

# 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

## Reactive oxygen species generation in experimental periodontitis in rat. Role of AT<sub>1</sub> receptor and NAD(P)H oxidase

MARÍA GABRIELA MATOS, ELODIE BILLET, YAIRA MATHISON,  
ANITA ISRAEL Y MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO\*

### Resumen

La enfermedad periodontal es una condición inflamatoria progresiva que afecta los tejidos que soportan y rodean a los dientes. Las endotoxinas bacterianas como los lipopolisacáridos, inducen una cascada inflamatoria mediante la producción de especies reactivas del oxígeno.

Se sabe que el sistema renina angiotensina está involucrado en la inflamación. Su efector, la angiotensina II (ANG II) ejerce acciones pro-inflamatorias mediante la activación de los receptores AT<sub>1</sub> y la NAD(P)H oxidasa con la consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

En un modelo de enfermedad periodontal inducida por la inyección de lipopolisacáridos (LPS) en la encía de la rata, en el que se ha demostrado un incremento del estrés oxidativo y de la actividad de tres enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), se evaluó el efecto del bloqueo selectivo del receptor AT<sub>1</sub> con valsartán, la inhibición de la NAD(P)H oxidasa con apocinina o el uso de un compuesto que mimetiza la acción de la superóxido dismutasa como el tempol, sobre el incremento de la producción de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y sobre el incremento de tres enzimas antioxidantes.

Nuestros resultados demuestran que en la periodontitis experimental, el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> previene la producción de TBARS así como el incremento de la actividad de las tres enzimas antioxidantes. De igual forma los hallazgos demuestran que la inhibición del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa con apocinina o la reducción de la producción de ERO con tempol, previnieron el incremento de la actividad de las tres enzimas antioxidantes inducidas por el LPS.

Los datos permiten concluir que el proceso inflamatorio que subyace en la enfermedad periodontal experimental se asocia a la vía que implica la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> y la enzima NAD(P)H oxidasa y la consecuente producción de ERO. Además los mismos ofrecen una nueva alternativa terapéutica en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

**Palabras clave:** Apocinina, tempol, NAD(P)H oxidasa, periodontitis experimental.

### Abstract

Periodontal disease is a progressive inflammatory condition that affects the surrounding tissues that support the teeth. Bacterial endotoxins such as lipopolysaccharides induce an inflammatory cascade by producing reactive oxygen species.

It is known that the renin-angiotensin system is involved in inflammation. Its effector, angiotensin II (ANG II) exerts pro-inflammatory actions by activating the AT<sub>1</sub> receptor and NAD(P)H oxidase and the consequent generation of reactive oxygen species (ROS).

In periodontal disease model induced by injection of lipopolysaccharide (LPS) in rat gingiva, it was shown an increase in oxidative stress and activity of three antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), we evaluated the effect on the increased the production of substances which react with thiobarbituric acid (TBARS) and on the increase of the activity of three antioxidant enzymes of the selective blockade of AT<sub>1</sub> receptor with valsartan, the inhibition of the NAD(P)H oxidase with apocynin or the use of a compound that mimics the action of

Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

\* Correspondencia: E-mail: mrgarrido11@hotmail.com, oficina: 605-2284.

superoxide dismutase as tempol. Our results show that in experimental periodontitis, AT<sub>1</sub> receptor blockade prevents TBARS production and blunts the increased activity of the three antioxidant enzymes. Likewise, the findings demonstrate that inhibition of the assembly of NAD(P)H oxidase with apocynin or reduction of ROS production with tempol, prevented the increase of the activity of the three antioxidant enzymes induced by LPS.

The data support the concept that the underlying inflammatory process in experimental periodontal disease is associated with the pathway involving stimulation of AT<sub>1</sub> receptor and NAD(P)H oxidase and the consequent ROS production. Furthermore they offer a new therapeutic option in the treatment of periodontal disease.

**Keywords:** Apocynin, tempol, NAD(P)H oxidase, experimental periodontitis.

## Introducción

La periodontitis (*peri* = alrededor, *odont* = diente, *itis* = inflamación), es una patología de naturaleza infecciosa, crónica, inflamatoria y destructiva, desencadenada por la presencia de bacterias específicas y sus productos. La Enfermedad Periodontal (EP) es iniciada por la biopelícula subgingival, sin embargo la respuesta del hospedero es esencial en la progresión de la enfermedad, ésta incluye: liberación y activación de proteasas, liberación de citoquinas, derivados del ácido araquidónico y la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), entre otros. Actualmente se consideran a las ERO como segundos mensajeros intracelulares capaces de promover múltiples respuestas celulares como la inflamación, el crecimiento y la diferenciación (Chapple y col., 2007).

Existe evidencia acerca del posible papel de las ERO en el daño periodontal. Las vías –dependientes de oxígeno– de la función fagocítica, dan lugar a la producción de radicales libres. Estas partículas reactivas actúan sobre estructuras macromoleculares generando alteraciones y daño tisular por diferentes mecanismos tales como peroxidación lipídica (tanto de los fosfolípidos de las membranas celulares como de las lipoproteínas plasmáticas) y la degeneración del ADN, oxidación de enzimas, estimulación de la liberación de citoquinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos y daño a proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los macrófagos y en menor extensión los eosinófilos, linfocitos y fibroblastos, son ejemplos de células que producen anión superóxido como agente antimicrobiano vía la acción de la NAD(P)H oxidasa. El singlete de oxígeno es capaz de atacar blancos biológicos de importancia periodontal así como de dismutar espontáneamente en solución acuosa y formar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y anión superóxido, los cuales a su vez pueden ocasionar daño tisular. Se ha determinado la presencia del anión superóxido en el espacio del borde en cepillo de los osteoclastos, involucrando a este radical en la degradación de la matriz ósea en la interfase hueso-osteoclasto (Key y col., 1994).

La evidencia apunta hacia la participación de estas moléculas en la EP. Así, en pacientes con periodontitis rápidamente progresiva, se ha demostrado que los neutrófilos polimorfonucleares, están funcionalmente activados y que producen elevados niveles de O<sub>2</sub> (Shapira y col., 1991). Este mismo efecto fue observado en pacientes con periodontitis juvenil localizada y generalizada y en pacientes con periodontitis del adulto (Gustafsson y Asman, 1996).

Las ERO pueden ser producidas en la célula de los mamíferos por un grupo de enzimas entre las cuales podemos encontrar a la xantina oxidasa, la ciclo-oxigenasa, el citocromo P450, la sintasa del óxido nítrico (NOS) y la NAD(P)H oxidasa. En los últimos años, se ha evidenciado que la fuente más importante de ERO la constituye las NAD(P)H oxidasa, estas enzimas aceptan electrones del NAD(P)H dentro de la célula y los transportan a través de la membrana para finalmente donarlos al oxígeno, esta reacción genera el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y las demás ERO corriente abajo. Aunque las NAD(P)H oxidasas fueron originalmente consideradas como enzimas que se expresan solamente en las células fagocíticas involucradas en la defensa del huésped y en la inmunidad innata, la evidencia reciente indica que existe toda una familia de NAD(P)H oxidasas, las cuales se expresan en muchos tejidos y median diversas funciones biológicas, la NAD(P)H fagocítica más común en la EP es la NOX2 (Giannopoulou y col., 2008).

Dado el carácter aeróbico de las células y tejidos, estas ERO se generan en condiciones fisiológicas, y sus concentraciones están gobernadas por el balance entre su producción y su eliminación siendo esto crucial para el funcionamiento normal de células y tejidos. Si el balance entre la formación y la eliminación de ERO se altera a favor de lo primero, estos metabolitos inducen reacciones en cadena, capaces de dañar a las moléculas de importancia biológica (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). En particular el ataque a los lípidos provoca su peroxidación, lo que a su vez conduce a la formación de nuevas especies de radicales y metabolitos tóxicos, por lo que se desencadena una cascada

de eventos que amplifican el daño, participando así en numerosas afecciones y procesos que incluye a la inflamación (Weiss y col., 2001).

Para lograr contrarrestar el proceso de estrés oxidativo existen sistemas antioxidantes, los cuales están constituidos entre otros por las enzimas antioxidantes, encargadas del atrapamiento y metabolismo de las ERO. Estas enzimas están distribuidas ubicuamente en el organismo e incluyen a las superóxido dismutasas (SODs), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) (Chapple y col., 2007).

Estudios realizados en pacientes con periodontitis han reportado una reducción de la capacidad antioxidante total en el fluido gingival crevicular (FGC) (Brock y col., 2004), siendo esto confirmado por estudios de asociación en gran escala donde se demostró que pacientes con periodontitis tenían una capacidad antioxidante total plasmática disminuida (Chapple y col., 2007). Se ha demostrado que el FGC contiene cantidades inusualmente altas de Glutatión (GSH) y que estos niveles son menores en pacientes con periodontitis que en los controles reflejando una estrategia de defensa innata en las superficies epiteliales expuestas y vulnerables (Grant y col., 2010).

Por otro lado el estrés oxidativo ha sido implicado en la regulación de tirosinas quinasas y fosfatasa, en la expresión de genes inflamatorios, en la función endotelial, en el crecimiento de las células del músculo liso vascular (CMLV) y en la formación de la matriz extracelular (Metha y Griendling, 2006).

En la década de los 90's, el grupo de Griendling y colaboradores reportaron por primera vez la activación de la NADP(H) oxidasa por la ANG II en CMLV (Griendling 2006). Así, se ha demostrado que la activación del receptor  $AT_1$ , estimula a la NAD(P)H oxidasa no fagocítica induciendo la producción del anión superóxido en varios tipos de células vasculares, fibroblastos y también en los cardiomiocitos (Weiss y col., 2001). Aún mas, se ha sugerido que la ANG II actúa como una citoquina pro-inflamatoria ya que la administración de bloqueantes del receptor  $AT_1$  ejercen efectos antipro-inflamatorios en procesos tales como la inflamación vascular subyacente a la artritis reumatoide (Price y col., 2007), la aterosclerosis (Phillips y Kagiyama, 2002), en procesos de inflamación vascular subyacentes a hipertensión y otras patologías (Cheng y col., 2005).

Debido a la demostrada evidencia de un incremento en los niveles de peroxidación lipídica y de estrés oxidativo en la periodontitis, en el presente estudio se evaluó si la inflamación que subyace a la periodontitis experimental se asocia a la activación del sistema renina angiotensina en las encías y a la

activación de la cascada de producción del especies reactivas de oxígeno. Para ello, se estudió el papel del receptor  $AT_1$  sobre la producción de ERO en la periodontitis inducida por el tratamiento con lipopolisacáridos (LPS) en las encías de rata, a través de la determinación de la activación de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GPx. Igualmente se determinó el papel de la NAD(P)H oxidasa y la producción de ERO, mediante el uso de la apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa y del tempol, un atrapador de anión superóxido que mimetiza la acción de la SOD en la EP inducida por LPS en la rata.

## Materiales y métodos

### ANIMALES Y PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley, macho, de 280-300 g de peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene (INH), mantenidas en condiciones controladas de luz y temperatura con libre acceso al agua y la comida. Los experimentos fueron realizados bajo la supervisión de la Comisión de Bioterio y Manejo de Animales Experimentales 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 es inducida 24 horas antes del inicio del tratamiento con el antagonista de los receptores  $AT_1$  el valsartán (VAL). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/kg) e inyectadas directamente en la encía vestibular entre el primer y segundo molar con 10  $\mu$ L (1 mg/mL) de LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*), purificado cromatográficamente (Sigma, St. Louis), cada dos días para un total de 4 inyecciones en un período de 7 días de tratamiento. Las ratas control recibieron 4 inyecciones de solución salina durante el mismo período de tiempo. Las ratas fueron distribuidas en los siguientes grupos: (1) CONTROL, (2) LPS, (3) VALSARTAN (VAL), (4) LPS+VAL (L+V). EL valsartán fue administrado diariamente por vía oral (10mg/Kg). Al tiempo estipulado, las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/Kg) y eutanizadas por decapitación.

### OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUCOSA

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se aisló la encía 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 recolectado fue utilizado como muestra.

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

##### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA SOD TOTAL

La actividad de la SOD total se realizó según el método de Oberley y Spitz, 1984. Para ello se añadió 33  $\mu\text{L}$  del tejido de interés homogenizado y diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos 50 nM (pH 7), al cual se 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 °C. La reacción se inició con la adición de 10  $\mu\text{L}$  de la enzima xantina oxidasa. Se incluyeron controles constituidos por tejido sin enzima, así como de enzima sin tejido (100% de reducción). Los tubos se incubaron por 30 minutos, seguidos de la adición de 60  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre (II) 0,8 mM midiéndose la absorbancia a 595 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 formación de los cristales de formazán.

##### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984), 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.

##### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION 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  $6.22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde 1 U =  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H oxidado/min).

##### DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHÍDO (TBARS)

Como indicador de estrés oxidativo se determinó la concentración de malondialdehído (MDA). Para su medición se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de saliva y se utilizó el método de Buege y Aust (1978). Un volumen de la preparación de membranas (0,1-2 mg de proteínas/mL), se trató con 6 volúmenes de ácido fosfórico 1% P/V en HCl 0,1N y con dos volúmenes de ácido tiobarbitúrico (0,6%P/V en HCl 0,1 N), se mezcló y se incubó en agua hirviendo por 45 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se procedió a realizar una extracción con n-butanol. En la fase alcohólica se encuentra el complejo coloreado que se lee a 535 nm. En paralelo se preparó un blanco de reactivos y una curva estándar de MDA (0-500  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresaron como micromoles de malondialdehído presente en la muestra por mg de proteínas.

##### PAPEL DE LA NAD(P)H OXIDASA Y LAS ERO

Para la evaluación del efecto de la administración de apocinina y tempol sobre las enzimas antioxidantes se dividieron las ratas en 6 grupos: el grupo I recibió inyecciones de solución salina interdiarias, el grupo II recibió inyecciones interdiarias de LPS, el grupo III recibió una dosis diaria de 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$  de apocinina (APO) por vía intraperitoneal, el grupo IV recibió una dosis interdiaria de LPS y una dosis diaria de APO, el grupo V recibió tempol (20 mg/kg/día) por vía intraperitoneal y el grupo VI recibió el tratamiento combinado de LPS+tempol, en un período total de 7 días de tratamiento. Las determinaciones de las enzimas se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos.

##### DETERMINACIÓN DE LAS PROTEINAS TISULARES

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951) utilizando

albúmina sérica de bovino como patrón. Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10-20 µg de proteínas/10 µl.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (X ± EEM) y fueron graficados y analizados mediante el uso del programa GraphPad Prism 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.

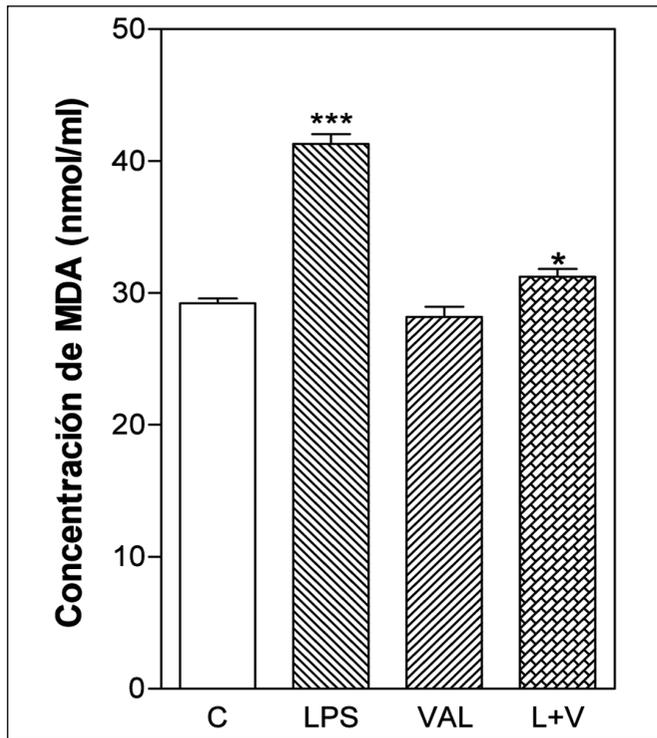


Figura 1. Concentración de malondialdehído. Cada barra representa la media ± E.E.M. \*\*\*p<0,001 respecto al grupo control; \*p<0,05 respecto al grupo VAL. C: N=8, LPS: N=6, VAL: N=8, L+V: N=4.

Resultados

CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO COMO EXPRESIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se determinó la concentración del MDA como indicador de estrés oxidativo. Como se observa la inyección de LPS en la encía de la rata produce un aumento significativo del MDA en el grupo tratado con LPS cuando se comparó con el grupo control, y este efecto fue completamente prevenido por el pre-tratamiento con VAL (Figura 1).

EFFECTO DEL VALSARTÁN SOBRE EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES INDUCIDA POR INYECCIONES LOCALES DE LPS EN RATAS CON PERIODONTITIS EXPERIMENTAL

Al evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y la GPx se observó un incremento significativo en el grupo de las ratas con periodontitis inducida con el tratamiento con LPS comparada con el grupo control. En todos los casos este efecto fue prevenido mediante el tratamiento con el antagonista del receptor AT<sub>1</sub> (VAL) (Figura 2).

EFFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON APOCININA SOBRE EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN RATAS CON PERIODONTITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR INYECCIONES DE LPS

Como se observa en la Figura 3, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx se encuentran significativamente aumentadas en las ratas con periodontitis inducida por inyecciones de LPS, comparados con el grupo control. El pre-tratamiento crónico con apocinina previno completamente el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes ocurrido en las ratas con periodontitis inducida por inyecciones de LPS.

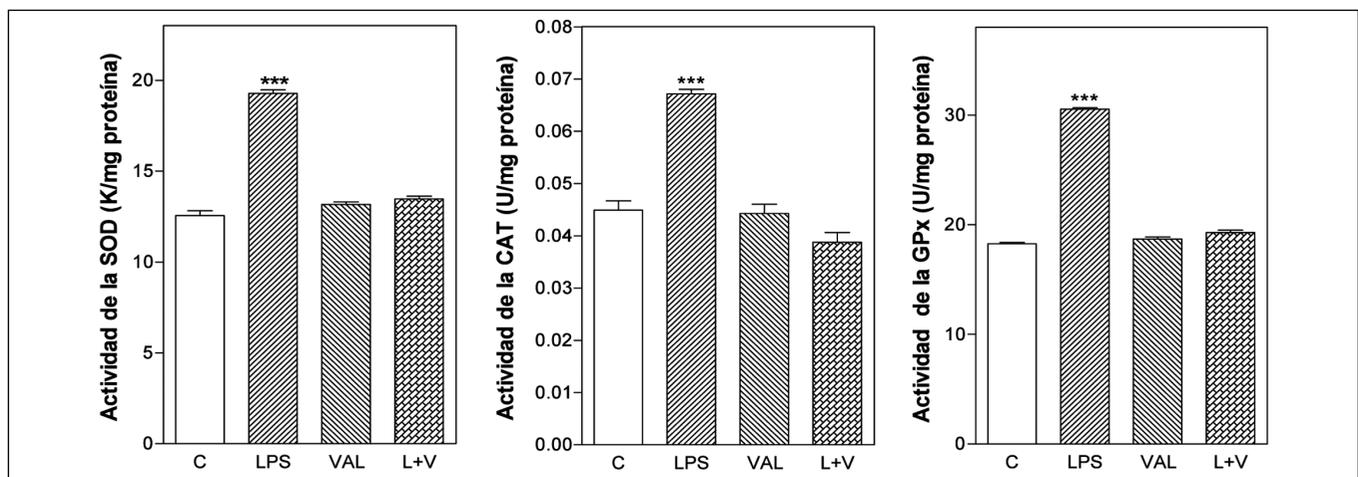
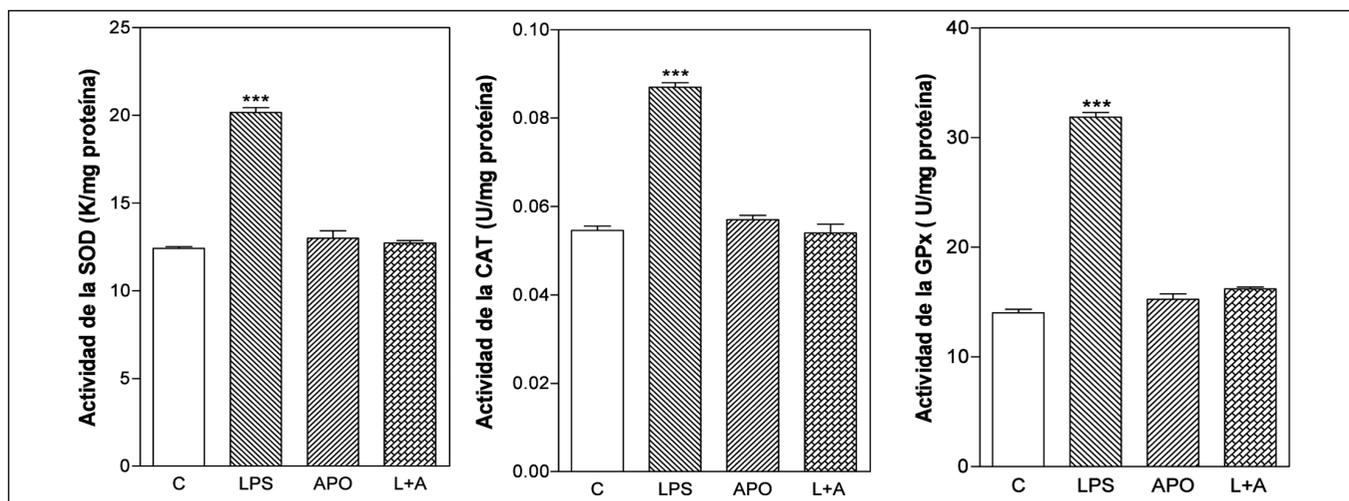


Figura 1. Concentración de malondialdehído. Cada barra representa la media ± E.E.M. \*\*\*p<0,001 respecto al grupo control; \*p<0,05 respecto al grupo VAL. C: N=8, LPS: N=6, VAL: N=8, L+V: N=4.



**Figura 3.** Efecto de la administración de apocinina sobre el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control. C: N= 5, LPS: N= 5, APO: N=4, L+A: N=6.

EFFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON TEMPOL, UN MIMÉTICO DE LA SOD SOBRE EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN RATAS CON PERIODONTITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR INYECCIONES DE LPS

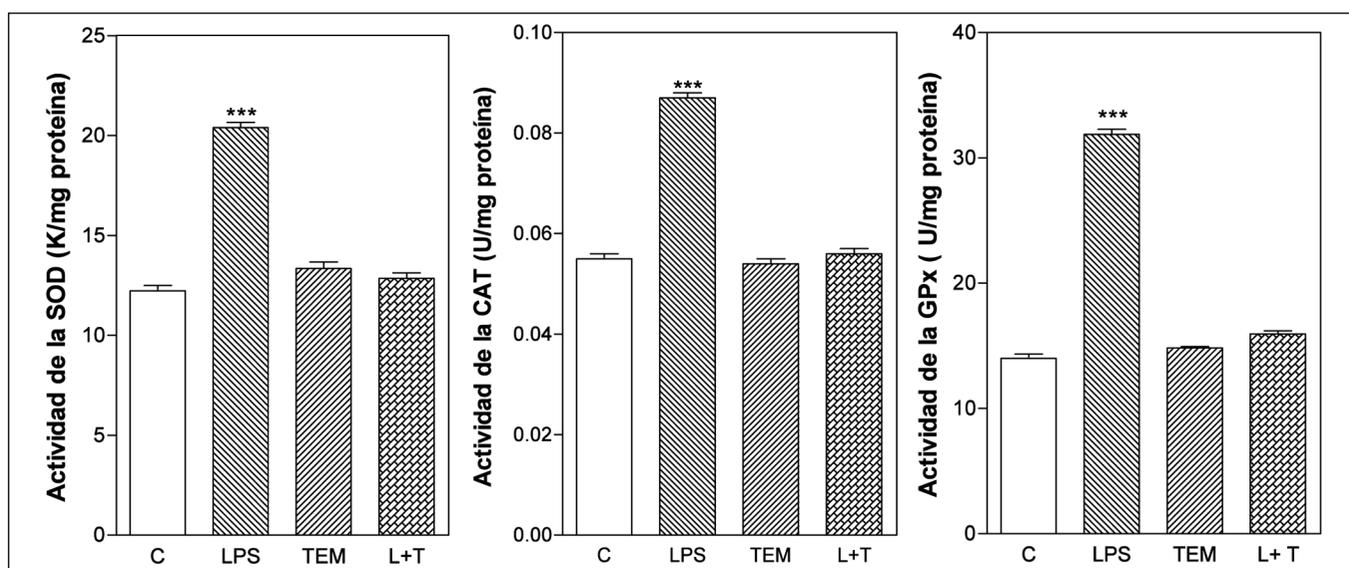
La figura 4 muestra como el pre-tratamiento crónico con tempol, previno el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la inyección de LPS en la encía de la rata.

### Discusión

La enfermedad periodontitis es una enfermedad inflamatoria oral, que da lugar a daño y pérdida de tejido, como resultado de la compleja interacción entre las bacterias patogénicas y la respuesta inmune del huésped. El descubrimiento de la superóxido

dismutasa por McCord y Fridovich en 1969 y que los radicales libres pueden ser sustrato para una enzima, revolucionó completamente el pensamiento sobre el papel de los radicales libres en la biología. Adicionalmente, la idea de que las ERO puedan actuar como moléculas de señalización, hacen que la biología «redox» sea vista hoy en día como un determinante fundamental en la biología básica de células y tejidos (Buettner, 2011). Debido a las propiedades altamente reactivas de las ERO, un exceso de las mismas puede ocasionar efectos tóxicos por daño oxidativo a macromoléculas tales como proteínas, lípidos, ADN y ARN.

Como resultado de la interacción de las ERO con ácidos grasos polinsaturados en membranas celulares o lipoproteínas, ocurre el proceso incontrolado de peroxidación lipídica, siendo el MDA un indicador



**Figura 4.** Efecto de la administración del tempol (20 mg/kg/día) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control. C: N=6, LPS: N=5, TEM: N=5, L+T: N: 6.

directo del grado de estrés oxidativo y por esta razón, de daño celular, ya que es originado en la etapa final de la peroxidación de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares por acción de los radicales libres de oxígeno. Por tal motivo, su determinación constituye una herramienta muy importante en el estudio del balance oxidación/antioxidación (Matés y col., 1999).

Datos recientes han demostrado un incremento en los niveles de peroxidación lipídica y de estrés oxidativo en la periodontitis, con incrementos en los valores de MDA. En efecto, los resultados aquí presentados muestran que en el modelo experimental de periodontitis inducida por la inyección de LPS en rata, se observa, un aumento de la concentración de los valores salivares de MDA como indicador de peroxidación lipídica.

Así, Akalin y col. (2007) reportan un incremento en el estado oxidativo total junto con un incremento significativo en los niveles de MDA en la saliva y el FGC en pacientes con periodontitis crónica cuando son comparados con el grupo control sano, estos resultados demuestran un incremento de la peroxidación lipídica en el ambiente oral/bolsa periodontal. De modo similar, Khalili y Biloklytska (2008), revelan una correlación entre los niveles incrementados de MDA y diferentes grados de severidad en pacientes con periodontitis crónica generalizada en relación a controles sanos.

Todas las células expresan enzimas detoxificantes capaces de neutralizar a las ERO, como la SOD, la CAT y la GPx. El nivel de las enzimas antioxidantes es sensible al estrés oxidativo y se ha reportado su aumento o disminución en diferentes patologías en las cuales un incremento de las ERO es causa o consecuencia de la enfermedad (Chapple y col., 2007).

Nuestros resultados apuntan a esta posibilidad de un incremento compensatorio de la actividad antioxidante, ya que en nuestro modelo experimental de periodontitis, se observa, sin lugar a dudas, un incremento significativo de la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx).

La evidencia indica una fuerte secuencia de eventos que podrán conectar a las ERO con la destrucción del tejido conectivo durante la EP. En efecto, se ha demostrado que los pacientes con periodontitis comparados con los sujetos sanos presentan incrementos significativos de la actividad de la SOD y la CAT en el plasma (60-65%), eritrocitos (110-125%) y los tejidos gingivales (40-60%), acompañados de un aumento moderado de la actividad de la glutatión peroxidasa en el plasma (21%), los eritrocitos (30%) y los tejidos gingivales (41%). Del mismo modo, Wei y col.

(2010), reportan un incremento en el estado oxidativo total y en los valores de SOD en suero, saliva y FGC de pacientes con periodontitis crónica y niveles incrementados de MDA solo en FGC, que retornaron a niveles basales con terapia (Panjamurthy y col., 2005).

En relación a la GPx, se ha demostrado claramente un aumento de la actividad en las muestras gingivales provenientes de perros y humanos con periodontitis (Panjamurthy y col., 2005), sugiriéndose que este aumento de actividad de la GPx podría representar una posible compensación antioxidante en las reacciones de desintoxicación de peróxidos orgánicos que se producen durante el estrés oxidativo en el tejido gingival (Borges y col., 2007).

Adicionalmente a la cadena transportadora de electrones, el anión superóxido puede ser producido por la familia de enzimas Nox, así como por la xantina oxidasa. Hattori y col., (2010) identificaron en neutrófilos humanos que las ERO producidas por la NAD(P)H oxidasa constituían reguladores clave en la migración de los mismos, ya que la disrupción de la actividad de esta enzima conducía a defectos en la quimiotaxis. El sistema de la NAD(P)H oxidasa es necesario para la inmunocompetencia contra las bacterias, vía el llamado «estallido» respiratorio u oxidativo que genera las ERO que son tóxicas para las bacterias y su activación ha sido observada bajo diferentes estímulos tales como LPS, insulina y ANG II (Battino y col., 1999).

En efecto, se ha demostrado ampliamente el papel de la ANG II en la inducción de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en diferentes tejidos. La ANG II induce estrés oxidativo vía la activación de la NAD(P)H oxidasa. Así Didion y col., (2005), demostraron que la deficiencia de SOD I está asociada con un incremento en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , y que el incremento en la expresión de esta enzima, reduce marcadamente los niveles vasculares de  $O_2^{\cdot-}$  inducidos por la ANG II.

Recientemente se ha demostrado un efecto de la ANG II en células circulantes, demostrándose la presencia de receptores  $AT_1$  en neutrófilos circulantes (Ito y col., 2001) y monocitos periféricos (Shimada y Yakazi, 1978). En este contexto, la migración de los leucocitos a los sitios de inflamación son eventos primarios que ocurren en los procesos inflamatorios. Así, El Bekay y col., (2003), demuestran en neutrófilos humanos un incremento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por la acción de la ANG II, un efecto específico ya que dicha respuesta fue inhibida completamente por el tratamiento con el ibersartán, un bloqueante de los receptores  $AT_1$  de la ANG II.

En el tejido periodontal, también la ANG II es capaz de ejercer efectos inmunoregulatorios. En efec-

to, Santos y col. (2009) demostraron que el sistema SRA gingival es capaz de generar los péptidos de angiotensina. Adicionalmente, mediante marcaje inmunohistoquímico se demostró que células fibroblásticas eran positivas para el receptor AT<sub>1</sub> (Nakamura y col., 2011).

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 hallazgos demuestran por primera vez en la literatura que el tratamiento con el bloqueante de los receptores AT<sub>1</sub>, el valsartán, previene de modo significativo la progresión de la enfermedad periodontal en etapas tempranas de la patología ya que fue capaz de revertir el aumento de la actividad enzimática de la SOD, la CAT, la GPx y la concentración de MDA en tejido gingival de rata, lo que indica una relación entre los marcadores de estrés oxidativo y la EP. El hecho que estos efectos hayan sido revertidos por el tratamiento con VAL, sugiere un papel de la ANGII/ receptor AT<sub>1</sub> en la patogénesis de la EP inducida con LPS en ratas.

La participación de NAD(P)H oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno queda inequívocamente demostrada con nuestros hallazgos en los que se demuestra, por primera vez, que el pretratamiento con la apocinina un inhibidor del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa, fue capaz de revertir el incremento de la actividad de la SOD, CAT y GPx inducidos por la administración 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 angiotensina II, el receptor AT<sub>1</sub>, la NAD(P)H oxidasa y el anión superóxido. Efectivamente, se infiere que en la enfermedad periodontal inducida con inyecciones con LPS las especies reactivas de oxígeno participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el receptor AT<sub>1</sub> y su acople a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa.

En conclusión, la prevención en la activación de las enzimas antioxidantes y en los niveles de peroxidación lipídica observados en nuestros resultados, indican que el valsartán puede contribuir a una importante reducción del estrés oxidativo observado durante la enfermedad periodontal y proporcionan evidencia convincente que sugiere que los bloqueantes del receptor AT<sub>1</sub> de la ANG II pueden ejercer efectos terapéuticos en la progresión de los procesos inflamatorios que subyacen a la progresión de la periodontitis.

## 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 PG-007349-2001 etapas 1 y 2.

## Referencias bibliográficas

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- Akalin F, Baltacıoğlu E, Alver A, Karabulut E. 2007. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 34:558-565.
- Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H, Newman T. 1999. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:458-476.
- Borges I, Machado M, Wilhem D, Bittencourt T, Barreto M, Frode T. 2007. Clinical study. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediat Inflamm* 45794.
- 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.
- Buege J, Aust S. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310
- Buettner G. 2011. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-cancer Agents Med Chem* 1;11(4):341-346.
- Chapple I, Milward M, Dietrich T. 2007. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr* 137: 657- 664.
- Cheng Z, Vapaatalo H, Mervaala E. 2005. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11(6):RA 194-205.
- Didion S, Kinzenbaw D, Faraci F. 2005. Critical role for CuZn-superoxide dismutase in preventing angiotensin II-induced endothelial dysfunction. *Hypertension* 46: 1147-1153.
- El Bekay R, Álvarez M, Monteseirín J, Alba G, Chacón P, Vega A, Martín-Nieto J, Jiménez J, Pintado E, Bedoya F, Sobrino F. 2003. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood* 102(2):662-671.
- Flohé L, Günzler W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114-121.
- Giannopoulou C, Krause K, Muller F. 2008. The NADPH oxidase NOX2 plays a role in periodontal pathologies. *Semin Immunopathol* 30:273- 278.

- Grant M, Brock G, Matthews J, Chapple I. 2010. Crevicular fluid glutathione levels in periodontitis and the effect of non-surgical therapy. *J Clin Periodontol* 37(1):17-23.
- Griendling K. 2006. NADPH Oxidase: New Regulators of Old functions. *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1443-1445.
- Gustafsson A, Asman B. 1996. Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta- receptor stimulation. *J Clin Periodontol* 23:38-44.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1990. Role of the free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85.
- Hattori H, Subramanian K, Sakai J, Luo H. 2010. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Commun Integr Biol* 3(3):278-281.
- Ito H, Takemori K, Suzuki T. 2001. Role of angiotensin II type I receptor in the leukocytes and endothelial cells of brain microvessels in the pathogenesis of hypertensive cerebral injury. *J Hypertens* 19:591-597.
- Key L, Wolf W, Gundberg C, Ries W. 1994. Superoxide and bone resorption. *Bone* 15(4):431-436.
- Khalili J, Biloklytsa H. 2008. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Dis* 14(8):754-760.
- Lowry H, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Matés J, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.
- McCord J, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.
- Metha P, Griendling K. 2006. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 292:C82-C97.
- Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. 2011. Involvement of angiotensin II type I receptors in interleukin-1 -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 119(5):345-351.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
- Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran C. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Letters* 10: 255- 264.
- Phillips M, Kagiya S. 2002. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Current Opin Investig Drugs* 4: 569-577.
- Price A, Lockhart J, Ferrell W, Gsell W, McLean S, Strurrock R. 2007. Angiotensin II type I receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 56:441-447.
- 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.
- Santos C, Akashi A, 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 Periodont* 80:130-139.
- Shapira L, Borinski R, Sela M, Soskolne A. 1991. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 18:44-48.
- Shimada K, Yakazi Y. 1978. Binding sites for angiotensin II in human mononuclear leucocytes. *J Biochem* 84: 1013-1015.
- Wei D, Zhang X, Wang Y, Yang C, Chen G. 2010. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J* 55(1):70-78.
- Weiss D, Sorescu D, Taylor W. 2001. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 87:25C-32C.