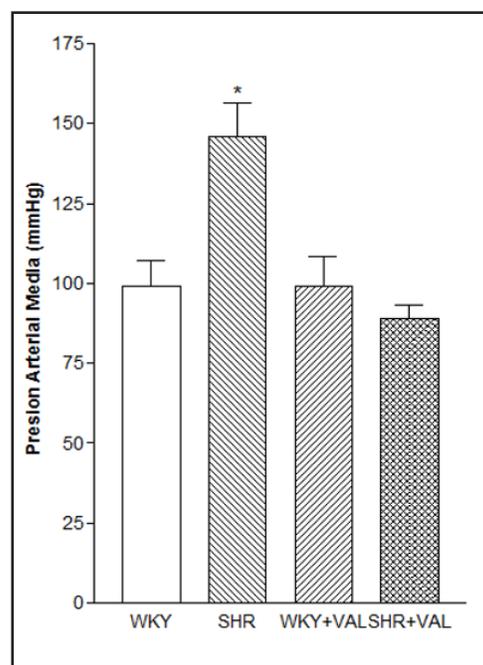
Como se observa en la Figura 4, la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD mostró un incremento significativo y más pronunciado y en el grupo de las ratas SHR con EP inducida con el tratamiento con LPS comparada con el grupo de ratas WKY con EP (CAT: 190% y SOD: 51%). El tratamiento con el antagonista del receptor  $AT_1$  (VAL) fue capaz de revertir dicho incremento.

Con relación a la actividad de la GPx, se observa que en las ratas SHR con EP, la actividad de la misma estuvo significativamente reducida al compararla con las WKY (-65%). El tratamiento con el VAL revirtió parcialmente la reducción de la actividad enzimática (Figura 4).

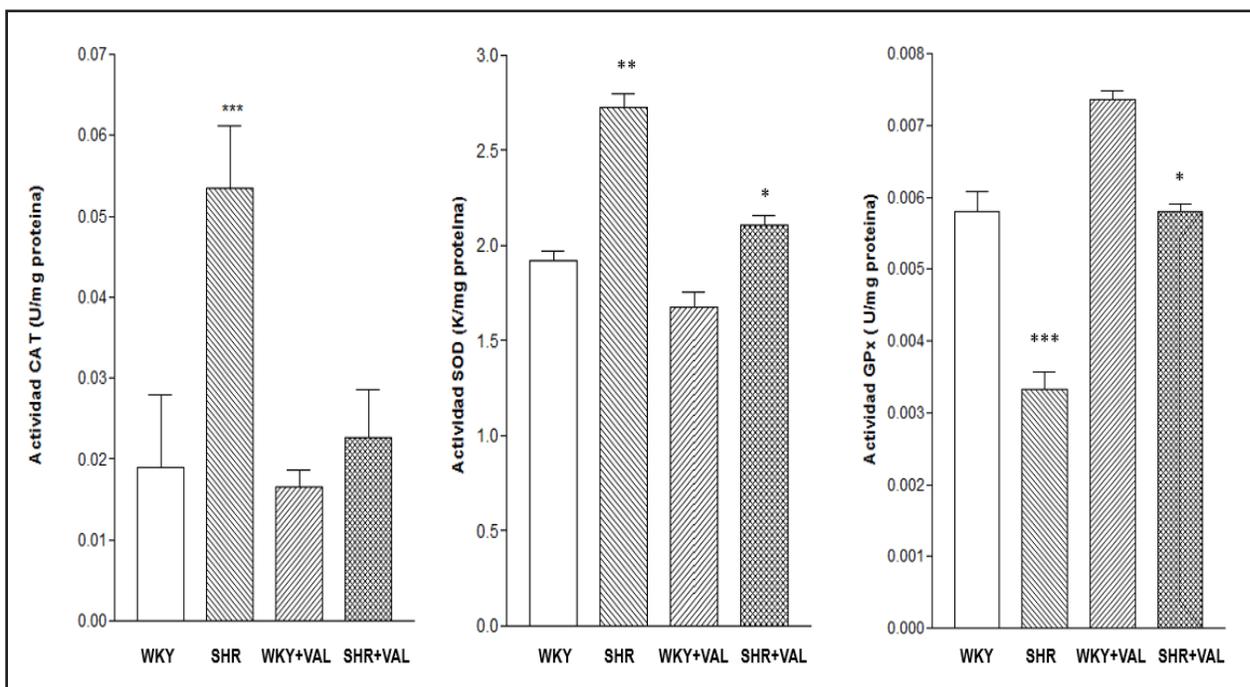
## **Discusión**

En el presente estudio se evaluó la posible asociación entre la EP y la hipertensión y sus efectos sobre el estado redox, reflejado en la actividad de las enzimas antioxidantes de la mucosa bucal. Los hallazgos indicaron que, en las ratas SHR con EP inducida experimentalmente se observa un incremento exacerbado en el conteo de leucocitos, un aumento significativamente mayor en el área de pérdida ósea maxilar en comparación con ratas normotensas con EP y alteraciones del estado oxidativo asociado a la actividad de las enzimas antioxidantes de la mucosa bucal.

La presencia de infiltrado inflamatorio es una característica constante en la EP, donde estas células ejercen un papel en la contención de las bacterias gingivales y sus productos, que debe balancearse con la



**Figura 3.** Determinación de la presión arterial media en los grupos sometidos a 11 días de tratamiento. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. N=2-5. \* $p < 0,01$  comparado con WKY



**Figura 4.** Actividad de la CAT, SOD y GPx de la encía de las ratas sometidas a 11 días de tratamiento. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. N= 6-10. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05, respecto a su propio control del grupo WKY

destrucción hística debida a la liberación de radicales libres y proteasas. De esta forma, un mecanismo defensivo se convierte en lesivo para los tejidos periodontales, y por lo tanto están involucrados en la etiopatogenia de la EP (García-Triana y col., 1998). Los leucocitos migran a través de las estructuras de unión del epitelio hacia el surco gingival y luego migran al torrente circulatorio sistémico, tal y como lo demuestra Matos y col. (2015) en un modelo de periodontitis en rata en el que el tratamiento durante 7 días con LPS produjo un aumento de la leucocitosis con neutrofilia evidente, 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.

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 EP y un riesgo aumentado de padecer aterosclerosis y ECV (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 EP que confirma la presunción que la EP causa inflamación sistémica de bajo grado inducida por la respuesta del hospedero a las bacterias periodontales (Žilinskas y col., 2011).

Ahora bien, los efectos sobre los leucocitos parecen estar exacerbados

durante la hipertensión, tal y como apuntan nuestros resultados presentes donde el incremento representa un 113% sobre el basal en comparación con el incremento reportado por Matos y col. (2013) en ratas *Sprague-Dawley* de apenas un 63 % de incremento en la leucocitosis. Igualmente, Bonato y col. (2012) demostraron que las ratas SHR con periodontitis presentan un marcado aumento de la infiltración de neutrófilos en comparación con ratas WKY. Aún más, se ha demostrado que los niveles de las enzimas de los neutrófilos como la metaloproteínasa de matriz-8 y 9, la mieloperoxidasa (MPO) y el elastómero de neutrófilos (NE) en la circulación aumentaron en pacientes con hipertensión y periodontitis crónica (Türkoglu y col., 2014). Estos hallazgos indican una relación bidireccional entre la EP y la hipertensión, lo que demuestra que la enfermedad sistémica puede influir en la patogenia de la EP, y la misma también puede traer consecuencias sistémicas (Prieto y col., 2017; Conti y col., 2020).

Con relación a la resorción ósea, nuestros hallazgos coinciden con diversos estudios que demuestran que las ratas con periodontitis tuvieron resorción del hueso alveolar, siendo que las SHR con periodontitis mostraron una pérdida ósea más marcada, en comparación con ratas WKY con EP. Las ratas SHR sufren una inflamación periodontal más severa, cuando son comparadas con su control WKY, con mayor pérdida de hueso alveolar (Bonato y col., 2012), lo que indica que en las ratas SHR, la condición hipertensiva *per se* parece favorecer los procesos inflamatorios que se potencian cuando se combinan con la periodontitis, comparado con ratas normotensas WKY. Samanovic y col. (2021) apoyan estos hallazgos ya que demuestran

que el área radiográfica de la periodontitis apical fue significativamente mayor en el grupo de ratas SHR + periodontitis apical que en el grupo periodontitis apical sólo o control.

El aumento de la PA y la EP, a pesar de ser diferentes en etiología y patogenia, tienen algunas similitudes, como una microbiota común (Bacterias anaeróbicas Gram-negativas) acompañadas por niveles elevados de citocinas sistémicas, que pueden conducir a los efectos vasculares deletéreos posteriores (Cotti y col., 2011). Sobre la base de este conocimiento, estudios clínicos confirmaron que la EP afecta el aumento del nivel de PAS, PAD y masa ventricular izquierda en sujetos con hipertensión, lo que coincide con los resultados del estudio de Angeli y col. (2003), quienes demostraron una asociación directa entre la severidad de la periodontitis y la masa ventricular izquierda, esta última como predictor independiente de ECV. Por su parte, Lockhart y col. (2012) encontraron un vínculo entre la EP y la enfermedad vascular aterosclerótica, pero sin una relación causal. Además, no pudieron demostrar que las intervenciones terapéuticas periodontales pudieran modificar el curso clínico de la enfermedad aterosclerótica, la enfermedad vascular o prevenir enfermedades del corazón.

El mecanismo biológico que podría ser importante en la asociación entre las EP y las sistémicas como la hipertensión, es sin lugar a duda el estrés oxidativo. La actividad del sistema antioxidante presente en la saliva o en la mucosa bucal, como la CAT, GPx y SOD, han resultado en biomarcadores efectivos para evaluar la severidad de la EP y la efectividad de los tratamientos (Matos y col., 2013; Lee y

col., 2019; Toczewska y Konopka, 2019). Por ello, en el presente estudio evaluamos si la EP está mediada por un cambio en la capacidad antioxidante en condiciones hipertensivas. Así, nuestros resultados muestran un incremento significativo de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD de la mucosa bucal en el grupo de las ratas hipertensas con EP inducida con el tratamiento con LPS comparada con el grupo de ratas WKY con EP, mostrándose una actividad enzimática de CAT exacerbada de un aumento de 190%, mientras que en ratas *Sprague-Dawley* con EP experimental el incremento de la actividad de la catalasa fue de apenas un 54 % (Matos y col., 2013).

La literatura muestra resultados diversos cuando se mide la actividad antioxidante del sistema de defensa enzimático, dependiendo del tejido o fluido donde se midan. Algunos estudios sugieren una disminución de las actividades antioxidantes de la SOD y CAT asociadas con la periodontitis (Trivedi y col., 2015). En estudios realizados en animales, Sobaniec y Sobaniec-Lotowska (2000) mostraron, en el suero de ratas sometidas a un modelo de ligadura para inducir la periodontitis, una reducción de la actividad de la SOD, CAT y GPx, así como un incremento del malondialdehído (MDA). A su vez, Petelin y col. (2000), estudiaron el efecto de la aplicación subgingival de liposomas de SOD en perros beagles a los cuales se había inducido la periodontitis, encontrando una mejoría en los procesos de inflamación e incremento del hueso alveolar, no así con la CAT. Estos niveles bajos de SOD y CAT observados en pacientes con periodontitis crónica, podría ser el resultado del agotamiento antioxidante debido a la generación constante de radicales libres y la destrucción de antioxidante protectores.

Contrariamente a lo reportado, nuestros resultados de un incremento en la actividad de la SOD y la CAT en la mucosa bucal de las ratas SHR sometidas a inyecciones de LPS, cuando son comparados con su control WKY con EP, puede deberse a un efecto inmediato local y no sistémico, que requiere una acción inmediata del sistema antioxidante, de ahí el incremento compensatorio en la actividad de estas enzimas. Asimismo, puede reflejar una mayor sensibilidad del sistema antioxidante en ratas SHR, con un nivel de radicales libres exacerbado por la hipertensión con una sobreexpresión de estas enzimas. En apoyo a nuestros resultados se encuentran los de Panjamurthy y col. (2005) quienes reportan un incremento en el estado oxidativo total y en los valores de SOD en suero, saliva y fluido gingival crevicular (FGC) de pacientes con periodontitis crónica y niveles incrementados de MDA sólo en el FGC, que retornaron a niveles basales con terapia.

Estos resultados sugieren que la hipertensión asociada a la EP se acompaña con una situación de estrés oxidativo, con adaptaciones de mecanismos antioxidantes, con el fin de contrarrestar los efectos negativos de la oxidación. Probablemente, el sistema antioxidante celular defensivo posee capacidad de adaptación al efecto del estrés oxidativo que acompaña a la hipertensión. Así pues, en esta patología observamos un aumento de estrés oxidativo, que no puede ser atribuido a un defecto del sistema antioxidante. Puede especularse que cuando el estrés oxidativo es mayor, la célula genera una mayor actividad antioxidante (Labiós y col., 2011).

Entre los principales mecanismos que

poseen las células para prevenir o reparar los efectos deletéreos del estrés oxidativo, está el glutatión (Giustarini y col., 2017; Yang y col., 2020;). La forma reducida del glutatión (GSH) es un péptido de tres aminoácidos que experimenta ciclos de oxidación y reducción en el grupo sulfidrilo de la cisteína terminal. Durante la oxidación, dos moléculas de GSH donan sus electrones para reducir el producto blanco y se forma una unión sulfidrilo entre ellos, generando el glutatión oxidado (GSSG). El estrés oxidativo puede disminuir tanto el glutatión total como es GSH. Efectivamente, Tsai y col. (2015) encontraron que la concentración de glutatión salival estaba reducida en pacientes con periodontitis crónica comparados con sujetos sanos, sugiriendo que este antioxidante se consume durante la producción de las EROs que llevó a su deficiencia. En apoyo a esto, nuestros hallazgos muestran que la actividad del GPx sufrió una disminución de la actividad de la enzima en el grupo de ratas SHR a las que se les indujo la EP con relación al grupo de ratas WKY con EP, posiblemente debido a la reducción de la concentración de glutatión en las ratas hipertensas.

Existe evidencia que indica que la ANG II desempeña un papel decisivo en la inducción de la producción de EROs en diferentes tejidos durante la EP asociada a la HTA, ambas frecuentemente asociadas con aumento de los niveles de ANGII (Romero y Reckelhoff, 1999). Efectivamente, nuestros hallazgos apoyan el papel de la ANG II y su receptor  $AT_1$  en las alteraciones producidas en las ratas hipertensas con EP, ya que el pre-tratamiento con valsartán, además de reducir la PA en las ratas SHR, fue capaz de revertir el incremento exacerbado de la

leucocitosis, de la mayor pérdida ósea y de la alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes.

La participación del receptor  $AT_1$  y la NAD(P)H oxidasa en la acción de la ANG II en la producción de EROs durante la EP fue demostrada por Matos y col. (2013), quienes mostraron que la apocinina, un inhibidor del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa, fue capaz de revertir el incremento de la actividad de la SOD y CAT inducidos por la inyección de LPS. Del mismo modo, el tempol, un atrapador del anión superóxido que mimetiza la acción de la SOD, fue capaz de prevenir el efecto de la administración del LPS sobre las enzimas antioxidantes. Estos resultados sugieren que durante la periodontitis experimental inducida con inyecciones de LPS ocurre la activación secuencial que implica a la ANG II, el receptor  $AT_1$ , la NAD(P)H oxidasa y el anión superóxido. Efectivamente, los hallazgos de Matos y col. (2013), nos permiten inferir que en la EP inducida con inyecciones con LPS en ratas hipertensas, las EROs participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el receptor  $AT_1$  y su acople a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa.

Santos y col. (2015) demostraron la expresión de los componentes del SRA en el tejido gingival de la rata, el cual es capaz de generar los péptidos de angiotensina, indicando la presencia de un SRA funcional. Efectivamente, estos autores encontraron expresión de renina, enzima convertidora de angiotensina, receptores  $AT_1$  y  $AT_2$ , en diferentes regiones del microambiente oral; por ejemplo, en la porción apical de la raíz, la papila interdental, y el epitelio oral, lo que sugiere la distribución pleiotrópica de los componentes SRA en el tejido periodontal. En particular, demostraron

que el inhibidor de la renina, aliskiren y el inhibidor de receptor  $AT_1$ , losartán, fueron capaces de prevenir la pérdida ósea en ratas después de la inducción de periodontitis experimental. Del mismo modo, Suda y col. (2013), utilizando un modelo de ratón, encontraron que el bloqueante del receptor  $AT_1$ , telmisartán, previno la pérdida de hueso alveolar en ratones heterocigotos para síndrome de Marfan infectados con *P. gingivalis* en comparación con los ratones de control. Además, Araújo y col. (2013), en un modelo de periodontitis inducida por ligadura en rata demostraron que el telmisartán fue capaz de atenuar la formación de EROs, íntimamente asociadas a la activación de genes proinflamatorios, la inflamación, y a la expresión de metaloproteinasas de la matriz y la pérdida ósea. Toda esta evidencia está en línea con nuestros resultados presentes, en los que se demuestra que el valsartán fue capaz de revertir la resorción ósea gingival en ratas SHR con EP, y apoya el papel del receptor  $AT_1$  en la progresión de la EP durante la hipertensión.

El SRA participa en la regulación de la PA y la homeostasis del volumen y en la fisiopatología de la hipertensión y otras afecciones como la EP (Yim and Too, 2008; Santos y col., 2015). Efectivamente, el aumento de la actividad del SRA es un determinante importante para numerosas afecciones patológicas porque la ANG II aumenta la liberación de aldosterona, la PA y el estrés oxidativo y contribuye al desarrollo de daño en los órganos terminales a través de efectos directos sobre el tejido cardíaco, vascular y renal (Yim and Too, 2008). En vista del importante papel del SRA en la hipertensión y la EP, es lógico pensar que su inhibición debería corregir el incremento de la PA y la progresión de la EP. En apoyo a esta

aseveración, nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con el bloqueante de los receptores  $AT_1$ , el valsartán, previene de modo significativo la progresión de la EP exacerbada en la rata hipertensa en etapas tempranas de la patología, ya que fue capaz de revertir el aumento la PA y la alteración de la actividad enzimática de la SOD, la CAT y la GPx en tejido gingival de rata, lo que indica una relación entre los marcadores de estrés oxidativo y la hipertensión asociada a EP. El hecho que estos efectos hayan sido revertidos por el tratamiento con VAL, sugiere un papel de la ANGII/RAT<sub>1</sub> en la patogénesis de la EP inducida con LPS en la hipertensión. Similarmente, Labiós y col. (2011) señalan que el tratamiento durante dos meses con el telmisartán, otro bloqueante del receptor  $AT_1$  de la ANG II, indujo en pacientes, una reducción de las cifras tensionales junto al estrés oxidativo medido en los leucocitos, observando en paralelo, una disminución del sistema de antioxidante. Dicho descenso parecería indicar que la célula no necesita tanta actividad antioxidante cuando la hipertensión se normaliza. Adicionalmente, Li y col. (2019) demostraron que la HTA empeora la resorción ósea y la destrucción del ligamento periodontal en la periodontitis y estos efectos fueron revertidos mediante el tratamiento con losartán.

Nuestros estudios muestran un papel central de la ANG II como mediador del estrés oxidativo en la patogénesis de la periodontitis exacerbada por hipertensión, lo que indica que la ANG II puede ser un blanco terapéutico en pacientes con hipertensión y comorbilidad de periodontitis.

## Conclusiones

Nuestros resultados demuestran la presencia de EP en las ratas SHR con

EP inducida experimentalmente se manifiesta por la pérdida ósea marcada. En las ratas hipertensas con EP inducida experimentalmente, la EP se acompañó de un aumento más pronunciado en el número total de leucocitos y de la actividad de la CAT y SOD comparada con las ratas normotensas con EP inducida experimentalmente, lo que se asocia a la presencia de estrés oxidativo exacerbado. Igualmente, se observó una disminución de la actividad de la GPx, posiblemente debido a la reducción de la concentración de glutatión en las ratas hipertensas. Todos estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con VAL, sugiriéndose un papel de la ANGII/RAT<sub>1</sub> en la patogénesis de la EP asociada a la hipertensión. Estos hallazgos abren nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento de la EP y su comorbilidad la hipertensión.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por Misión Ciencia (FONACIT-MPPCT) No. 2007001585 y CDCH PI- 06-7368-2008-1 y CDCH PG007349-2001 etapas 1 y 2.

## Referencias bibliográficas

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. In *Methods Enzymol* 105:121–126.
- Aguilera E, Suvan J, Buti J, Czesnikiewicz-Guzik M, Ribeiro A, Orlandi M, Guzik TJ, Hingorani A, Nart J, D'Aiuto F. 2020. Periodontitis is associated with hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Res* 116(1):28–39.
- Androulakis ES, Tousoulis D, Papageorgiou N, Tsioufis C, Kallikazaros I, Stefanadis C. 2009. Essential hypertension: ¿is there a role for inflammatory mechanisms? *Cardiol Rev* 17:216–21.
- Angeli F, Verdecchia P, Pellegrino C, Pellegrino R, Pellegrino G, Prosciutti L, Giannoni C, Cianetti S, Bentivoglio M. 2003. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. *Hypertension* 41:488–492.
- Araújo A, Souza T, Moura L, Brito G, Aragao K, Araújo L, Medeiros C, Alves M, Araújo Jr R. 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.
- Bahekar A, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. 2007. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J* 154: 830–837.
- Bascones Martínez A, Figuero Ruiz E. 2005. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Av Periodon Implantol* 17(3): 147–156.
- Beck J, Offenbacher S. 2001. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. *Ann Periodontol* 6: 9–15.
- Bonato CF, do-Amaral C, Belini L, Salzedas L, Oliveira S. 2012. Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *J Periodontal Res* 47(6):783–792.
- Bouchard P, Boutouyrie P, D'Aiuto F, Deanfieldm J, Deliargyris E, Fernandez-Avilés F, Hughes F, Madianos P, Renvert S, Sanz M. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. *Eur Heart J Suppl* 12(suppl B): B13–22.
- Brock G, Butterworth C, Matthews J, Chapple I. 2004. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 31:515–521.
- 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.
- Chen Y, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, Iwai T, Izumi Y, Ishikawa I. 2008. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35: 153–158.
- Chrysohoou C, Pitsavos C, Panagiotakos D, Skoumas J, Stefanadis C. 2004. Association between prehypertension status and inflammatory markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. *Am J Hypertens* 17:568–573.
- Conti L, Segura-Egea J, Cardoso C, Benetti F, Azuma M, Oliveira P, Bomfim S, Cintra L. 2020. Relationship between apical periodontitis

- and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study. *International Endodontic J* 53:1387–1397.
- Czopek A, Moorhouse R, Guyonnet L, Farrah T, Lenoir O, Owen E, van Bragt J, Costello HM, Menolascina F, Baudrie V, Webb DJ, Kluth DC, Bailey MA, Tharaux PL, Dhaun N. 2019. A novel role for myeloid endothelin-B receptors in hypertension. *Eur Heart J* 40:768.
- Cotti E, Dessì C, Piras A, Mercurio G. 2011. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. *Int J Cardiol* 148(1):4–10.
- D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. 2010. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 89:1241–1246.
- De Nardin E. 2001. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann Periodont* 6: 30–40.
- Demmer R, Papapanou P. 2010. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53:28–44.
- DeStefano F, Anda R, Kahn H, Williamson D, Russell C. 1993. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 306: 688–691.
- Desvarieux M, Demmer R, Jacobs Jr D, Rundek T, Boden-Albala B, Sacco R, Papapanou P. 2010. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *J Hypertens* 28: 1413–1421.
- Dionisio T, Souza G, Colombini-Ishikiriama B, Garbieri T, Parisi V, Oliveira G, Cano I, Rodini CO, Oliveira SH, Greene AS, Santos C. 2019. AT1 receptor antagonism promotes bone loss attenuation in experimental periodontitis, block inflammatory mediators, upregulate antioxidant enzymes and bone formation markers. *J Periodontol* 91 (4): 533–544.
- Dominy S, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder M, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker G, Reynolds E, Faull R, Curtis M, Dragunow M, Potempa J. 2019. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5: eaau3333.
- Drummond G, Vinh A, Guzik T, Sobey C. 2019. Immune mechanisms of hypertension. *Nat Rev Immunol* 19:517–532.
- El Kholy K, Genco R, VanDyke T. 2015. Oral infections and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinol Metab* 26(6):315–321.
- Esen C, Alkan B, Kırnap 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.
- Flohé L, Günzler W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. In *Methods Enzymol Display Settings* 105:114–121.
- Förstermann U. 2008. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5: 338–349.
- Gani D, Lakshmi D, Krishnan R, Emmadi P. 2009. Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 13(2): 69–74.
- García-Triana B, García-Piñeiro J, Saldaña-Bernabeu A. 1998. la peroxidación lipídica en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev Cub Estomatol* 35(1): 25–29.
- Gaurilcikaite E, Renton T, Grant AD. 2017. The paradox of painless periodontal disease. *Oral Dis* 23 (4): 451–463.
- Giannopoulou C, Krause KH, Müller F. 2008. The NADPH oxidase NOX2 plays a role in periodontal pathologies. *Semin Immunopathol* 30:273–278.
- Giustarini D, Colombo G, Garavaglia M, Astori E, Portinaro N, Reggiani F, Badalamenti S, Aloisi A, Santucci A, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. 2017. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med* 112: 360–375.
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204:2449–2460.
- Holmlund A, Holm G, Lind L. 2006. Severity of periodontal disease and number of remaining teeth are related to the prevalence of myocardial infarction and hypertension in a study based on 4254 subjects. *J Periodontol* 77: 1173–1178.
- Hujoel P, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen T. 2000. Periodontal disease and coronary heart disease risk. *JAMA* 284: 1406–1410.
- Humphrey L, Fu R, Buckley D, Freeman M, Helfand M. 2008. Periodontal Disease and Coronary Heart

- Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Gen Intern Med* 23: 2079–2086.
- Inoue K, Kobayashi Y, Hanamura H, Toyokawa S. 2005. Association of periodontitis with increased white blood cell count and blood pressure. *Blood Press* 14: 53–58.
- Isola G, Polizzi A, Muraglie S, Leonardi R, Lo Giudice A. 2019a. Assessment of vitamin C and antioxidant profiles in saliva and serum in patients with periodontitis and ischemic heart disease. *Nutrients* 11(12):2956.
- Isola G, Polizzi A, Santonocito S, Alibrandi A, Ferlito S. 2019b. Expression of salivary and serum malondialdehyde and lipid profile of patients with periodontitis and coronary heart disease. *Int J Mol Sci* 20(23):6061.
- Isola G, Alibrandi A, Currò M, Matarese M, Ricca S, Matarese G, Lentile R, Kocher T. 2020. Evaluation of salivary and serum ADMA levels in patients with periodontal and cardiovascular disease as subclinical markers of cardiovascular risk. *J Periodontol* doi: 10.1002/JPER.19-0446. Online ahead of print.
- Itani HA, McMaster WG, Saleh MA, Nazarewicz RR, Mikolajczyk TP, Kaszuba AM, Konior A, Prejbisz A, Januszewicz A, Norlander AE, Chen W, Bonami RH, Marshall AF, Poffenberger G, Weyand CM, Madhur MS, Moore DJ, Harrison DG, Guzik TJ. 2016. Activation of Human T Cells in Hypertension: Studies of Humanized Mice and Hypertensive Humans. *Hypertension* 68(1): 123–132.
- Kimura S, Yonemura T, Kaya H. 1993. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J Periodontol* 28:197–203.
- Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiel D, Zalewska A. 2013. Oxidative stress and salivary antioxidants. *Dent Med Probl* 50:461–466.
- Konkel JE, O'Boyle C, Krishnan S. 2019. Distal consequences of oral Inflammation. *Front Immunol* 10:1403.
- Labandeira-García J, Rodríguez A, Garrido P, Rodríguez J, Lanciego J, Guerra M. 2017. Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration. *Frontier Aging Neurosci* 9: 129.
- Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Navarro B. 2011 Efecto del telmisartán en el estrés oxidativo y actividad antioxidante en leucocitos de sangre periférica de pacientes hipertensos. *Hipertensión y Riesgo Vascular* 28(2):48–54.
- Lee C-Y, Chang C-H, Teng N-C, Chang H-M, Huang W-T, Huang Y-K. 2019. Associations between the phenotype and genotype of MnSOD and catalase in periodontal disease. *BMC Oral Health* 19(1):201.
- Li M, Liu J, Han C, Wang B, Pang X, Mao J. 2011. Angiotensin II induces the expression of C-reactive protein via MAPK-dependent signal pathway in U937 macrophages. *Cell Physiol Biochem* 27(1): 63–70.
- Li J, Xiao X, Wei W, Ding H, Yuan Yue Y, Ye Tian Y, Nabar N, Zhaohui L, ZYang Z, Wang M. 2019. Inhibition of Angiotensin II Receptor I Prevents Inflammation and Bone Loss in Periodontitis. *J Periodon* 90(2): 208–216.
- Lockhart P, Bolger A, Papapanou P, Osinbowale O, Trevisan M, Levison M, Taubert K, Newburger J, Gornik H, Gewitz M, Wilson W, Smith S Jr, Baddour L. 2012. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: ¿does the evidence support an independent association?: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 125:2520–2544.
- Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 193: 265–275.
- Macedo Paizan ML, Vilela-Martin JF. 2014. Is There an Association between Periodontitis and Hypertension? *Curr Cardiol Rev* 10:355–361.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin E. 2008. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29:367–374.
- Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, Agossa K, Gaertner S, Tenenbaum H, Davideau J-L, Huck O. 2016. Association between periodontitis and arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 180:98–112.
- Matos M, Billet E, Mathison Y, Israel A, Garrido M. 2013. Generación de especies reactivas de oxígeno en la periodontitis experimental en la rata. Papel del receptor AT<sub>1</sub> y la NAD(P)H oxidasa. *Rev Fac Farm* 76(1 y 2): 58–66.
- Matos M, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido M. 2014. El valsartán previene la resorción ósea en la periodontitis experimental. *Rev Periodoncia Osteointegración* 4(4): 289–295.
- Matos M, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido MR. 2015. Papel del receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II en la remodelación ósea que ocurre durante la enfermedad periodontal experimental en la rata. *Rev Fac Farm* 78 (1-2): 84–93.

- Matos M, Israel A, Billet E, Garrido M. 2016. Las citoquinas proinflamatorias en la enfermedad periodontal experimental. Efecto del valsartán. *Rev Fac Farm* 79(1 y 2): 17–27.
- Matos M, Israel A, Billet E, Garrido M. 2019. Efecto del valsartán sobre los niveles de citocinas y quimiocinas salivales en la enfermedad periodontal experimental. *Rev Fac Farm* 80(1y2):27–45.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. 2002. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90: E58–E6.
- Nakajima T, Yamazaki K. 2009. Periodontal disease and risk of atherosclerotic coronary heart disease. *Odontology* 97:84–91.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. In *Meth Enzymol* 105:457–464.
- Oparil S, Acelajado M, Bakris G, Berlowitz D, Cífková R, Dominiczak A, Grassi G, Jordan J, Poulter N, Rodgers A, Whelton P. 2018. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 4:18014.
- Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran C. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Letters* 10: 255–264.
- Papapanou P, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine D, Flemming T, Garcia R, Giannobile W, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao R, Kebschull M, Kinane D, Kirkwood K, Kocher T, Kornman K, Kumar P, Loos B, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour G, Teles R, Tonetti M. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Proc J Clin Periodontol* 89 (Suppl 1): S173–S182.
- Petelin M, Pavlica Z, Ivanus AT, Entjunc MS, Skaleric U. 2000. Local delivery of liposome encapsulated superoxide dismutase and catalase suppress periodontal inflammation in beagles. *J Clin Periodontol* 27:918–925.
- Phillips M, Kagiya S. 2002. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Current Opinion in Investigational Drugs* 4: 569–577.
- Pietropaoli D, Del Pinto R, Ferri C, Marzo G, Giannoni M, Ortu E, Monaco A. 2020. Association between periodontal inflammation and hypertension using periodontal inflamed surface area and bleeding on probing. *J Clin Periodontol* 47(2):160–172.
- Price A, Lockhart J, Ferrell W, Gsell W, McLean S, Sturrock R. 2007. Angiotensin II type 1 receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56:441–447.
- Prieto A, Gomes-Filho J, Azuma M, Sivieri-Araújo G, Narciso L, Souza J, Ciarlini P, Tavares L, Cintra A. 2017. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. *J Endodontics* 43:1651–1656.
- 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(9): 679–683.
- Romero J, Reckelhoff J. 1999. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. Romero JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 34: 943–934.
- Samanovic A, Jakovljevic V, Vasovic M, Mitrovic S, Rankovic M, Mihajlovic K, Bolevich S, Zivkovic V. 2021. Cardiac, biochemical and histopathological analysis reveals impaired heart function in hypertensive rats with apical periodontitis. *Int Endod J* 00:1–16.
- 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.
- Santos C, Morandini A, Dionisio T, Faria F, Lima M, Figueiredo C, Colombini-Ishikiriama B, Sipert C, Maciel R, Akashi A, Souza G, Garlet G, Rodini C, Amaral S, Becari C, Salgado M, Oliveira E, Matus I, Didier D, Greene A. 2015. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS One* 10(8): e0134601.
- Sanz M, D’Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease-scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *Eur Heart J Supplements* 12 (Suppl B):3-12.
- Sesso H, Buring J, Rafai N, Blake G, Gaziano M, Ridker P. 2003. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 290:2945–51.
- Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME. 2000. Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected

- processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* 6:875–881.
- Southerland J. 2013. Periodontitis may contribute to poor control of hypertension in older adults. *J Evid Based Dent Pract* 13:125–127.
- Suda N, Moriyama K, Ganburged G. 2013. Effect of angiotensin II receptor blocker on experimental periodontitis in a mouse model of Marfan syndrome. *Infect Immun* 81: 182–188.
- Taguchi A, Sanada M, Sueti Y, Ohtsuka M, Lee K, Tanimoto K, Tsuda M, Ohama K, Yoshizumi M, Higashi Y. 2004. Tooth loss is associated with an increased risk of hypertension in postmenopausal women. *Hypertension* 43: 1297–1300.
- Toczewska J, Konopka T. 2019. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literature. *Dent Med Probl* 56(4):419–426.
- Toczewska J, Maciejczyk M, Konopka T, Zalewska A. 2020. Total Oxidant and Antioxidant Capacity of Gingival Crevicular Fluid and Saliva in Patients with Periodontitis: Review and Clinical Study. *Antioxidants* 9:450.
- Tonetti MS, D’Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani A, Vallance P, Deanfield J. 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 356:911–920.
- Tonetti MS, Dyke TE. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Clin Periodontol* 40: S24.
- Tóthová L, Celec P. 2017. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. *Front Physiol* 8:1055.
- Touyz R. 2004a. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37:1263–1273.
- Touyz R. 2004b. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248–52.
- Trivedi S, Lal N, Ali Mahdi A, Singh B, Pandey S. 2015. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 35(2): e14–19.
- Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. 2005. Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontol* 40:378–384.
- Tsakos G, Sabbah W, Hingorani A, Netuveli G, Donos N, Watt RG, D’Aiuto F. 2010. Is periodontal inflammation associated with raised blood pressure? Evidence from a National US survey. *J Hypertens* 28: 2386–2393.
- Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, Stefanadis C. 2011. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis* 219: 1–9.
- Türkoglu Ö, Barış N, Taina Tervahartiala T, Mer Sxenarslan Ö, Sorsa T, Atilla G. 2014. Evaluation of systemic levels of neutrophilic enzymes in patients with hypertension and chronic periodontitis. *J Periodontol* 85:908–916.
- Völzke H, Schwahn C, Dörr M, Schwarz S, Robinson D, Dören M, Rettig R, Felix SB, John U, Kocher T. 2006. Gender differences in the relation between number of teeth and systolic blood pressure. *J Hypertens* 24: 1257–63.
- Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. 2017. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol* 8:910.
- Yang N, Gonzalez-Vicente A, Garvin J. 2020. Angiotensin II-induced superoxide and decreased glutathione in proximal tubules: effect of dietary fructose. *Am J Physiol Renal Physiol* 318(1): F183–F192.
- Yim HE, Yoo KH. 2008. Renin angiotensin System. Considerations for hypertension and kidney. *Electrolyte & Blood Pressure* 6:42–50.
- Zeigler C, Wondimu B, Marcus C, Mode´er T. 2015. Pathological periodontal pockets are associated with raised diastolic blood pressure in obese adolescents. *BMC Oral Health* 15:1.
- 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.

---

*Recibido: 23/03/2021*  
*Aceptado: 24/08/2021*