

La diabetes mellitus experimental y las alteraciones de los tejidos blandos en Periodoncia: efectos de la insulina y de un antagonista del receptor de cininas

The experimental diabetes mellitus in the diabetic gingival-periodontopathia: effects of insulin and a kinin receptor antagonist

Resumen

La gingivopatía diabética ha sido reconocida no como una enfermedad infecciosa local, sino como una enfermedad crónica inflamatoria para los tejidos gingivales. La diabetes parece contribuir a la mayor presencia de bacterias en la encía; sin embargo, es totalmente discutible que existen cambios cualitativos o cuantitativos entre la flora periodontopática diabética y la no diabética. La enfermedad gingivo-periodontal es una afección que tiene como respuesta un cuadro crónico inflamatorio. La disminución de insulina a consecuencia de alteraciones metabólicas induce hiperglucemia progresiva, lo que determina importantes factores de riesgo para las complicaciones orgánicas. Este trabajo muestra los efectos de dos factores críticos en la gingivopatía diabética: el efecto prolongado de hiperglucemia diabética y el estado inflamatorio y los componentes que determinan la destrucción del tejido gingival. El tratamiento experimental de acuerdo con los resultados obtenidos muestra que no sólo el control de la hiperglucemia diabética por insulina es importante, sino también el ataque a los factores inflamatorios por drogas específicas.

PALABRAS CLAVE: periodoncia, diabetes, insulina, calicreína, colágeno.

Summary

Diabetic gingivo-periodontal disease has been recognized not merely as a local infectious disease, but as a chronic, inflammatory disease for the host. Diabetes seems to contribute to greater presence of bacteria on gingival tissues; however the qualitative and quantitative differences between periodontopathic flora in diabetic and normal subjects is still under discussion. The response to periodontal disease corresponds to a chronic inflammatory situation. The decrease of insulin as a consequence of metabolic alterations induces a progressive hyperglycemia, important risk factors for diabetic organic complications. This paper shows the effect of two important critical factors in diabetic gingival disease: the long-term effect of diabetic hyperglycemia and the inflammatory state and the components that lead to tissue destruction. According to our results the experimental treatment shows that not only the control of the diabetic hyperglycemia by insulin is important; the attack of the inflammatory components by specific drugs is also critical.

KEY WORDS: periodoncia, diabetes, insulin, kallikrein, collagen.

Introducción

Dentro de las complicaciones diabéticas, la enfermedad gingivo-periodontal es una de las más importantes, ya que el estado hiperglucémico de la diabetes determina modificaciones estructurales en la encía. La diabetes es una enfermedad metabólica con modificaciones en la producción de insulina que conducen a un anormal metabolismo de lípidos, azúcares y proteínas. Como la enfermedad coronaria, la enfermedad gingivo-periodontal, está también potenciada por el estado diabético, lo cual precipita un severo y rápido progreso de la patología (Taylor, 2001). La enfermedad gingivo-periodontal, cuando no existe un factor sistémico como la diabetes, es un estado inflamatorio-infeccioso con predominio de organismos gram-negativos en la placa de biofilm que afecta a un porcentaje de la población que varía entre el 7

y el 15% (Taylor et al., 1998). No obstante que las bacterias deben estar presentes en la inflamación gingival, también la presencia de un huésped susceptible debe estar presente en la enfermedad.

La respuesta inmune que se desarrolla en la encía y en los tejidos periodontales en respuesta a la presencia crónica de la placa bacteriana resulta en la destrucción de los componentes estructurales gingivo-periodontales, conduciendo a los síntomas clínicos de la enfermedad (Papapanou, 1999). La respuesta del huésped está determinada primariamente por factores genéticos, del medio ambiente o adquiridos.

Una respuesta inflamatoria anormal, como la inflamación gingival por una aumentada susceptibilidad a infecciones y agravada por el estado diabético, determina complicaciones en otros órganos, como por ejemplo la enfermedad cardio-

CATANZARO,
ORLANDO L.^{*1,2}

CALVO LAURIA,
LORENA^{**1,2}

DZIUBECKI,
DAMIÁN^{***1,2}

RODRÍGUEZ,
RICARDO R.^{****1}

**Titular de Fisiología y Neurofisiología, Universidad del Salvador, Argentina.*

***Profesora de Fisiología y Neurofisiología, Universidad del Salvador, Argentina.*

****Docente Neurofisiología, Universidad del Salvador, Argentina.*

*****Doctor en Medicina, Titular de Fisiología Humana, Universidad del Salvador, Argentina.*

¹Cátedra de Neurofisiología, Universidad del Salvador, Argentina.

²Departamento de Investigaciones, UAJFK; Escuela de Bioquímica, UAJFK.

*Fecha de recepción:
julio 2008*

*Fecha de aceptación y versión final:
octubre 2008*

CUADRO I. DETERMINACIÓN DE GLUCEMIA EN DIFERENTES GRUPOS DE RATAS CONTROLES Y DIABÉTICAS (N = 10)* P < 0,05.		
	Glucemia (mmo/l)	
	20 días	30 días
Controles	5,8 +/- 0,9	6,5 +/- 0,8
Diabéticas	18,5 +/- 1,2	22,1 +/- 1,4
Diab + Ins	5,6 +/- 0,6	5,9 +/- 0,7*
Diab + Ant	16,3 +/- 1	21 +/- 0,9

vascular. La hiperglucemia diabética de largo tiempo determina complicaciones irreversibles de las proteínas y lípidos estructurales que forman la matriz extracelular y el tejido conectivo, así como de las paredes vasculares (Thorstensson y Hugoson, 1993). Estos cambios estructurales resultan en modificaciones de la función capilar, pobre perfusión de tejidos y órganos y liberación de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo), disparando un proceso inflamatorio sistémico, como por ejemplo se observa en la pulpa dentaria en la diabetes (Catanzaro et al., 2006). La activación de la inflamación a nivel sistémico resulta en la elevación crónica de mediadores inflamatorios y una fase aguda de componentes tales como la proteína C reactiva y el fibrinógeno elevado, todos marcadores de la fase de reacción aguda observada en la diabetes, la enfermedad coronaria y la enfermedad gingivo-periodontal (Slade et al., 2000). En el presente trabajo analizamos las modificaciones producidas en el tejido gingival por el estado diabético y los efectos de insulina y un antagonista del receptor BK1 a las cininas.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratas machos Wistar de 200-220 g de peso (8 a 10 por grupo). Los animales fueron

divididos en grupos: 1) controles; 2) diabéticos por Streptozotocin (65 mg/kg); 3) diabéticos inyectados con insulina (2U/día) durante 15 días desde el 15º día de STZ; 4) diabéticos inyectados con des-Arg⁹-[Leu⁸] BK (200 ug/Kg), antagonista de cininas, durante 15 días desde el 15º día de STZ. Los animales fueron sacrificados a los 30 días. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, USAL.

Determinaciones bioquímicas

Las glucemias fueron determinadas a las 76 horas después de la 1ª dosis de STZ y a los 20-30 días por medio de un lector automático de glucemia (Ascencia entrust). Muestras de dientes incisales y molares fueron extraídas a los 30 días. Homogeneizadas en buffer Tris pH 8,2 y centrifugadas. Se realizaron las siguientes determinaciones: caliceínas tisulares (Vila et al., 1992), colágeno (Walsh et al., 1992) y proteína tisular (Lowry et al., 1951).

Mediciones gingivales

Antes de sacrificar a los animales se tomaron mediciones en lugares seleccionados de la encía: vestibular (V) (vértice de papila gingival-surco, distal derecho y distal izquierdo (DD/DI) (reborde de encía). Las mediciones se realizaron con un calibre con readout automático, y los resultados se expresaron en milímetros y por porcentaje respecto de las mediciones en milímetros de los controles.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como la media +/- ES mediante el test de Student y analizados usando ANOVA para múltiples comparaciones. Valores de P < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Los resultados obtenidos han sido los siguientes: en el Cuadro I se observa la glucemia de los animales controles, los diabéticos y los diabéticos inyectados con insulina o con el antagonista BK1 a los 30 días. Los animales controles observaron glucemia entre 6,5-5,8 +/- 0,9 mmol/l durante todo el experimento. Los animales diabéticos mostraron glucemia de 18,5 +/- 1,2 a 22,4 +/- 1,4 mmol/l, en tanto que los animales diabéticos inyectados con insulina mostraron glucemia similar a los controles (5,6 +/- 0,9), los animales diabéticos tratados con el antagonista BK1 no mostraron diferencias respecto de los diabéticos (20,3 +/- 1,8). Animales controles inyectados con insulina o antagonista BK1 no mostraron diferencias (resultados no mostrados).

Actividad de caliceína tisular (ACT)

En la Figura 1 se observan los resultados de la actividad de caliceína tisular. La ACT en contro-

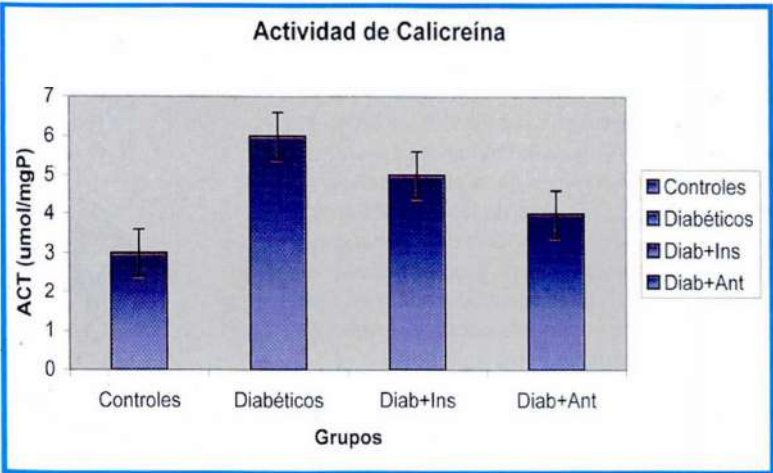


Fig. 1. Caliceína gingival.

les fue de $3,1 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/mgP}$. Los animales diabéticos mostraron un aumento significativo de la ACT ($6,8 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/mgP}$) respecto de controles ($P < 0,05$), en tanto que los animales diabéticos tratados con insulina mostraron disminución aunque no significativa respecto de los diabéticos ($5 \pm 1,2$). En los animales diabéticos inyectados con el antagonista BK1 se produjo una significativa disminución de ACT ($4 \pm 0,6$) ($P < 0,05$).

Determinación de colágeno

La Figura 2 muestra los resultados de la concentración de colágeno tisular. Los animales diabéticos mostraron una significativa disminución del colágeno ($0,9 \pm 0,02$ $\mu\text{g prolina/mgT}$) respecto del control ($4 \pm 0,5$) ($P < 0,001$), en tanto que los animales diabéticos tratados con insulina mostraron aumento no significativo respecto de los controles ($2,2 \pm 0,7$). Los diabéticos más antagonista BK1 observaron también aumento significativo alcanzando los valores normales de controles ($3,8 \pm 0,6$) ($P < 0,05$).

Mediciones gingivales

La Figura 3 muestra los valores porcentuales de las mediciones gingivales en puntos referidos a: las lecturas en milímetros: controles: V = $3 \pm 0,5$ mm, DD y DI = $3,2 \pm 0,6$ y $3,5 \pm 0,4$ mm; diabéticos: V = $6,2 \pm 0,9$ mm; DD y DI = $4,8 \pm 1,1$ y $4,7 \pm 0,8$ mm; diabéticos más insulina: V = $3,8 \pm 0,9$; DD y DI = $4,1 \pm 1,2$ y $4,4 \pm 0,7$; diabéticos más antagonista BK1: V = $3 \pm 0,7$; DD y DI = $3,7 \pm 0,9$ y $3,6 \pm 0,8$. Los valores porcentuales respecto a los controles fueron los siguientes: diab. vs controles: V = 100%, DD = 37%, DI = 38% de aumento (Fig. 3A); diab + ins vs controles: V = 26%, DD = 23%, DI = 29% (Fig. 3B); diab + ant vs controles: V = 3%, DD = 5%, DI = 5% (Fig. 3C).

Discusión

La enfermedad gingival inflamatoria severa a menudo coexiste con una crónica diabetes mellitus. Las infecciones de origen gingivo-periodontal en la mayoría de los casos son crónicas y no solamente afectan los tejidos que rodean al diente (Haffaje y Socronsky, 1994; Darveau et al., 1997), sino que también constituyen un desafío para las células inmunocompetentes y las células que activan la cascada inflamatoria (Dennison y Van Dyke, 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existirían dos factores críticos en la complicación gingivo-periodontal de la diabetes mellitus. El primero estaría constituido por la prolongada exposición de los tejidos blandos a la hiperglucemia diabética como factor primario responsable, que no sólo afecta el complejo gingivo-periodontal sino también produce

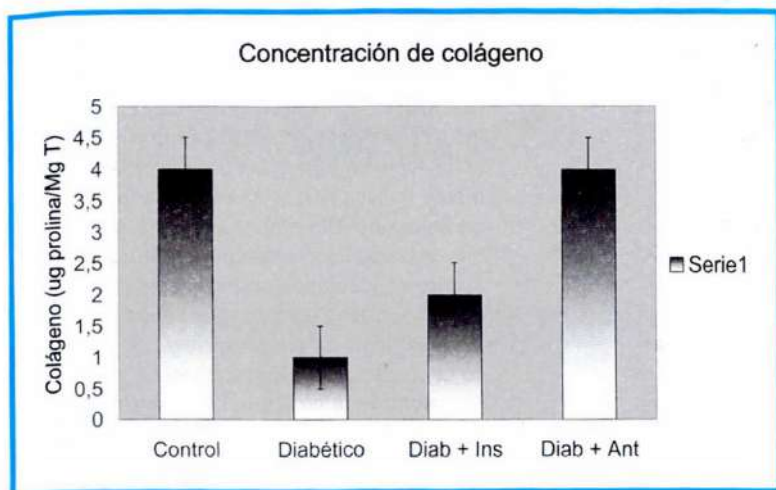


Fig. 2. Concentración de colágeno tisular. En diferentes grupos de ratas controles y diabéticas. Medias $\pm$ ES ($n = 10$) $P < 0,05$.

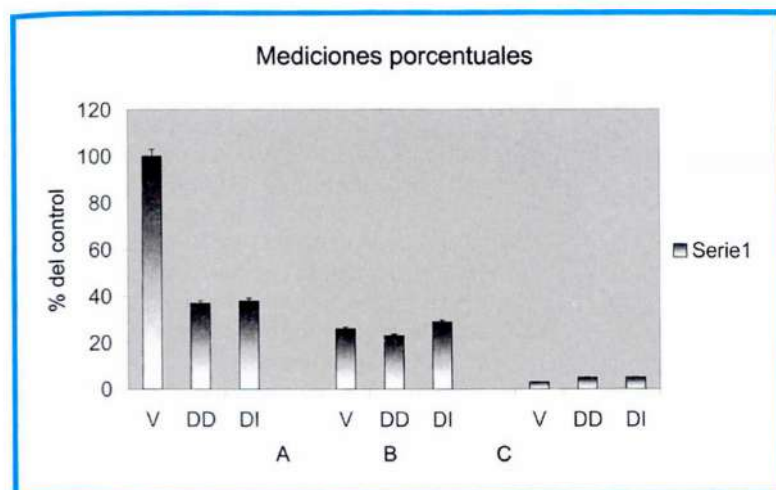


Fig. 3. Mediciones gingivales en porcentaje del control. A = diabéticos vs controles; B = diabéticos vs diab + insulina; C = diabéticos vs diab + ant. BK1, Medias $\pm$ ES. ($n = 10$). $P < 0,05$.

otras complicaciones, como retinopatía, nefropatía y neuropatía y estado inflamatorio gingival (The Diabetic Control, 1993; Clark y Lee, 1995). La formación de bases bioquímicas modificadas por la hiperglucemia produce un medio osmótico y media la formación de los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs), una macromolécula de larga vida e irreversible, que forma compuestos derivados de glucosa, continua y lentamente dependiente del tiempo de diabetes y la concentración de glucosa (Browlee y Cerami, 1981).

Los AGEs se acumulan en el plasma y en los tejidos, como por ejemplo en la encía de los diabéticos (De Groote, 2004). Estos productos de glucosilación son también responsables de las alteraciones del colágeno gingival, produciendo modificaciones en la microangiopatía, como dis-

minución de la luz vascular y aterosclerosis. Los resultados observados por nosotros muestran que la síntesis de colágeno se halla disminuida en los animales diabéticos y por efecto de insulina se recupera, lo que podría sugerir que al disminuir la hiperglucemia diabética y no formarse nuevos AGEs, se recuperaría la síntesis de colágeno. Sin embargo habría que aclarar que la producción crónica de AGEs es tardía y sus complicaciones son irreversibles, y no es precisamente este modelo diabético experimental de 30 días. En cuanto al segundo factor crítico la gingivopatía diabética sería el proceso inflamatorio temprano que se desarrolla durante la enfermedad diabética. Por otra parte, se ha demostrado que pacientes jóvenes con diabetes tipo 1 desarrollan una intensa y temprana respuesta inflamatoria comparada con controles (Salvi et al., 1997).

La destrucción del tejido conectivo que tiene lugar en la enfermedad gingivo-periodontal diabética resulta de la interacción de bacterias y sus productos en un medio apto con glucosa disponible. Las células fagocíticas mononucleares y los fibroblastos disparan la activación y secreción local de mediadores catabólicos inflamatorios, que incluyen IL-1 PGE, TNF- y BK.

Estos péptidos también actúan en forma local en un medio con exceso de glucosa; sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados el estado inflamatorio gingivo-periodontal estaría específicamente relacionado con la producción de péptidos inflamatorios.

Es interesante observar que el tratamiento con el antagonista BK1, si bien no reduce la hiperglucemia diabética, disminuye significativamente el agrandamiento gingival diabético y controla significativamente la actividad de calicreína tisular, enzima que actuando sobre el cininógeno produce bradicinina, así como la síntesis de colágeno. Este efecto sugeriría que la diabetes expresa un tipo de receptores inflamatorios específicos (BK1) en el tejido gingival, que son bloqueados por el antagonista BK1. Como conclusión podemos afirmar que el estado diabético produce complicaciones gingivo-periodontales, que están reguladas por dos factores críticos: 1) la hiperglucemia diabética y 2) los péptidos inflamatorios. La disminución de la hiperglucemia por sí sola no es capaz de reducir el agrandamiento gingival, en tanto que el efecto del antagonista BK1, si bien no disminuyó la hiperglucemia diabética, controló significativamente las modificaciones gingivales al bloquear la cascada de péptidos inflamatorios (citoquinas, cininas) y contribuyó a la regeneración tisular.

Estos resultados sugieren un importante avance en las complicaciones gingivo-periodontales de la diabetes mellitus.

Bibliografía

1. Taylor GW. *Bidirectional interrelationship between diabetes and periodontal disease: an epidemiologic perspective*. Ann Periodontol. 2001;6:99-112.
2. Taylor GW et al. *Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes*. Ann Periodontol. 1998;3:30-9.
3. Papapanou PN. *Epidemiology of periodontal disease: an update*. J Int Acad Periodontol. 1999;1:110-6.
4. Thorstensson H, Hugoson A. *Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics*. J Clin Periodontol. 1993;16:215-23.
5. Catanzaro OL et al. *Diabetes and its effects on dental pulp*. J Oral Sci. 2006;48:195-9.
6. Slade GD et al. *Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population*. J Dent Res. 2000;79:49-57.
7. Vila SB et al. *The kallikrein-kinin system in early state of diabetes*. Agents and Actions Suppl. 1992;38:304-10.
8. Walsh BJ et al. *Microplate reader-based quantitation of collagen*. Anal Biochem. 1992;203:187-90.
9. Lowry OH et al. *Protein measurement with folin phenol reagent*. J Biol Chem. 1951;193:265-75.
10. Haffajee A, Socransky SS. *The etiologic agent of destructive periodontal disease*. Periodontol 2000. 1994;5:78-111.
11. Darveau RP, Tanner A, Page R. *The microbial challenge in periodontitis*. Periodontol 2000. 1997;14:12-32.
12. Dennison DK, Van Dyke TE. *The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease*. Periodontol 2000. 1997;14:54-78.
13. *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med. 1993;329:977-86.
14. Clark CM, Lee DA. *Prevention and treatment of the complications of diabetes*. N Engl J Med. 1995;332:1210-7.
15. Browlee M, Cerami A. *The biochemistry of the complication of diabetes mellitus*. Ann Rev Biochem. 1981;43:836-41.
16. De Groote J. *The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure*. Curr Opin Pharmacol. 2004;4:301-5.
17. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith F W, Arnold RR, Offenbacher S. *Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal disease in insulin dependent diabetes mellitus patients*. J Periodontol. 1997;68:127-35.

Este trabajo fue subsidiado por la Asociación Odontológica Argentina y la UAJFK.

Se agradece la colaboración en la metodología y estadística de la Lic. Irene Di Martino.

Dirección del autor

Escuela de Medicina USAL - Lab. de Diabetes
Tucumán 1845 - 9º P
(C1050AAK) Ciudad Autónoma de Buenos Aires
e-mail: ocatan50@aol.com