



“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPOXIA AMBIENTAL CRÓNICA SOBRE LOS TEJIDOS ORALES DE LA RATA”

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autora: Od. Antonela R. Terrizzi

Directora: Dra. María del Pilar Martínez

Co-director: Dr. Javier Fernández Solari

Cátedra de Fisiología
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires

2018

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero dar gracias a Dios. Por permitirme transitar cada día de esta vida, los cuales no cambiaría por nada, y poner en mi camino a la gente maravillosa a la que agradeceré a continuación.

En segundo lugar quiero agradecer a Pilar Martínez, quien es mucho más que mi directora de Tesis. Se me hace difícil encontrar palabras para definirla, pero me sobran para expresar mi agradecimiento y gratitud, no sólo por formarme como científica, sino por acompañarme día a día de estos 8 años en los que estoy en la Cátedra de Fisiología. Gracias por ser más que una jefa y un referente, por permitirme ser libre en mi trabajo diario en el laboratorio, por aconsejarme en cuestiones laborales/personales/sentimentales, por ser como una mamá para mí. Gracias por apoyarme en mis decisiones, por enaltecer mis logros y ayudarme a destacarme, por siempre buscar mi éxito personal y profesional. Sos indudablemente una de las razones por las que aún permanezco en la Facultad de Odontología.

Infinitas gracias a Maria Inés Conti, que aunque figure por separado, ocupa el segundo puesto junto con Pilar. Por ser la mejor docente que la UBA tiene la fortuna de tener y mi modelo a seguir en la docencia. Por tu puesta de cabeza en todas las cuestiones relacionadas a la investigación, de fundamental importancia para nuestro éxito como grupo. Hubiera sido imposible para mí llegar hasta acá si no fuera por tu presencia que complementa el “trío galleta” que formamos junto a Pilar. Gracias por siempre ir para adelante, por aconsejarme, por ser como sos! Absolutamente irremplazable.

A Javier Fernández Solari, mi co-director de Tesis y Director en Conicet. Un investigador magnífico y una persona aún más excepcional. Nunca conocí a nadie con tanta pasión por la ciencia ni tanta disposición por ayudar siempre en las cuestiones científicas. Gracias por las siempre invaluable contribuciones a la hora de diseñar experiencias, escribir planes de tesis, papers y por los consejos científicos. Gracias porque, junto con Pilar, siempre me alentaste a ir por más y nunca dudaste de mí. La cátedra de Fisiología es afortunada de tenerte como docente e investigador, y yo lo soy aún más por tenerte como referente.

Gracias a toda la gente que forma la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires. Gracias al Dr. Juan Carlos Elverdin por brindarme un lugar de trabajo para desarrollar mi tesis. Gracias especiales a Graciela y Agustina (“las secres”) por asesorarme en las cuestiones burocráticas de las cuales no entiendo nada. A Elsie, Gra

Champin, Juli y "Lito" por su permanente ayuda con los animales y las cámaras. A Fer "Ching Ming" Lee por estar en todas las autopsias. Infinitas gracias a todos los que con su labor diaria facilitaron mi desarrollo personal y profesional.

A las Dras. Clarisa Bozzini y Rosi Alippi y al Dr. Carlos Bozzini. Por su siempre valiosa contribución a mi trabajo en hipoxia y hueso, de los cuales son expertos. Gracias también por las charlas de los almuerzos, por las anécdotas e historias compartidas, no todo es ciencia en la vida.

Agradezco a las cátedras de Anatomía Patológica, Bioquímica e Histología y Embriología de la FOUBA, especialmente a la Dra. Patricia Mandalunis y a Ricardo Orzuza por su ayuda y permanente asesoramiento en los distintos temas de este trabajo de tesis. La interdisciplina y la colaboración son, para mí, la única manera posible de hacer investigación de calidad.

Dejando de lado los agradecimientos académicos, quiero agradecer a mis padres. Por inculcarme siempre el valor del trabajo y la responsabilidad. Por hacer de mí la mujer independiente que soy hoy. No debe haber sido fácil tenerme a 800 km de casa desde los 18 años, pero siempre confiaron en mí. No todos tienen la suerte de tener unos padres como los míos. Por sacrificarse para que mi hermano y yo tengamos todo, con muchas horas de trabajo y pocas de sueño. Gracias por darme más de lo que merezco. Sé que papá estaría orgulloso de tener una hija doctora, aunque no fuera "de verdad".

Gracias a mis amigas de toda la vida, Emiliana, Eliana E., Eliana A., Manuela y Melisa. A pesar de la distancia siempre están cerca cuando las necesito, para darme una palabra de aliento y un consejo. Gracias por hacer más fácil mi vida lejos. Las admiro y extraño siempre.

También quiero darle las gracias a Deby y Jose, las mejores amigas que me dio la carrera. Fue difícil hacer algo que no me gustaba, pero Ud. hicieron el día a día más llevadero. Gracias por nunca dudar de mí y siempre alentarme a seguir.

A Belén Favarolo, mi amiga científica. Qué suerte que la vida te puso en mi camino! Gracias por tu buen humor constante, tus charlas y tus consejos científicos que tan bien me vienen.

A Santi, quien es mucho más que mi compañero de vida y el papá de mi hijo. Gracias por ser la persona que sos, por siempre hacerme reír, por tu inocencia, por tu locura (linda). Por amarme como soy y apoyarme en todas mis decisiones. Por hacer de nuestra vida un

hermoso y maravilloso viaje diario. No sé si los príncipes azules existen, pero si lo hacen, se deben parecer a vos.

A Alessio, mi “Lelé”, mi hijo maravilloso. Quien llegó acelerado a este mundo (¿a quién habrá salido?) y fue, desde la panza, compañero de muchos experimentos, idas y venidas a laboratorios e institutos y noches de redacción y armado de gráficos. Perdón hijo por robarte mucho tiempo en que debería haber estado con vos y necesité dedicarme a la ciencia. Espero ser un ejemplo para que en el futuro te dediques a lo que querés hacer con el corazón, y no con la cabeza o el bolsillo.

Por último y no menos importante, gracias a todas la ratas Wistar que posibilitaron el desarrollo de este trabajo de Tesis. Lo único que odio de la ciencia es el hecho de tener que sacrificar animales. Espero que su vida haya valido para mejorar la salud de las personas.

RESUMEN

La hipoxia hipobárica (HX) puede definirse como un descenso de la presión barométrica con la consecuente disminución de la presión parcial de oxígeno en la atmósfera. La exposición a HX constituye un estímulo estresante para el organismo, por lo tanto, este debe desarrollar respuestas que le permitan hacer frente a las exigencias del ambiente, las cuales difieren entre las poblaciones que habitan permanentemente en zonas de gran altitud (hipoxia crónica continua, HCC) y aquellos individuos que trabajan en HX y retornan a zonas de baja altitud para descansar (hipoxia crónica intermitente, HCI). A pesar del hecho de que las respuestas fisiológicas que se desencadenan frente a la HX han sido ampliamente discutidas, las repercusiones de los bajos niveles de oxígeno a nivel de los tejidos orales aún no están claras. La literatura cuenta con estudios que analizan los tejidos periodontales y las glándulas salivales tanto en animales como en humanos expuestos a HX, pero en todos ellos las condiciones de exposición no son en las que habitualmente se desarrolla la vida. Por esta razón, este trabajo de tesis se centra en la evaluación del estado periodontal y glandular en ratas expuestas a 4200 metros de altura simulada, siendo nuestra hipótesis que la exposición a dicha altura causa una merma en la función biológica de los tejidos orales. Dichos tejidos serían capaces de aclimatarse pero esta respuesta podría variar dependiendo de si la exposición a HX es continua o intermitente.

En nuestros modelos experimentales, se utilizaron ratas Wistar hembras (en crecimiento o adultas), las cuales se expusieron a HX durante 90 días con el fin de evaluar las propiedades biomecánicas mandibulares, la morfometría del hueso alveolar, la concentración de diversos biomarcadores del tejido gingival y de glándulas submaxilares (GSM), la histoarquitectura de GSM y la secreción salival. Además, hemos realizado experiencias en animales con inducción experimental de enfermedad periodontal (PE), con el fin de analizar el efecto de la HX en un hueso alveolar afectado por periodontitis.

Los resultados del presente trabajo indican que la HX afecta negativamente las propiedades biomecánicas mandibulares en ratas en crecimiento, hecho probablemente vinculado a la disminución de la masa ósea de los animales y a la incapacidad de la mandíbula de adaptar su geometría durante la exposición a HX. El hueso alveolar también sufrió alteraciones, observándose reabsorción cortical lingual e interradicular, sin evidencia de desarrollo de una respuesta inflamatoria a nivel periodontal. La mencionada pérdida ósea podría ser considerada como un intento de aclimatación para aumentar la masa roja circulante, proceso fundamentalmente a cargo de la médula ósea de los huesos largos. El incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible observado en el tejido gingival y en la GSM, da cuenta de la necesidad del organismo de aumentar el aporte de O₂ en

ambos sitios, lo que refuerza el concepto de intento de aclimatación a nivel periodontal y glandular.

En ratas adultas, la exposición a HX no indujo cambios biomecánicos mandibulares, probablemente debido a que estos animales ya han completado su formación ósea. Es evidente que la exposición intermitente resultó más perjudicial en términos de aclimatación que la continua. Esto se vio reflejado en la menor secreción salival y en la mayor pérdida ósea interradicular en HCI, así como también en el aumento de la resorción ósea general. Los fenómenos homeostáticos desencadenados en respuesta a HX involucrarían la activación del factor inducible por hipoxia-1 α y mecanismos adaptativos a nivel bioenergético mitocondrial, que parecen no ser del todo eficaces en HCI. Estos resultados conjuntamente con el análisis microscópico de las GSM sugieren una diferencia fenotípica durante la aclimatación en HCI y HCC, que involucraría cambios a nivel bioquímico, ultraestructural y molecular.

Cuando se evaluó el efecto de la HX sobre ratas adultas sometidas a PE, nuestros resultados sugieren que la exposición a HX agrava las manifestaciones patológicas orales de la periodontitis, tanto a nivel óseo como glandular. Las vías de señalización que se activan a nivel celular durante la exposición a HCI y HCC podrían incrementar las señales de la cascada inflamatoria inducida por periodontitis, aumentando su efecto deletéreo sobre el periodonto y las GSM.

En conclusión, la exposición a HX induce cambios en la fisiología del tejido periodontal y glandular de ratas en crecimiento y adultas, de forma diferencial cuando se las expone en forma continua como intermitente. Este trabajo de tesis constituye un antecedente valioso a la hora de evaluar la salud periodontal de individuos que habitan o trabajan en condiciones de HX y ayuda a una mejor comprensión de los procesos que regulan la homeostasis oral durante la aclimatación a la HX, pudiendo contribuir al desarrollo de estrategias para prevenir la hiposecreción salival y sus consecuencias en poblaciones expuestas a HX.

PUBLICACIONES

El contenido de este trabajo de tesis fue parcialmente publicado en las presentaciones que se describen a continuación:

PUBLICACIONES EN REVISTAS CON REFERATO

1- ALVEOLAR BONE LOSS ASSOCIATED TO PERIODONTAL DISEASE IN LEAD INTOXICATED RATS UNDER ENVIRONMENTAL HIPOXIA.

Terrizzi AR, Fernández-Solari J, Lee CM, Bozzini C, Mandalunis PM, Elverdin JC, Conti MI, Martínez M. Arch Oral Biol (2013) 58:1407-14.

2- LEAD INTOXICATION UNDER ENVIRONMENTAL HYPOXIA IMPAIRS ORAL HEALTH.

Terrizzi AR, Fernández-Solari J, Lee CM, Conti MI, Martínez MP.
J Toxicol Environ Health A (2014) 77:1304 -10

3- DELETERIOUS EFFECT OF CHRONIC CONTINUOUS HYPOXIA ON ORAL HEALTH

Terrizzi AR, Fernández-Solari J, Lee CM, Conti MI, Martínez MP.
Arch Oral Biol (2016) 72:1-7

4) SUBMANDIBULAR GLAND ADAPTATION FAILURE UNDER CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIA

Terrizzi AR, Conti MI, Fernández Solari J, Martínez MP
Enviado para su publicación

PRESENTACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFCOS NACIONALES E INTERNACIONALES

✓ 2013

PERIODONTAL DISEASE IN LEAD INTOXICATED RATS UNDER HYPOBARIC HYPOXIA

Terrizzi AR, Lee CM, Bozzini C, Fernandez Solari J, Elverdin JC, Conti MI, Martínez MP
91st IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. Seattle, Washington, USA. 20-23
Marzo 2013.

CHRONIC EXPOSURE TO INTERMITTENT HYPOXIA IN LEAD INTOXICATED GROWING RATS IMPAIRS BONE BIOLOGY

Maria I. Conti, Antonela R. Terrizzi, Ching M. Lee, Patricia M. Mandalunis, Clarisa Bozzini, Maria P. Martinez.
37th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2013) Birmingham, UK. 21-26 de Julio de 2013.

IMPACT OF LEAD INTOXICATION UNDER INTERMITTENT HYPOXIA ON ORAL HEALTH OF GROWING RATS

Martinez MP, Terrizzi AR, Lee CM, Fernandez Solari J, Elverdin JC, Conti MI

37th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2013) Birmingham, UK. 21-26 de Julio de 2013.

INTOXICACIÓN CON PLOMO BAJO HIPOXIA AMBIENTAL. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS INFLAMATORIOS ORALES.

Terrizzi AR, Lee CM, Bozzini C, Mandalunis PM, Fernandez Solari JJ, Elverdin JC, Conti MI, Martínez MP.

XLVI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica (SAIO). Mar del Plata, 7-9 Noviembre de 2013

✓ 2014

LEAD INTOXICATION UNDER ENVIRONMENTAL HYPOXIA: ASSESSMENT OF ORAL INFLAMMATORY PARAMETERS.

Terrizzi AR, Lee CM, Bozzini C, Mandalunis PM, Fernandez Solari J, Elverdin JC, Conti MI, Martínez MP.

92nd IADR General Session & Exhibition. Cape Town, South Africa. 25-28 Junio 2014

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y BIOMECÁNICO DEL HUESO MANDIBULAR EN DISTINTAS CONDICIONES DE HIPOXIA.

Antonela R. Terrizzi, Ching M. Lee, J Fernandez Solari, Clarisa Bozzini, María I. Conti, María P. Martínez.

XLVII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica (SAIO) Rosario, 13-15 Noviembre de 2014

✓ 2015

EXPRESION DIFERENCIAL DE MARCADORES INFLAMATORIOS PERIODONTALES EN DISTINTAS CONDICIONES DE HIPOXIA CRONICA

Antonela R. Terrizzi, Ching M. Lee, J Fernandez Solari, Patricia M. Mandalunis, María I. Conti, María P. Martínez.

XLVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica (SAIO) Tanti, Córdoba 12-14 Noviembre de 2015

✓ 2016

EXPRESION DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN GLÁNDULAS SALIVALES EN DISTINTAS CONDICIONES DE HIPOXIA CRONICA

Terrizzi AR, Lee CM, Fernandez Solari J, Conti MI, Martínez MP.

Congreso 70 aniversario Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, 1-4 noviembre 2016

✓ 2017

SUBMANDIBULAR GLAND ADAPTATION IN RATS EXPOSED TO CHRONIC HYPOXIA

Terrizzi AR, Fernández Solari J, Conti MI, Martínez MP.

38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2017), Río de Janeiro, Brasil, 1-5 Agosto 2017

ALTERACIONES ORALES POR FALLA ADAPTATIVA DE LA GLANDULA SUBMAXILAR BAJO HIPOXIA INTERMITENTE

Antonela R. Terrizzi, María I. Conti, Ching Ming Lee, Javier Fernández-Solari, María P. Martínez.

L Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación odontológica (SAIO). 9-11 de noviembre de 2017, San Nicolás, Argentina

EXPOSITION TO INTERMITTENT HYPOXIA LEADS TO SUBMANDIBULAR GLAND ADAPTATION FAILURE

Antonela R. Terrizzi, María I. Conti, Tamara Zaobornyj, María P. Martínez, Javier Fernández-Solari.

Reunión conjunta de sociedades de Biociencias. 13 al 17 de noviembre de 2017, Buenos Aires, Argentina

PREMIOS

1- Premio Unilever Divisional Travel Award categoría SENIOR por el trabajo **“Lead intoxication under environmental hypoxia: assessment of oral inflammatory parameters”** Autores: Terrizzi AR, Lee CM, Bozzini C, Mandalunis PM, Fernandez Solari J, Elverdin JC, Conti MI, Martínez MP. En el marco de la XLV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica (SAIO) División Argentina de la Internacional Association for Dental Research. Mar del Plata 7-9 de Noviembre de 2013.

2- Distinción de la Universidad de Buenos Aires. Por reconocimiento a premios recibidos por parte de organismos y entidades ajenas a la UBA durante el año 2013. Buenos Aires, 10 de Diciembre de 2014.

3- Premio Unilever Divisional Travel Award categoría SENIOR por el trabajo **“Alteraciones orales por falla adaptativa de la glandula submaxilar bajo hipoxia intermitente”** Autores: Antonela R. Terrizzi, María I. Conti, Ching Ming Lee, Javier Fernández-Solari, María P. Martínez en el marco de la L Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación odontológica (SAIO), División Argentina de la Internacional Association for Dental Research. 9-11 de noviembre de 2017, San Nicolás, Argentina.

ABREVIATURAS

ADP	adenosin difosfato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de varianza
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosin trifosfato
AQP	acuaporina
CA	cresta alveolar
COX	enzima ciclooxigenasa
CR	control respiratorio
CTX-I	telopéptido C-terminal de colágeno tipo I
E	módulo de Young
EGF	factor de crecimiento epidérmico
GSM	glándula submaxilar
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HCC	hipoxia crónica continua
HCI	hipoxia crónica intermitente
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
HIF	factor inducible por hipoxia
HO [•]	radical hidroxilo
HRP	peroxidasa de rábano picante
HX	hipoxia
H&E	hematoxilina y eosina
IHQ	inmunohistoquímica
IL	interleuquina

iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
Iz	momento de inercia
LAC	límite amelocementario
LP	ligamento periodontal
m-CCCP	m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
MMP	metaloproteinasas
N	newton
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NGF	factor de crecimiento neuronal
NX	normoxia
ON	óxido nítrico
O ₂	oxígeno
O ₂ ⁻	anion superóxido
P	periodontitis
PBS	buffer fosfato salino
PDGF-β	factor de crecimiento derivado de las plaquetas β
PE	periodontitis experimental
PG	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PNM	polimorfonuclear neutrófilo
pO ₂	presión parcial de oxígeno
RANKL	ligando de receptor activador de factor nuclear κβ
RIA	radioinmunoensayo
ROS	especies reactivas del oxígeno

SEM	error standard medio
SNA	sistema nervioso autónomo
SOD	superóxido dismutasa
STE	buffer sucrosa - Tris - EDTA
TBARS	especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
TGF- α	factor de crecimiento transformante α
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
VHL	proteína Von Hippel-Lindau
VO	volumen óseo total
VO parcial	volumen óseo parcial
VT	volumen trabecular
W	carga
Wf	resistencia a la fractura
Wy	carga elástica límite
Wy/dy	rigidez extrínseca

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Anatomía bucal de la rata	1
1.2 Generalidades del tejido óseo	2
1.2.1 Hueso Alveolar	4
1.2.2 Biomecánica Mandibular	5
1.3 Periodonto	7
1.3.1 Periodonto de inserción	7
1.3.2 Periodonto de protección	8
1.3.3 Enfermedad periodontal	9
1.4 Glándulas salivales	14
1.4.1 Anatomía e histología de las glándulas salivales	14
1.4.2 Saliva y secreción salival	16
1.4.3 Rol de la GSM como moduladora neuroinmunoendócrina	18
1.4.4 Regulación de la secreción salival	19
1.4.5 Rol de las acuaporinas en la secreción salival	20
1.4.6 Hipofunción salival	21
1.5 Hipoxia ambiental	22
1.5.1 El desafío fisiológico de la altura	23
1.5.2 Hipoxia y estrés oxidativo	26
1.6 Mitocondrias y su rol como sensores de oxígeno	26
1.6.1 Utilización de oxígeno mitocondrial durante la exposición a HX	29
1.7 Antecedentes tenidos en cuenta para el desarrollo de esta tesis doctoral	29

2. Hipótesis y Objetivos	32
2.1 Hipótesis	32
2.2 Objetivo General	32
2.3 Objetivos específicos	32
3. Materiales y Métodos	33
3.1 Animales	33
3.2 Determinación de peso y talla	33
3.3 Diseño experimental	34
3.4 Determinaciones	35
3.4.1 Hematocrito	35
3.4.2 Concentración de CTX-I	35
3.4.3 Estudios en mandíbula	35
A. Propiedades biomecánicas	35
A.1 Propiedades estructurales	35
A.2 Propiedades geométricas	37
A.3 Propiedades materiales	37
B. Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar	38
C. Análisis histomorfométrico del espacio interradicular	39
3.4.5 Secreción salival estimulada	40
3.4.6 Mediadores inflamatorios en encía y GSM	41
A. Contenido de PGE ₂	41
B. Actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)	41
3.4.7 Caracterización mitocondrial y estado REDOX en GSM	42
A. Consumo de O ₂ mitocondrial	42

B. Actividad de los complejos mitocondriales	44
C. Velocidad de producción de H ₂ O ₂	45
D. Actividad de la superóxido dismutasa	45
E. Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	46
3.4.8 Niveles de ARNm de AQP-5 mediante RT-PCR	46
3.4.9 Análisis histológico de las GSM	47
A. Histología de rutina	47
B. Inmunohistoquímica de HIF-1 α y acuaporina-5	47
C. Microscopía electrónica de transmisión	47
3.4.10 Determinación de proteínas	48
3.5 Análisis estadístico	48
4. Resultados	49
I. Objetivo I	Efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario en animales en crecimiento
1. Peso corporal y mandibular, talla y hematocrito	49
2. Estudios en mandíbula	50
2.1 Propiedades Biomecánicas	50
A. Propiedades Estructurales	50
B. Propiedades Geométricas	51
C. Propiedades Materiales	52
2.2 Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar	53
2.3 Análisis histomorfométrico del espacio interradicular	54
3. Contenido de PGE ₂ y actividad de la iNOS en tejido gingival	56
4. Análisis histológico de las GSM	57

5. Contenido de PGE ₂ y actividad de la iNOS en GSM	57
--	----

II. Objetivo II Efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario y la GSM de ratas adultas

1. Peso corporal, mandibular, glandular y hematocrito	59
2. Estudios en mandíbula	61
2.1 Propiedades Biomecánicas	61
A. Propiedades Estructurales	61
B. Propiedades Geométricas	61
C. Propiedades Materiales	62
2.2 Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar	63
2.3 Análisis histomorfométrico del espacio interradicular	64
3. Concentración de CTXI	65
4. Contenido de PGE ₂ y actividad de la iNOS en tejido gingival	66
5. Análisis histopatológico del tejido gingival y del ligamento periodontal	67
6. Secreción salival estimulada	68
7. Contenido de PGE ₂ y actividad de la iNOS en GSM	69
8. Caracterización mitocondrial y estado REDOX en GSM	70
A. Consumo de O ₂ mitocondrial	70
B. Actividad de los complejos mitocondriales	72
C. Velocidad de producción de H ₂ O ₂	74
D. Actividad de la superóxido dismutasa	74
E. Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico	75
9. Niveles de ARNm de AQP-5 en GSM	76
10. Análisis histológico de la GSM	76

A. Histología de rutina	76
B. Inmunohistoquímica de HIF-1 α y acuaporina-5	77
C. Microscopía electrónica de transmisión	78
III. Objetivo III Efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario y en ratas adultas sometidas a periodontitis experimental	
1. Peso corporal, glandular y hematocrito	80
2. Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar	81
3. Análisis histomorfométrico del espacio interradicular	82
4. Contenido de PGE ₂ y actividad de la iNOS en tejido gingival	83
5. Secreción salival estimulada	84
6. Contenido de PGE ₂ y actividad de la iNOS en GSM	85
7. Análisis histológico de la GSM	86
A. Histología de rutina	86
B. Microscopía electrónica de transmisión	87
5. Discusión	89
6. Conclusiones	106
7. Bibliografía	108

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Anatomía bucal de la rata

Las ratas y los ratones se encuentran agrupados dentro del orden *Rodentia*, suborden *Myomorpha* y familia *Muridae*. El género de la rata es *Rattus*, en tanto que la rata de laboratorio deriva del modelo salvaje *Rattus norvegicus* y pertenece a la variedad albina. La maduración ósea de su esqueleto ocurre lentamente y la osificación se completa al alcanzar el primer año de vida aproximadamente.

La rata posee una única dentición distribuida en dos hemimaxilares superiores y dos inferiores. La fórmula dentaria se compone de 3 molares y un incisivo en cada hemimaxilar, no existiendo caninos ni premolares (Figura 1.1). Los incisivos se especializan en roer y crecen durante toda la vida del animal. Los molares sirven principalmente para la molienda y trituración del alimento (Moore DM, 2000).



Figura 1.1. Vista de la cara lingual de la hemimandíbula de rata. Tomado de De Rezende Barbosa GL y cols., 2016

En este trabajo de tesis se desarrollaron determinaciones tomando como referencia el primer molar inferior de la rata. El primer molar es el más grande de los 3 molares y consta de una corona y cuatro raíces, una mesial, una distal y dos medias o centrales, muy delgadas, que se disponen una hacia vestibular y otra hacia lingual. Al igual que las piezas dentarias humanas, el primer molar presenta una porción central, la pulpa dental, rodeada en su totalidad por dentina que está recubierta por esmalte en su porción coronaria y por cemento en la zona radicular (Figura 1.2).

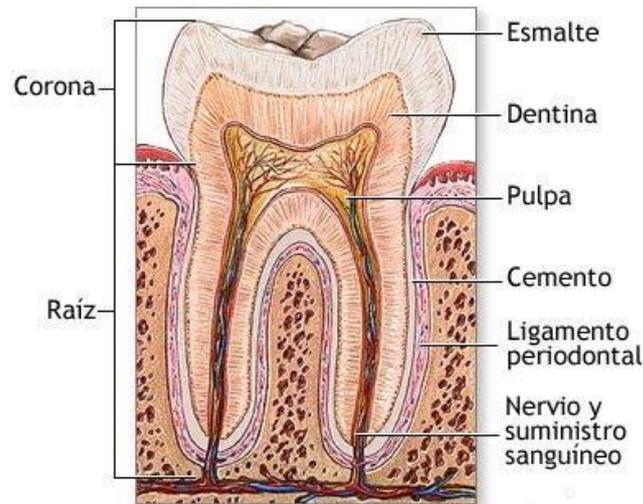


Figura 1.2. Esquema de una pieza dentaria. Tomada de: todosobredientes.wordpress.com

1.2 Generalidades del tejido óseo

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo que está constituido por células y una matriz extracelular mineralizada compuesta principalmente por hidroxipatita. El proceso de mineralización le otorga una característica distintiva sobre el resto de los tejidos conectivos y le permite cumplir sus funciones de sostén y protección. El componente inorgánico le brinda rigidez y resistencia a las fuerzas compresivas. Por otro lado, la matriz extracelular constituida principalmente por colágeno tipo I, otorga al hueso su capacidad elástica y de resistencia a la tracción (Boskey AL y cols., 1999).

En el tejido óseo se encuentran principalmente 4 tipos celulares: osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento y osteoclastos. Los osteoblastos son los encargados de sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea, como el colágeno de tipo I, proteoglicanos, proteínas de adhesión celular, osteocalcina, factores de crecimiento y además controlan el depósito de sales minerales. Estas células pueden permanecer en las superficies óseas o quedar rodeadas por la matriz que sintetizan. Cuando permanecen en la superficie, finalizan la síntesis de la matriz, se aplanan y se convierten en células de revestimiento o "lining cells". Estas células, a partir de la producción de factores locales como interleuquina (IL) 6 y 11, desarrollan un importante papel en el control del remodelado óseo (Manolagas SC y cols., 1995; Elías JA y cols., 1995). Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz adquieren aspecto estrellado y pasan a llamarse osteocitos, los que se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie, células de revestimiento,

osteoblastos y células de la médula ósea mediante prolongaciones citoplasmáticas. La cavidad que contiene al cuerpo del osteocito recibe la denominación de laguna osteocítica y los canalículos por los que discurre su prolongación citoplasmática se denominan conductos calcóforos (Alberts B y cols., 1994). Los osteocitos son esenciales para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas, ya que participan en el proceso de homeostasis del calcio y del fósforo y detectan el estrés mecánico y la presencia de microlesiones en la matriz (Mullender M y cols., 2004). Además, los osteocitos transmiten señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (Aubin JE y cols., 1993). Los osteoclastos son las células óseas de mayor tamaño y derivan de las células madre hematopoyéticas. Son células multinucleadas, ricas en anhidrasa carbónica y fosfatasa alcalina resistente al tartrato, encargadas de la reabsorción mineral y degradación del colágeno. Estas actividades pueden llevarse a cabo gracias a la presencia de una bomba protónica ATP dependiente en su membrana que impulsa H^+ hacia el hueso estableciendo un pH de 4-5, lo que crea un ambiente propicio para la reabsorción de minerales y para la actividad de la metaloproteinasa 9 (MMP-9), encargada de la degradación colágena. La actividad resorptiva de los osteoclastos parece ser activada por IL-6 y 11, pudiendo ser éstas a su vez estimuladas por IL-1 y el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) en procesos inflamatorios. Diariamente se renueva un 0,7% de hueso sano del organismo gracias a la actividad conjunta de reabsorción osteoclástica y neogénesis osteoblástica. Ambas células conforman unidades funcionales de remodelado óseo y permiten mantener la matriz ósea adaptándola a los requerimientos mecánicos y funcionales. El remodelado óseo también sirve para cumplimentar el rol metabólico del hueso como reservorio de calcio y fosfato del organismo y así mantener los niveles séricos adecuados de dichos minerales (Roberts WE y cols., 1987).

El hueso se comporta como un órgano metabólicamente muy activo cuya unidad estructural es la laminilla ósea, de unos 3-5 μm de espesor. Si las fibras colágenas se disponen paralelamente entre sí, forman el hueso esponjoso o trabecular, cuyo elemento básico es la osteona trabecular. Cuando las laminillas se ubican de forma concéntrica, formando estructuras cilíndricas, conforman las osteonas corticales y los sistemas de Havers, presentes en el hueso cortical o compacto. La lámina ósea está presente sólo en el hueso maduro, el cual recibe el nombre de hueso laminar.

1.2.1 Hueso alveolar

El hueso alveolar es la zona de los huesos maxilares que contiene y reviste los alvéolos de los dientes. En la rata, conforma lo que se denomina apófisis alveolodentaria, que contiene tabiques intra e interradiculares. Las paredes de los alvéolos están revestidas por hueso cortical, mientras que el área entre los mismos se halla ocupada por hueso esponjoso, cuyo espesor varía de acuerdo a la exigencia funcional de cada ubicación y permite la vascularización de las corticales (Cardadropoli G y cols., 2003). En un corte transversal, el alveolo presenta forma triangular, donde el vértice corresponde a la cresta alveolar y la base a la zona de conexión con el hueso que forma el resto de la mandíbula. Las corticales alveolares suelen ser delgadas en el sector lingual de los molares inferiores.

El tejido óseo alveolar se origina, al igual que el ligamento periodontal (LP) y el cemento radicular, en el saco dentario. Los 3 se comportan como una unidad funcional que mantiene su estructura y función siempre que permanezcan inalteradas cada una de sus partes (Araujo MG & Lindhe J, 2005). Además, conjuntamente forman el aparato de inserción del diente, teniendo como función absorber y distribuir las fuerzas generadas por los contactos dentarios y la masticación. El hueso alveolar que circunda las superficies radiculares da inserción a las fibras de Sharpey, que se extienden entre el LP y el cemento (Lindhe J, 2009). El hueso alveolar adquiere su forma definitiva una vez que ha terminado el proceso de erupción dentaria y conformación del ápice radicular de la pieza respectiva. Debido a su ubicación anatómica y a que es el encargado de alojar a las piezas dentarias, el hueso alveolar, principalmente su cortical periodontal, responde de diferente forma a los cambios metabólicos respecto a otros huesos del organismo. Varios factores locales y sistémicos influyen para que los procesos de remodelación ósea mantengan un equilibrio en la estabilidad de la altura de la cresta alveolar y en la integridad de las corticales óseas. En el caso de la rata, se ha observado que existe una relación entre la edad y la pérdida ósea alveolar independientemente de la condición periodontal, atribuyéndole esta pérdida al desbalance de los mecanismos de resorción/neoformación (Misawa Y y cols., 2007). La remodelación continua del hueso alveolar es consecuencia de su gran actividad metabólica. Las fuerzas que generan presión provocan resorción ósea alveolar y las que generan tensión estimulan su formación. Los pequeños movimientos de los dientes son las principales causas del remodelado óseo en este tipo de hueso, además de las fuerzas de la masticación que recaen sobre la pieza dentaria y son absorbidas por el LP. Cuando el individuo se encuentra en una situación estable, la masa de hueso se mantiene gracias al

remodelado óseo que influye sobre dónde, y en qué medida, aumentan las células óseas. Cuando hay trauma oclusal, las fuerzas generadas pueden causar inflamación de los tejidos de soporte, con destrucción dentaria y periodontal, como así también una respuesta adaptativa a nivel interradicular (Lindhe J, 2009).

A nivel molecular, tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han comprobado la importancia de la participación de las prostaglandinas (PGs) y el óxido nítrico (ON) como mediadores en los cambios óseos en respuesta a la adaptación mecánica. Ambos compuestos se liberan en el LP cuando se activa el sistema osteocítico-lacunar (Burger EH & Klein-Nulend J, 1999). Además existe liberación de otras citoquinas y mediadores como respuesta a las fuerzas aplicadas en forma continua que estimulan la remodelación ósea.

1.2.2 Biomecánica mandibular

Durante el acto masticatorio se somete a la mandíbula a fuerzas producidas por los músculos masticatorios y por las fuerzas de reacción de las articulaciones temporomandibulares y los dientes. Como resultado de dichas fuerzas, en la mandíbula se originan tensiones y deformaciones, cuya intensidad depende de la naturaleza de la carga externa y de las propiedades materiales y geométricas mandibulares (van Eijden T, 2000).

La deformación producida en el hueso en función de la carga puede ser estudiada por una curva que relaciona ambos factores. La curva carga/deformación muestra un comportamiento elástico lineal a partir del cual, si la carga aplicada es suficientemente intensa, se alcanza un punto de cesión donde las deformaciones producidas son irreversibles (deformación plástica). Este comportamiento determina la producción de microfracturas que si se acumulan pueden debilitar al material óseo y producir una fractura. La pendiente de la curva en la región elástica se denomina rigidez ósea y es inversa a la flexibilidad del hueso. Es la capacidad del tejido óseo a resistir la deformación en la dirección de la carga aplicada (Bozzini C y cols., 2009)

La propiedad de los huesos de actuar como palancas rígidas resistentes a la fractura se adquiere combinando dos clases diferentes de resistencia: la rigidez (resistencia a la deformación) y la tenacidad (resistencia a la formación y progreso de microfracturas). Ambas dependen de la rigidez intrínseca del material mineralizado y de la calidad arquitectónica del diseño trabecular y cortical. De lo antedicho se deduce que los componentes óseos que determinan las propiedades biomecánicas en el hueso son tanto el colágeno de la matriz y el grado de mineralización del mismo, como

su cantidad y distribución en el espacio. Los huesos no controlan su masa para optimizar su rigidez sino que controlan su arquitectura. Si bien la masa ósea se encuentra en relación directa con la carga que recibe el hueso, para determinar las propiedades mecánicas es más importante la distribución geométrica tridimensional del mismo que la masa en sí (Ferretti JL y cols., 2001).

La mandíbula humana puede considerarse una estructura biomecánica óptima, tomando como referencia la ubicación de la articulación témporomandibular, su relación con las piezas dentarias y el punto de inserción de los músculos masticadores (Boretti G y cols., 1995). En la rata, cada hemimandíbula presenta distintas unidades funcionales, tales como los alvéolos de los incisivos de crecimiento continuo y el proceso alveolar de los molares por un lado, y el ángulo goníaco, el cóndilo y la apófisis coronoides por otro, siendo éstas últimas lugares de inserción de los músculos masticadores. A nivel histológico, la estructura del hueso trabecular mandibular está preparada de forma óptima para ofrecer el máximo nivel de resistencia a las fuerzas tensionales y la presión con la mínima cantidad de masa ósea (Huiskes R y cols., 2000). La mandíbula es más rígida en dirección longitudinal que transversal, debido a que el colágeno, la hidroxiapatita y las osteonas están orientadas en dicha dirección. El eje longitudinal, mayor a nivel de la sínfisis, puede compensar las cargas torsionales en comparación con el cuerpo en la región molar. Además, la sínfisis es la zona mandibular de mayor densidad mineral, de ahí que su resistencia sea mayor (Kingsmill VJ & Boyde A, 1998). Es importante tener en cuenta que las fuerzas a las que está sometida la mandíbula cambian continuamente, dado que las mismas provienen de los diversos músculos masticadores, piezas dentarias y articulaciones y su punto de aplicación e intensidad dependen del dinamismo de cada situación (masticación, deglución, etc.).

Con respecto al hueso alveolar, el remodelado se activa a través de fuerzas flexurales que la masticación imprime al LP y que genera un aumento de espesor cortical. Las fuerzas masticatorias por acción muscular no sólo afectan la posición dentaria y la forma de la arcada, sino también la estructura de la mandíbula. La presencia de estos estímulos mecánicos es necesaria para el normal desarrollo y mantenimiento del volumen óseo y de la estructura del hueso. Debido a la inclinación lingualizada de los molares en la rata, las fuerzas masticatorias repercuten sobre el ápice de las piezas y la tabla lingual más que en la vestibular.

1.3 Periodonto

La palabra periodonto etimológicamente significa peri= alrededor y odonto= diente, es decir que el periodonto se encuentra formado por aquellas estructuras anatómicas que rodean y soportan a la pieza dentaria. El periodonto se divide en dos: periodonto de inserción, compuesto por el cemento radicular, el hueso alveolar y el LP; y el periodonto de protección, conformado por la encía libre, la encía insertada o adherida y el epitelio de unión. El primero es el encargado de mantener el diente en su alvéolo, brindándole además su posición en el arco dentario, mientras que el segundo sirve para proteger al periodonto de inserción.

Las estructuras que forman el periodonto de inserción poseen la particularidad de estar íntimamente relacionadas no sólo desde su origen embriológico y su disposición anatómica, sino también desde un punto de vista funcional. La remodelación del hueso alveolar, el acomodamiento de las fibras del LP y la aposición del cemento se encuentran permanentemente en actividad debido a la necesidad de intrusión, extrusión y acomodamiento de la pieza dentaria a lo largo de su vida.

1.3.1 Periodonto de inserción

Las características del hueso alveolar fueron previamente descritas en el punto 1.2.1 de este capítulo.

El cemento es un tejido que recubre a la pieza dentaria en su porción radicular. Forma parte del sistema de inserción en la pared dental de las fibras del LP para sujetar la pieza al hueso alveolar. Si bien no tiene la capacidad de remodelarse como el hueso, el cemento puede generarse por aposición secundaria, siendo los sitios más activos el ápice y la zona de la furcación radicular, relacionados con procesos de compensación por desgaste oclusal.

El LP está conformado por fibras colágenas que se insertan por un lado en el cemento y por otro, en el hueso alveolar. El elemento esencial del LP son las fibras denominadas fibras de Sharpey, pero además contiene células como los fibroblastos, osetoblastos, cementoblastos, células epiteliales y terminaciones nerviosas. Se encuentran además, células asociadas a la respuesta inmunológica del huésped, como macrófagos, mastocitos y células pluripotenciales cercanas a los vasos sanguíneos. La presencia de una estructura colágena entre el hueso y el diente brinda resistencia y flexibilidad a su unión, al mismo tiempo que permite que las fuerzas generadas durante los eventos masticatorios y los contactos dentarios se

distribuyan y sean absorbidos por las apófisis alveolares de los maxilares. Por otro lado, estas fuerzas originan señales y mecanismos compensatorios que permiten adaptarse a los requerimientos mecánicos, tanto funcionales como parafuncionales, gracias a la mediación de mecanorreceptores y nociceptores ubicados en el LP (Biancu S y cols., 1995).

1.3.2 Periodonto de protección

Con respecto al periodonto de protección, éste está compuesto por la encía, que es la parte de la mucosa masticatoria que cubre las apófisis alveolares de los maxilares y rodea la zona cervical de las piezas dentarias. La encía se compone de tejido epitelial y un tejido conectivo subyacente, denominado lámina propia, separados entre sí por la lámina basal. Con la erupción dentaria, la encía adquiere su aspecto definitivo insertándose hasta el límite amelocementario.

Anatómicamente, la encía se clasifica en encía libre o marginal (en contacto con la pieza dentaria) y encía insertada o adherida (en contacto con el hueso alveolar). La encía libre presenta dos vertientes, una interna o dental que mira hacia la pieza dentaria, y otra externa o bucal, que se dispone hacia el vestíbulo bucal. El epitelio de ambas vertientes es muy similar, conteniendo ambos estrato celular basal, espinoso y granuloso. Sólo el epitelio de la vertiente externa es queratinizado, por lo que también se encuentra presente el estrato córneo (Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A, 2010). La vertiente dental de la encía libre deja un espacio entre la misma y el diente llamado surco gingival, que establece el límite entre la encía marginal y los tejidos duros dentarios. En la profundidad del surco se encuentra una unión íntima entre células epiteliales con los tejidos duros dentarios gracias a la inserción del epitelio de unión. Este espacio gingival posee una profundidad variable de 0,7-1,5 mm dependiendo el sector del que se trate y de su estado de salud o enfermedad (Lindhe J, 2009). El epitelio de unión posee una forma triangular con base coronal y vértice apical y se comporta como una barrera que impide el paso de noxas hacia el periodonto de inserción. Está compuesto por epitelio escamoso estratificado no queratinizado que se une al diente por una lámina basal interna y al tejido conectivo por una lámina basal externa. Por debajo del epitelio gingival se encuentra el tejido conectivo compuesto por fibras gingivales que se insertan en el periostio, diente vecino y en la misma encía, existiendo además un grupo en forma de anillo alrededor de la pieza dentaria

A la unión dentogingival constituida por el epitelio de unión y el tejido conectivo que da inserción a la encía mediante sus fibras se la denomina espacio biológico (Delgado Pichel A y cols., 2011). Este confiere el verdadero sitio de sellado alrededor de la pieza dentaria y adquiere fundamental importancia en toda actividad clínica que se relacione anatómica y funcionalmente con él, pudiendo verse afectado como consecuencia de una agresión mecánica o procesos inflamatorios. En la figura 1.3 se resumen los componentes del periodonto de inserción y protección.

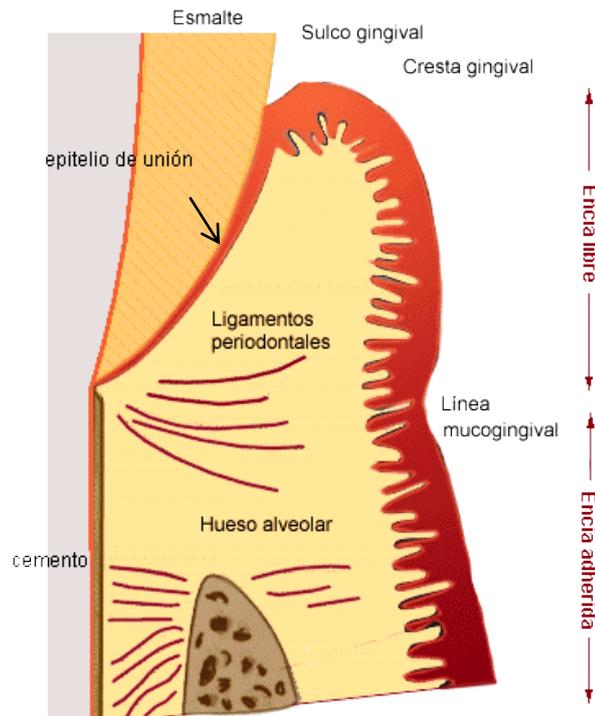


Figura 1.3. Esquema que muestra la relación del periodonto de inserción y del periodonto de protección con la pieza dentaria.

1.3.3 Enfermedad periodontal

La periodontitis (P) es una enfermedad infecciosa, generalmente crónica, que produce la pérdida progresiva de LP y de hueso alveolar de soporte adyacente, siendo la principal causa de pérdida de piezas dentarias entre los adultos (Pihlstrom BL y cols., 2005). Se la considera una patología multifactorial dado que su patogénesis puede incluir numerosas entidades biológicas tales como microorganismos orales, factores inmunológicos y genéticos, efectos físicos como la oclusión dental, medicamentos, factores medioambientales y enfermedades sistémicas, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Suzuki A y cols., 2015).

Estudios epidemiológicos han establecido que la periodontitis crónica se origina a partir de una gingivitis inducida por placa bacteriana. De esta manera, mientras la gingivitis es una lesión reversible que causa una inflamación de las encías y puede tratarse con relativa facilidad, la P o enfermedad periodontal crónica causa lesiones como la pérdida de inserción y hueso que son irreversibles en los seres humanos. Las lesiones gingivales pueden permanecer estables durante años o incluso es posible que nunca se conviertan en lesiones periodontales. En este sentido, se ha demostrado que la gingivitis se manifiesta después de sólo días o semanas de acumulación de placa bacteriana (Löe H y cols., 1965) en tanto que la P requiere tiempos más prolongados de exposición a la placa (Lindhe J y cols., 1975). Además, se considera que el grado de respuesta y la susceptibilidad del huésped desempeñan un papel decisivo para que suceda la transformación de gingivitis a P (Salvi GE & Lang NP, 2005). Desde el punto de vista clínico, las manifestaciones de la P incluyen alteraciones del color, la textura y el volumen de la encía libre, formación y mayor profundidad de bolsas periodontales donde antes existía el surco gingival, sangrado durante el sondaje periodontal, pérdida del nivel de inserción, retracción del margen gingival, pérdida de hueso alveolar, aumento de la movilidad dentaria, migración y finalmente exfoliación dental (Lindhe J y cols., 2009)(figura 1.4).

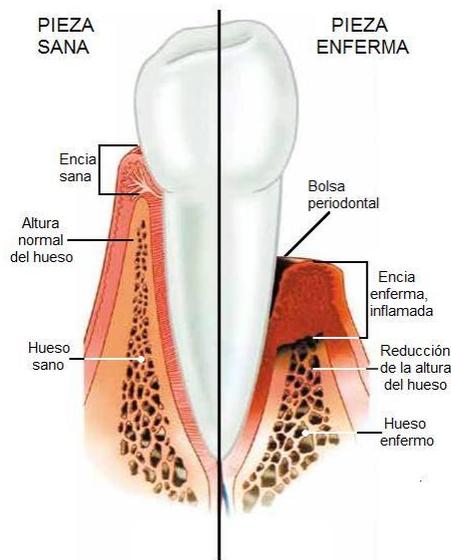


Figura1. 4. Esquema que representa un diente con el tejido periodontal en salud (izquierda) y otro diente con enfermedad periodontal (derecha). Tomado de rdentalcentro.com

Secuencialmente, la inflamación del periodonto se inicia por acumulación de placa bacteriana en la encía libre con signos de inflamación, tales como

enrojecimiento, cambios en el contorno y consistencia de la encía libre y sangrado. Histopatológicamente, se observa proliferación de las células del epitelio de unión y de vasos sanguíneos cercanos al mismo, comienzo de la destrucción de fibras colágenas gingivales e infiltrado progresivo de células inflamatorias con predominio de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos y linfocitos. Si no se realiza el barrido de la biopelícula, comienza a depositarse biofilm subgingival que contiene microorganismos anaerobios Gram (-), entre los que se incluyen patógenos oportunistas de la cavidad bucal tales como *Porphyromonas*. El crecimiento y colonización de la placa subgingival generan daños en el huésped a través de la liberación de diversos productos. Algunos de estos son enzimas que degradan los componentes del tejido conectivo. Proteasas producidas por la *Porphyromona gingivalis* y sustancias leucotóxicas producidas por el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* han sido vinculadas con la agresión tisular evidenciada en el desarrollo de la P (Grenier D y cols., 2015; Haubek D & Johansson A, 2014).

Además, el componente celular de la respuesta inmune innata tiene un papel preponderante en la reabsorción ósea observada en la P. Los macrófagos producen diversas citoquinas que estimulan el deterioro del tejido conectivo e inducen la subsecuente resorción ósea. Los neutrófilos también participan produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS) y citoquinas involucradas en la fase destructiva y resortiva. El burst respiratorio de las células mencionadas anteriormente tiene como objetivo eliminar microorganismos, aunque también destruye el tejido conectivo por liberación de colagenasas y elastasas (Medianos PN y cols., 2005). La IL-1 β , IL-6 y TNF α son algunas de las muchas moléculas secretadas, cuya concentración aumenta en el fluido crevicular y en los tejidos lesionados, y a su vez inducen la expresión de otros mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria, tales como PGs y ON. Dada la importancia de los mediadores inflamatorios producidos por las células del huésped en el desarrollo de la P, se efectuará a continuación un breve resumen de los principales biomarcadores discutidos en el presente trabajo de tesis:

El ON es un gas a temperatura ambiente de baja solubilidad en agua. Es una molécula altamente inestable y se lo considera un radical libre, ya que en presencia de O₂ se oxida rápidamente convirtiéndose en dióxido de nitrógeno. Es sintetizado por distintos tipos celulares como células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias y actúa como mensajero intracelular e intercelular paracrino con una vida media de pocos segundos. En el endotelio es responsable de causar vasodilatación, mientras que en los sitios de infección, los macrófagos lo sintetizan para destruir a los microorganismos que fueron fagocitados. La síntesis de ON se realiza por acción de la

enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la conversión de L-arginina en L-citrulina y ON en cantidades equimolares. En los mamíferos se han identificado 3 isoformas de NOS: la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), que son constitutivas y dependientes de calcio y producen concentraciones fisiológicas de ON capaz de actuar como señalizador molecular, y la inducible (iNOS), independiente de calcio, presente en macrófagos, neutrófilos, músculo liso y endotelio e inducible por estímulos tales como interferón gamma, $TNF\alpha$ y lipopolisacáridos (LPS) (Ferrer Viant D y cols., 1998). La inducción de iNOS genera grandes cantidades de ON por períodos prolongados de tiempo, pudiendo ser inhibida por glucocorticoides y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Existe evidencia que tanto la actividad de iNOS como la concentración de ON se ven incrementadas en tejidos periodontales inflamados (Lappin D y cols., 2000).

Con respecto a las PGs, éstas son sustancias de carácter lipídico pertenecientes a la familia de los eicosanoides. Se sintetizan a partir del ácido araquidónico libre producido a partir de los fosfolípidos de membrana mediante el complejo enzimático de la PG sintetasa, que incluye a la COX (Miyamoto T y cols., 1976). Las PGs se encuentran en casi todos los tejidos y líquidos corporales y están involucradas en numerosos procesos fisiológicos, entre ellas, la regulación de la presión arterial, la tonicidad de la musculatura lisa, la agregación plaquetaria, la quimiotaxis celular, la ovulación, la implantación embrionaria y diversos mecanismos de secreción. Existen varios tipos de PGs: PGA, PGI, PGE, PGG y PGF, que poseen distintas funciones y sus receptores se acoplan generalmente a vías de la adenilato ciclasa y AMPc como segundo mensajero. La PGE_2 es sintetizada mediante dos isoformas de la COX, la COX-1 que es constitutiva de todos los tejidos y regula mecanismos como la homeostasis vascular, la protección de la mucosa gástrica y el mantenimiento de la integridad renal; y la COX-2, inducida principalmente por mediadores inflamatorios ($TNF\alpha$, interferón, factores de crecimiento, etc.) en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos entre otras). La PGE_2 produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, participa en la resorción ósea, en la señalización del dolor y en la inducción de producción de citoquinas. En la cavidad bucal se ha demostrado un aumento de la concentración de PGE_2 en individuos con P además de una relación directa con la expresión del ligando de receptor activador de factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), factor necesario y regulador de la osteoclastogénesis (Tsutsumi R y cols., 2009).

En la figura 1.5 se puede observar la expresión simultánea de varios marcadores inflamatorios en los tejidos periodontales cuya acción coordinada resulta esencial para el desarrollo y la progresión de la P.

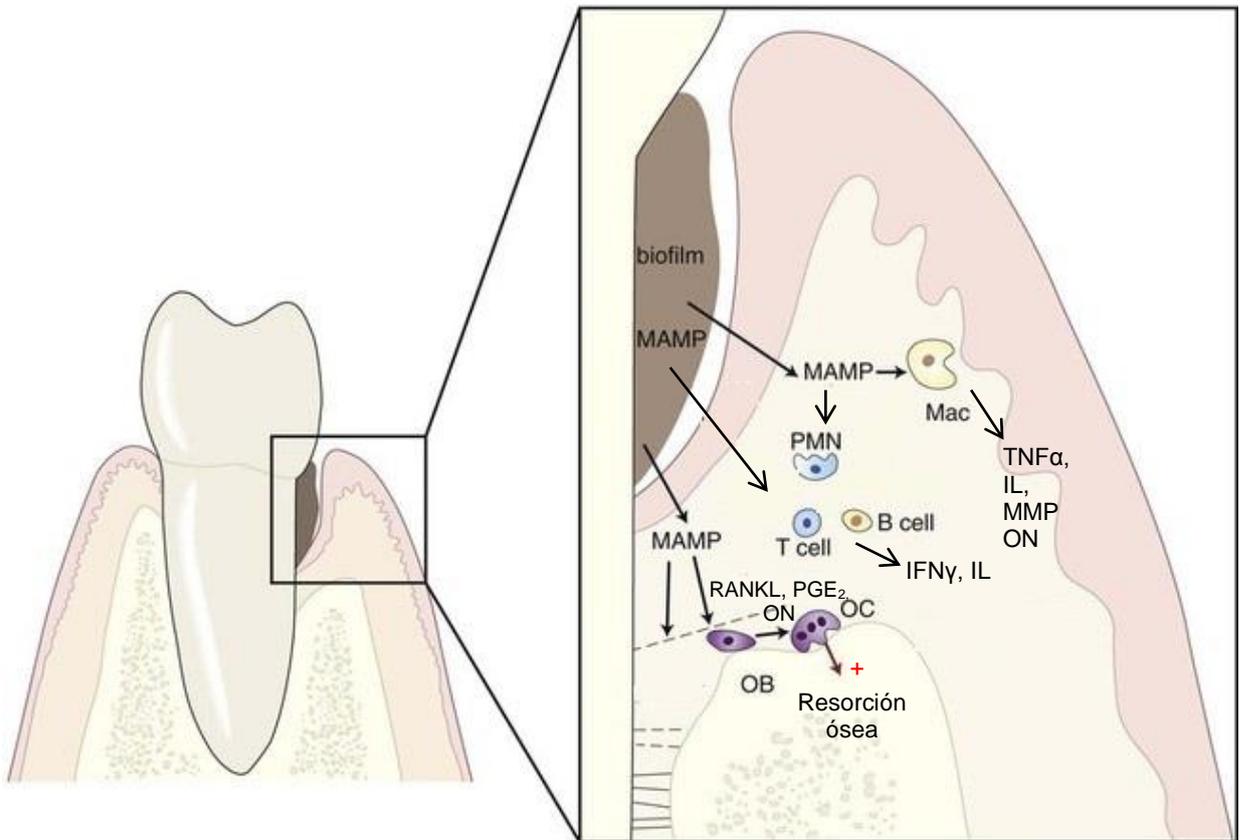


Figura 1.5. Principales mediadores inflamatorios involucrados en los cambios patológicos observados en la enfermedad periodontal. MAMP: patrones moleculares asociados a patógenos, MAC: macrófago, OC: osteoclasto, OB: osteoblasto, MMP: metaloproteinasas

Además de la inmunidad innata, los microorganismos orales estimulan la respuesta inmune adaptativa, la cual se activa cuando los mecanismos de la primera línea de defensa no logran erradicar a los mismos. Se ha demostrado la presencia de linfocitos T (LT) y B (LB) en los tejidos periodontales. Los LT están implicados en la resorción ósea como activadores de RANKL, mientras que los LB se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos.

En resumen, cuando se inicia un proceso inflamatorio, el objetivo es lograr la homeostasis a través de la rápida eliminación del agresor. De esta manera, la producción de moléculas proinflamatorias y proteolíticas y de ROS sirve para cumplir con este objetivo, mientras en una segunda etapa, la activación de moléculas antiinflamatorias funcionará como un mecanismo protector y reparador del tejido. La P es una enfermedad crónica que se caracteriza por una insuficiencia de las vías de resolución de la inflamación con incapacidad para lograr la homeostasis tisular (Van Dyke TE, 2008).

En el campo experimental, los cultivos celulares pueden ser útiles para replicar algunos aspectos del proceso de la P a nivel celular, sin embargo, para el análisis del desarrollo de posibles tratamientos de la misma, es importante el uso de animales de laboratorio. La rata es el roedor más utilizado para establecer modelos experimentales de P dado su fácil manejo y la similitud anatómica periodontal de la región molar con el humano (Listgarten MA, 1975; Yamasaki A y cols., 1979). Los modelos que se utilizan para la inducción de la periodontitis experimental (PE) se basan en la inoculación de LPS bacterianos o en la colocación de un hilo de seda sobre el cuello de los primeros o segundos molares como modelo de retención mecánica de placa bacteriana. En este último, la primera evidencia de alteración periodontal en la rata es la aparición de gingivitis marginal con edema. Luego se forman bolsas periodontales que se llenan de pelo y restos de comida. En grados severos, las lesiones afectan los espacios interdenciales e interradiculares con resorción del hueso alveolar y el establecimiento de lesión de furcación (Page RC & Schroeder H, 1982).

1.4 Glándulas salivales

1.4.1 Anatomía e histología de las glándulas salivales

Las glándulas salivales son glándulas de secreción exocrina, encargadas de la producción de saliva. Tanto humanos como roedores poseen glándulas salivales menores y mayores, estas últimas de mayor tamaño y producción salival. Las glándulas salivales mayores se denominan parótida, submaxilar (GSM) y sublingual, y producen el 20, 70 y 5% de la saliva de la cavidad oral, respectivamente. Dentro de las glándulas salivales menores encontramos, de acuerdo a su localización, las labiales, bucales, molares y palatinas que, en conjunto, aportan entre el 5 y 10% de la saliva total. En la rata, la glándula parótida se ubica detrás de la rama ascendente mandibular y el oído externo, bordeando caudalmente a la GSM, la cual comparte cápsula con la sublingual en la zona anterior del cuello (figura 1.6). La glándula sublingual ocupa el cuarto lateral externo del complejo submaxilar-sublingual, pero es fácilmente distinguible por su diferente coloración (Amano O y cols., 2012).

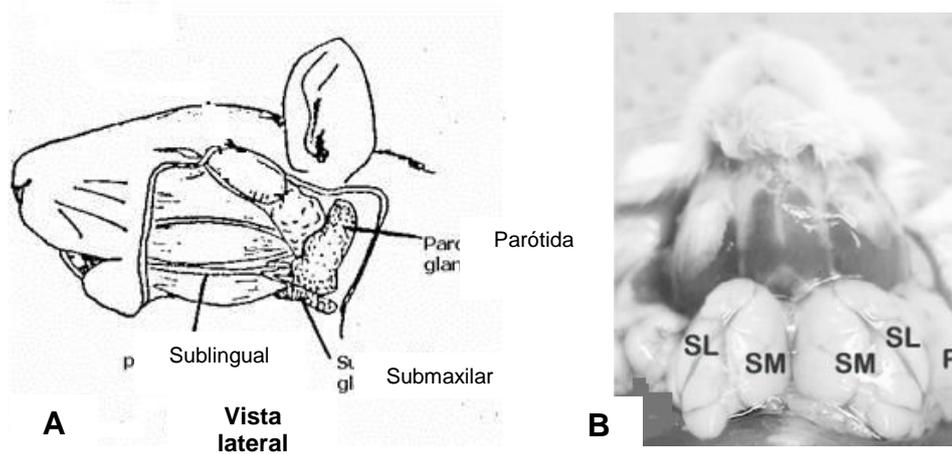


Figura 1.6. Localización anatómica de las glándulas salivales en la rata. **A.** Vista lateral. **B.** Vista luego de la disección. P: parótida, SL: sublingual, SM: submaxilar. Amano O y cols., 2012.

La unidad funcional mínima del parénquima glandular se denomina sialona y está constituida por un adenómero, un conducto estriado y la primera porción del conducto excretor. Un adenómero está compuesto por un acino y un conducto intercalar. Los acinos se subdividen en secciones más pequeñas, llamadas lóbulos, separados entre sí por tejido conectivo. Se consideran la unidad secretora de la glándula y están formados por un grupo de células epiteliales especializadas que producen y secretan la saliva primaria hacia un espacio común, la luz del acino. Las células acinares pueden ser de dos tipos: mucosas o serosas, por lo que los acinos se clasifican en mucosos, serosos o mixtos. Estudios histológicos y bioquímicos han demostrado que la composición morfológica y química de ambos tipos celulares es diferente (Tandler B & Phillips CJ, 1993). En el caso de las células mucosas, éstas presentan núcleos aplanados cerca de la zona basal y retículo endoplasmático escaso. Las células serosas presentan un núcleo redondeado, retículo endoplasmático evidente en la zona basal y gránulos de secreción apical. Con respecto a los gránulos secretorios, los mucosos contienen grandes cantidades de mucina y glicoconjugados, mientras que los serosos contienen menores cantidades de los mencionados productos y mayores cantidades de agua e iones, además de alfa amilasa, enzima importante en la digestión de los hidratos de carbono. La glándula parótida tiene principalmente acinos serosos, la sublingual mucosos y la GSM de ambos tipos, por lo que se la considera una glándula de secreción mixta en humanos. En roedores, la GSM presenta mayormente acinos serosos (Martinez-Madriral F & Micheau C, 1989). Además de las células epiteliales acinares, las glándulas salivales poseen otros dos tipos celulares: ductales y mioepiteliales. Las células mioepiteliales rodean a las acinares y proveen soporte y fuerza propulsiva al acino durante el

proceso de secreción. Tanto en humanos como en roedores, el sistema de conductos se compone de conductos intercalares, estriados y excretores intra-acinares, que derivan en el conducto excretor principal (figura 1.7), el cual es visible macroscópicamente y se denomina Stenon para la glándula parótida, Wharton para la GSM y Rivinus y Bartholin para la sublingual. Los conductos intercalares reciben la saliva primaria que fluye secuencialmente hacia los estriados, que se especializan en los procesos de reabsorción y secreción de electrolitos, modificando la composición de la saliva primaria y transformándola en saliva secundaria (Jenkins GN, 1978) En la GSM de roedores macho, entre el conducto intercalar y estriado se ubica el conducto contorneado granular, cuya pared está compuesta por epitelio simple. Estas células contienen gránulos secretorios en su citoplasma, y vierten péptidos biológicamente activos en la saliva tales como factores de crecimiento y hormonas (Gresik EW y cols., 1996).

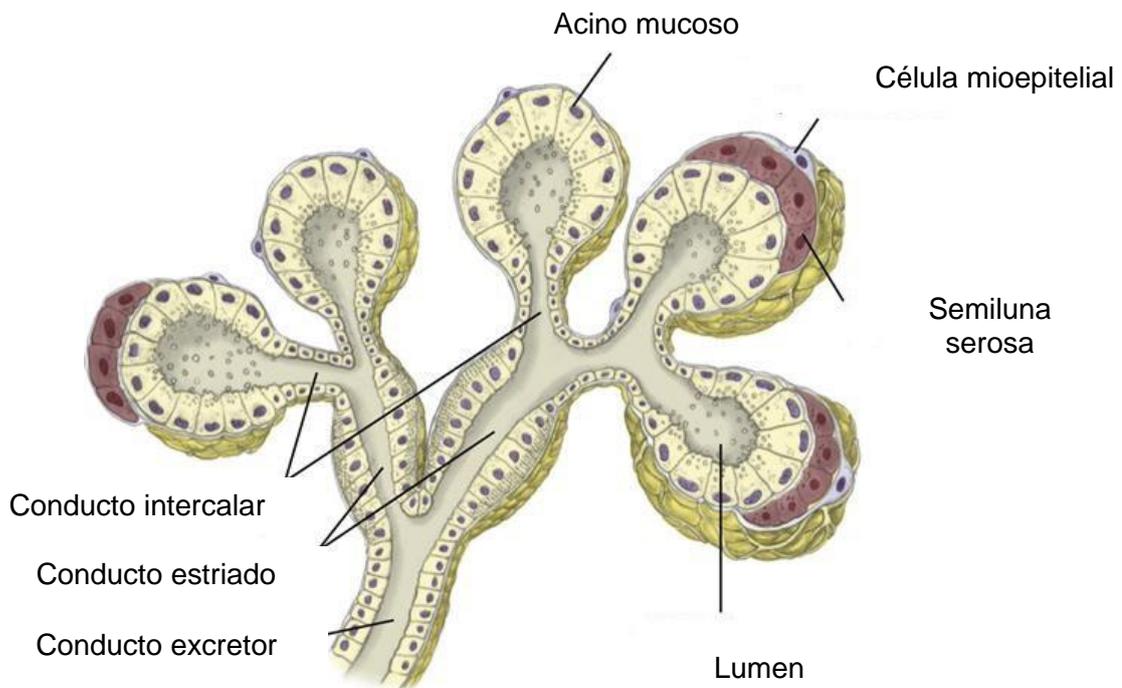


Figura 1.7. Representación esquemática de la sialona.

1.4.2 Saliva y secreción salival

La saliva es una mezcla de todas las secreciones de cada una de las glándulas salivales, constituyendo lo que se denomina saliva total o mixta. Es un líquido incoloro, cuya viscosidad puede ser viscosa o fluida y cuyas funciones son esenciales para mantener la el equilibrio del ecosistema oral. Está compuesta en un 99% de agua y tiene un pH que oscila entre 6,8 y 7,2. El restante 1% está conformado por sustancias

orgánicas e inorgánicas, entre las que se destacan glicoproteínas como amilasa salival o ptilina, mucinas, lisozima A, factores de crecimiento, inmunoglobulina A secretoria, Na^+ , K^+ , fosfatos y bicarbonatos (Gómez de Ferraris ME & Campos Muñoz A, 2010). Además de los mencionados componentes, es posible encontrar células epiteliales descamadas, leucocitos, fluido crevicular y restos de alimentos.

Los acinos son las estructuras en las que se realiza la incorporación de agua y se sintetizan y secretan la mayoría de los componentes de la saliva. La saliva primaria, en su paso hacia la cavidad bucal, sufre la reabsorción activa de Cl^- y Na^+ y la secreción de bicarbonato (HCO_3^-) y K^+ (Melvin JE y cols., 2005) (figura 1.8). En condiciones basales de secreción, la saliva definitiva es hipoosmótica con respecto a la acinar, que es isosmótica con respecto al plasma. Cuando el volumen de secreción aumenta como consecuencia de estímulos, la mayor velocidad de pasaje reduce la posibilidad de reabsorción iónica en los conductos y tanto la osmolaridad final como la composición se asemejan a la de la saliva primaria.

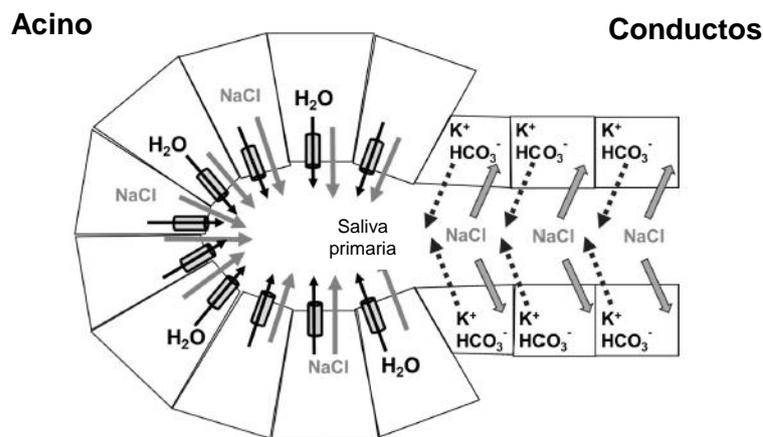


Figura 1.8. Formación de la saliva primaria y secundaria.

Las funciones de la saliva dependen de la variada composición de la misma y pueden clasificarse como se describe a continuación:

1) Digestión: las células serosas y seromucosas de las GSM y parótida secretan amilasa salival, necesaria para iniciar la digestión de hidratos de carbono, y las glándulas menores linguales de Von Ebner secretan la lipasa lingual, esencial para la digestión de las grasas principalmente en lactantes.

2) Mantenimiento de la integridad de la mucosa: además del agua y las mucinas, colaboran en esta función diversos factores de crecimiento, especialmente el factor de crecimiento epidérmico (EGF) secretado por las glándulas mayores (Gutiérrez Nova P y cols., 2008).

3) Capacidad buffer y mineralización: el sistema bicarbonato/ácido carbónico constituye el principal sistema amortiguador salival responsable del mantenimiento del pH salival.

4) Acción antibacteriana: gracias a la acción de barrido y a la presencia de sustancias como la lisozima A, la IgA secretoria, las peroxidasas y la lactoferrina o muramidasa (Plagmann HC y cols., 1973).

5) Gusto: el agua posibilita la disolución de sustancias para diferenciar los sabores por parte de los receptores gustativos.

6) Fonación: por la acción lubricante del agua.

7) Absorción de sustancias: ciertas sustancias pueden ser absorbidas por vía sublingual gracias a la presencia de agua en la saliva

1.4.3 Rol de la GSM como moduladora neuroinmunoendócrina

Existe evidencia experimental que atribuye a la GSM no sólo un rol exocrino sino también una función endócrina, ya que sintetiza y secreta al torrente sanguíneo diversos péptidos y factores de crecimiento, tales como: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y calicreínas (Tsukinoki K & Saruta J, 2012, Young WG y cols., 2004). Además de las mencionadas sustancias, se ha reportado que las GSM producen hormonas como la insulina, glucagón, leptina y ghrelina (Egέα JC y cols., 2000, Pérez-Castillo A & Blazquez E, 1980). También se la vincula experimentalmente con la función reproductiva en animales de laboratorio, ya que su ablación se ha relacionado con la disminución de los niveles de hormona luteinizante en plasma, cambios en las células de Leydig testiculares y aborto espontáneo (Boyer R y cols., 1990).

En relación con su participación en la función inmunológica, estudios indican que la GSM de roedores puede estimular la proliferación de linfocitos, alterando el peso del timo, bazo y ganglios linfáticos (Sabadini E & Berzi I, 1995; Zelles T y cols.,

1995, Yao C y cols., 2005). Además, mediante sus productos de secreción regula la respuesta inmunoinflamatoria y participa en la reparación de las heridas, ya que se ha observado la liberación en el sitio de lesión de EGF luego de cirugías intraorales (Oxford GE y cols., 1999). También debe mencionarse que mediante transporte axónico retrógrado, el NGF viaja desde la GSM al ganglio cervical superior donde participa en la síntesis de noradrenalina, neurotransmisor que regulará a su vez a otros órganos a nivel sistémico.

En resumen, existe abundante evidencia que indica que la GSM es una glándula mixta con funciones exocrinas y endocrinas, similar a lo que sucede en los extremos inferiores del sistema digestivo (estómago, duodeno, hígado y páncreas). Su concepción como regulador neuroinmunoendocrino ha cambiado su visión como una estructura anexa al sistema digestivo y refuerza el concepto de que la misma no sólo actúa a nivel local en la cavidad bucal, sino que también es una fuente de factores que actúan a nivel sistémico.

1.4.4 Regulación de la secreción salival

El volumen diario de secreción salival en el humano oscila entre los 600 y 1500 ml. En reposo y ante la ausencia de estímulos, el volumen producido ronda entre 0,25 y 0,35 ml/minuto, mientras que frente a estimulación este volumen puede alcanzar los 7 ml/minuto (Syrjala AM y cols., 2011). Así mismo, existe un ritmo circadiano de salivación, con flujo máximo en las comidas y niveles basales durante el sueño.

La secreción salival es predominantemente una respuesta nerviosa refleja que se inicia a partir de estímulos. Éstos pueden ser muy variados y se pueden clasificar en mecánicos (masticación, alimentos o instrumentos odontológicos), físicos (calor, frío, sequedad bucal), químicos (olfato, sensación gustativa, ácidos, azúcares, sustancias amargas), extrabucales (distensión del estómago, náuseas, acidosis, etc.) y psíquicos (reflejos condicionados). Los diferentes estímulos pueden promover la secreción salival actuando sobre receptores gustativos de la lengua, exteroceptores de la mucosa bucal, epiglotis y faringe y propioceptores del periodonto, articulaciones temporomandibulares y músculos mandibulares.

Las glándulas salivales están inervadas por el sistema nervioso autónomo (SNA) y a diferencia de otras glándulas exocrinas, tanto la estimulación simpática noradrenérgica como parasimpática colinérgica induce respuesta secretoria y cuando se interrumpe, cesa casi completamente la secreción. La saliva secretada frente a estímulos simpáticos es viscosa, con escasa cantidad de electrolitos y agua, mientras

que la saliva parasimpática es abundante, rica en electrolitos como K^+ y HCO_3^- y de secreción sostenida. Además de los neurotransmisores principales de las vías simpáticas y parasimpáticas, han sido descritos otros agonistas con acción secretagoga como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P y el neuropeptido Y (Lomniczi A y cols., 1998). Sus efectos no parecen ser independientes, sino que poseerían acciones cruzadas con las vías mencionadas anteriormente. A nivel experimental, la pilocarpina y la metacolina son las sustancias más utilizadas para inducir salivación estimulando los receptores muscarínicos glandulares (Urita Y y cols., 2009).

1.4.5 Rol de las acuaporinas en la secreción salival

Las acuaporinas (AQP) son una familia de proteínas transmembrana que funcionan como canales permeables al agua, además de ser permeables a otros pequeños solutos, como cationes, glicerol y ciertos gases (Verkman AS, 2005). Hasta el momento, se han identificado 11 tipos de AQP, denominándose AQP-0 hasta AQP-10. Las mismas se clasifican según su permeabilidad en AQP clásicas (permeables a agua y gases), acuaglicerolporinas (permeable a agua, glicerol y otros solutos) y AQP no clásicas (permeabilidad incierta al agua y al glicerol). Son permeables al agua en el orden de $3 \cdot 10^9$ moléculas de agua por segundo. Las diferentes AQP se expresan selectivamente en la membrana celular de casi todos los tejidos, como por ejemplo el cristalino, túbulos renales y el asa de Henle, cerebro, glándulas de secreción exocrina, bronquios y lecho endotelial pulmonar, piel, etc. (Takata K y cols., 2004). Estas moléculas pueden ser reguladas por diversos factores intracelulares, entre los cuales son fundamentales el pH y la fosforilación mediada por proteína quinasa A.

En el caso particular de las glándulas salivales, se ha demostrado la expresión de AQP-1, AQP-3 y AQP-5 durante el desarrollo pre y post-natal en GSM de ratas. Entre las mencionadas AQP, la AQP-5 es considerada como la que cumple un rol fundamental en la secreción salival (Hosoi K, 2016). Ha sido localizada en la membrana apical de los acinos serosos y en los conductos intercalares, siendo su localización en los acinos mucosos controversial (Delporte C y cols., 2016) (Figura 1.9).

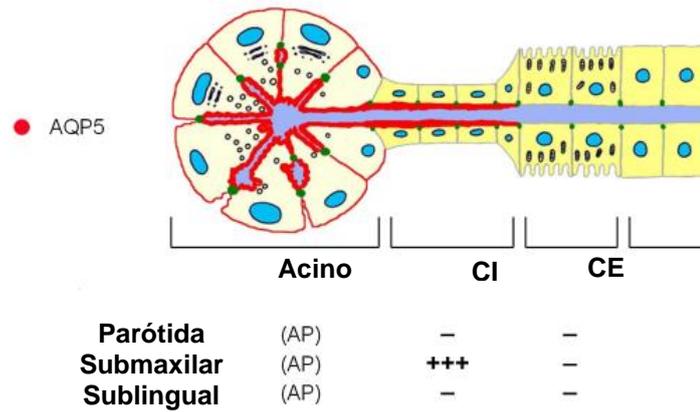


Figura 1.9. Distribución de AQP-5 en las glándulas salivales. La expresión se clasifica en negativa (-) y positiva (+). CI: conducto intercalado, CE: conducto estriado. Modificado de Matsuzaki et al., 2012

La AQP-5 es responsable de controlar el pasaje de agua que ocurre durante el primer paso de la secreción salival. Durante el mismo, las células acinares secretan NaCl, responsable de generar un gradiente osmótico transepitelial que induce el pasaje de agua a través de la AQP-5 y también de forma paracelular, creando la saliva primaria. Adicionalmente, esta molécula podría actuar como un osmorreceptor que controla la tonicidad del fluido transportado (Hill AE & Shachar-Hill B, 2006).

La expresión alterada de la AQP-5 ha sido identificada en GSM de pacientes con xerostomía, por lo que ha sido considerada como una posible causa de hipofunción salival en la enfermedad de Sjögren, durante la terapia radiante y en la senescencia.

1.4.6 Hipofunción salival

Se define como hiposalivación, hipofunción o hiposialia a la disminución del flujo salival producido por las glándulas salivales mayores y menores. El término hiposalivación puede ser diferenciado del de xerostomía, que es la sensación subjetiva de boca seca. Se considera hiposalivación a la situación en la que el flujo salival no estimulado es igual o menor a 0,1 ml/min y el estimulado es igual o menor a 0,5-0,7 ml/min en humanos (Dodds MW y cols., 2005). Los factores capaces de afectar la secreción salival son muy variados y pueden ser clasificados en sistémicos y locales. Dentro de los primeros se pueden mencionar: la edad, enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren, la artritis reumatoidea, el HIV, el uso de medicamentos anticolinérgicos como antidepresivos tricíclicos, tranquilizantes y antiparkinsonianos y la radioterapia de cabeza y cuello. Entre los factores locales se encuentran infecciones

bacterianas o virales, obstrucciones por sialolitos, tumores benignos o carcinomas (Yayla EM y cols., 2015, Schully C, 2003).

El incremento de la expectativa de vida y el aumento del consumo de fármacos han llevado a una mayor incidencia de hipofunción salival, con las consecuentes afecciones en la cavidad oral: aumento de la incidencia de caries, gingivitis, candidiasis, desecamiento de labios, erosión y ulceración de mucosas, disgeusia, disfagia, halitosis, imposibilidad para usar prótesis removible, sensación de ardor bucal y cambios en la calidad de la voz (Pinna R y cols., 2015, Pringle S y cols., 2013).

En el campo experimental, se ha relacionado la disminución de la respuesta secretora de las GSM en ratas con un incremento de marcadores inflamatorios tales como ON y PGE₂ en dicho órgano. La hiposalivación pudo prevenirse tratando a los animales con inhibidores de la síntesis de prostaglandinas (Lomniczi A y cols., 2001), sugiriendo una vinculación entre los procesos inflamatorios glandulares y la secreción salival.

1.5 Hipoxia ambiental

La hipoxia hipobárica (HX) puede definirse como un descenso de la presión barométrica con la consecuente disminución de la presión parcial de O₂ (pO₂) en la atmósfera (Muthuraju S & Pati S, 2014). En la tabla 1 puede observarse el descenso de la presión atmosférica a medida que se asciende sobre el nivel del mar. A modo de ejemplo, podemos decir que a nivel del mar, la presión atmosférica es de 760 Torr. A los 1.000 m, ya es de 674 Torr y a los 4.000 m, de 462 Torr. Dado que la concentración de oxígeno sigue siendo aproximadamente igual, la presión parcial de este gas desciende considerablemente, y por lo tanto, la presión parcial en el aire alveolar también lo hace. En consecuencia, la saturación de la hemoglobina sanguínea, el contenido de oxígeno y su transporte también se ven afectados, comprometiendo el suministro de O₂ a los tejidos, situación que fisiológicamente se conoce como hipoxia hipóxica. La HX no determina que existan menos eritrocitos para transportar el O₂ desde los pulmones a los tejidos, sino que el O₂ que debe transportarse es insuficiente en el aire inspirado. En caso de exposiciones durante cortos periodos de tiempo (horas o días) a alturas superiores a 2400 msnm, comienza a desarrollarse en el organismo una respuesta aguda que depende de 4 factores: a) altura alcanzada, b) velocidad de ascenso, c) susceptibilidad individual y d) requerimientos físicos y ambientales durante el ascenso (Farias JG y cols., 2013).

Altitud (m)	bar	Torr	PiO ₂	PaO ₂
0	1013	760	159,61	99,73
500	954	716	150,36	90,49
2500	746	560	117,61	57,73
4000	616	462	97,02	37,15
5000	540	405	85,05	25,18
7000	382	287	60,27	0,4

Tabla 1. Descenso de la presión barométrica conforme se asciende. Los cálculos han sido efectuados en condiciones ideales suponiendo un mantenimiento de la densidad del aire hasta las alturas reflejadas, y calculando la presión parcial del oxígeno alveolar mediante la ecuación del gas alveolar. La hiperventilación modifica los parámetros de la ecuación y es uno de los mecanismos con los que cuenta el organismo para lograr la aclimatación. PiO₂: presión parcial de oxígeno inspirado; PaO₂: presión parcial de oxígeno en la sangre arterial.

Existen en la actualidad más de 140 millones de personas que habitan en condiciones de HX, representando un 2% de la población mundial. Las principales poblaciones que residen a gran altitud lo hacen principalmente en 3 zonas geográficas: el norte de África (Etiopía), la región del Himalaya en Asia y la región andina de América del Sur (Arestegui AH y cols., 2011). Se considera que las mencionadas poblaciones, las cuales habitan durante varias generaciones en zonas de gran altitud, viven en condiciones de hipoxia crónica continua (HCC; Farias JG y cols., 2013). Sin embargo, durante los últimos años, el desarrollo de la minería y otras actividades laborales en zonas de gran altura han determinado que exista otro tipo de exposición a HX. Es el caso de individuos que ascienden a grandes altitudes para ejercer sus actividades laborales y descienden nuevamente a zonas a nivel del mar por distintos períodos de tiempo para descansar, lo que en términos biomédicos se conoce como hipoxia crónica intermitente (HCI, Siques P y cols., 2014). A diferencia de la HCC, los mecanismos fisiológicos de adaptación a la HCI no están aún bien caracterizados (López V y cols., 2009).

1.5.1 El desafío fisiológico de la altura

La exposición HX constituye un estímulo estresante para el organismo, por lo tanto, este debe desarrollar respuestas que le permitan hacer frente a las exigencias

del ambiente. Existen dos tipos de respuesta que puede desarrollar un individuo sometido a HX:

1) la adaptación, que se da a nivel genético y ha ocurrido principalmente en aves y mamíferos. En el ser humano sólo se ha evidenciado en el caso de los sherpas tibetanos, cuyos antepasados se radicaron en territorio nepalí hace unos 25.000 años. La adaptación persiste aunque el individuo cambie a un ambiente de menor altitud (Kayser B & Marconi C, 1994).

2) La aclimatación, que involucra una serie de mecanismos adaptativos a nivel fenotípico, se da en humanos y animales que viven en zonas a nivel del mar y luego ascienden a la altura (Storz JF y cols., 2010.) Durante la misma, los sistemas quimiorreceptores conjuntamente con el músculo liso vascular actúan coordinadamente para modular rápidamente la ventilación pulmonar y la circulación sanguínea con el objetivo de optimizar la llegada de O₂ a los tejidos (Michiels C, 2004). El desarrollo de la aclimatación en el organismo lleva un tiempo, tiene límites y desaparece cuando el individuo desciende a menor altitud.

Exceptuando a los sherpas tibetanos, el resto de los seres humanos expuestos a HX desarrolla una serie de modificaciones a nivel cardiovascular, respiratorio, hematológico, metabólico y neurológico para hacer frente a la exposición a HX. En una primera instancia de ascenso, el sistema cardiovascular responde aumentando el débito cardíaco y la frecuencia cardíaca. A largo plazo, se produce una remodelación cardíaca, que lleva a un débito y frecuencia cardíaca con valores menores comparados con los de individuos que habitan en normoxia (NX) y a una menor presión arterial (Klausen K y cols., 1966). A nivel respiratorio, la respuesta más inmediata es una hiperventilación con alcalosis respiratoria, ocasionada por el descenso de la pO₂. Una vez iniciado, este "impulso hipóxico" aumenta durante las primeras semanas, y puede ser evidente todavía incluso un año después de una permanencia prolongada en la altitud elevada. Dentro de las modificaciones hematológicas, podemos destacar el aumento de la secreción de eritropoyetina al cabo de pocas horas del ascenso (Abbredcht PH, 1972) y el del hematocrito y hemoglobina al cabo de 5-7 días.

Estos eventos de aclimatación cambian entre los individuos expuestos a HCC o HCl, principalmente debido a las diferentes vías de señalización que se activan como respuesta a los bajos niveles de O₂ (Siques y cols., 2014). Hay autores que establecen que la exposición intermitente a HX puede considerarse un estímulo

patológico que no evocaría una respuesta de aclimatación, sino una respuesta maladaptativa por exceso de estrés oxidativo celular (Prabhakar NR y Semenza GL, 2012).

A nivel celular se desarrolla una serie de eventos moleculares que intentan proteger a la célula durante el estímulo hipóxico. En este contexto, son los factores inducibles por hipoxia (HIF) quienes coordinan las respuestas celulares a la HX (Semenza GL y cols., 2012). HIF-1 es un heterodímero compuesto por HIF-1 α y HIF-1 β que se transloca al núcleo y que, asociado a otras proteínas, inicia la transcripción de un gran número de genes en respuesta a la HX (Semenza GL, 2004). HIF-1 α se expresa constitutivamente en la célula pero en condiciones de normoxia es rápidamente hidroxilado en los residuos de prolina por prolyl-hidroxilasas, marcándolo para su degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma. Cuando la concentración de O₂ disminuye, HIF-1 α no es degradado, permitiendo la formación del heterodímero y su unión a los elementos de respuesta a hipoxia en los promotores de numerosos genes, lo que activa una respuesta sistémica que coordina la glucólisis, eritropoyesis, angiogénesis y apoptosis (Figura 1.10). Es por lo antedicho que el HIF-1 α cumple un rol crítico como sensor celular de O₂ y regulador de la respuesta adaptativa celular a la HX (Nallamshetty S y cols., 2013).

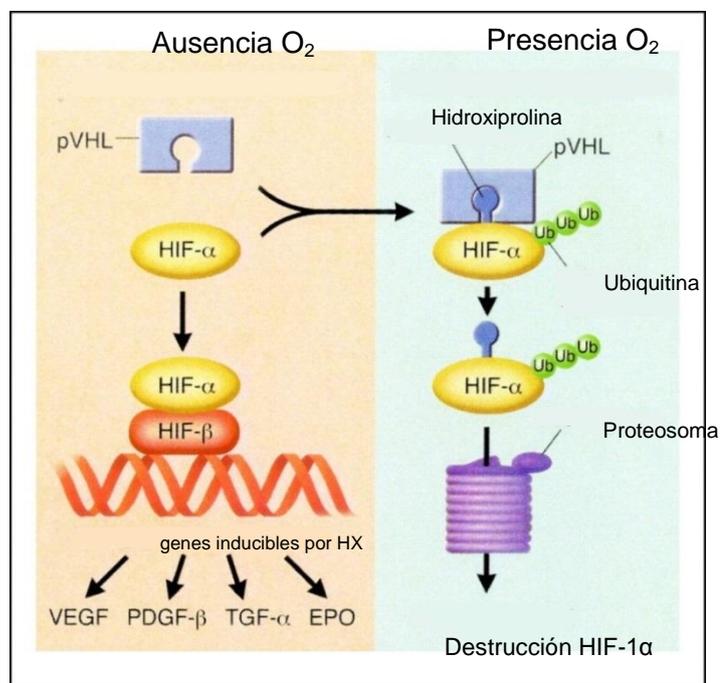


Figura 1.10. HIF durante hipoxia y normoxia. Modificado de flipper.diff.org

Existe además una regulación O_2 -independiente del HIF. En cultivos de células humanas de cáncer de próstata, se ha observado una activación de HIF-1 α en respuesta a distintas proteínas de varias cascadas de señalización intracelular, tales como la proteína quinasa B, MAP kinasas y la fosfatidil-inositol-3 quinasa. Además se ha establecido que las PGs, el ON y otros pequeños metabolitos como el lactato aumentan la expresión de HIF-1 α en situaciones no hipóxicas, actuando a través de diferentes vías intracelulares (Prabhakar NR y Semenza GL, 2012).

1.5.2 Hipoxia y estrés oxidativo

Se definen como ROS a especies químicas derivadas del O_2 que pueden ser radicales libres, tales como el anión superóxido (O_2^-) o el radical hidroxilo (HO^*) o moléculas que pueden actuar como oxidantes, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Concentraciones moderadas de las mencionadas especies son beneficiosas para la célula ya que participan en la señalización celular contra infecciones, en el control del tono vascular, la ventilación y la producción de eritropoyetina. En cambio, la producción excesiva de ROS induce efectos deletéreos mediante la generación de estrés oxidativo (Farias JG y cols., 2013).

Se ha demostrado que la exposición a HX aumenta el estrés oxidativo celular con el consecuente daño a lípidos, proteínas y ADN (Baily DM & Davies B, 2001; Magalhaes J y cols., 2005). El grado de estrés oxidativo parece estar correlacionado con la altitud alcanzada y con la producción de ROS (Dosek A y cols., 2007). En condiciones de HX, la menor disponibilidad de O_2 para ser reducido a H_2O durante la respiración celular produce la acumulación de electrones que producen una mayor formación de O_2^- , H_2O_2 y OH^* (Maiti P y cols., 2006) en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial. Además de la producción de ROS bajo condiciones de HX, también se ha reportado la alteración de los sistemas antioxidantes, evidenciando menor actividad de enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa y glutatión peroxidasa.

1.6 Mitocondrias y su rol como sensores de O_2

Las mitocondrias son organelas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. Son consideradas la “central energética celular”, ya que producen el

adenosín- trifosfato (ATP), fuente de energía química celular. Además de la mencionada función energética, las mitocondrias están involucradas en la señalización celular, en el control de mecanismos de diferenciación y muerte, en la regulación del ciclo celular y el crecimiento (Mc Bride HM y cols., 2006). Las mitocondrias se componen de una membrana externa que rodea completamente una membrana interna, quedando confinado en el centro un espacio intermembrana (figura 1.11). La membrana externa posee poros que permiten el pasaje de iones y moléculas. En contraste, la membrana interna es mucho más impermeable y contiene proteínas involucradas en el transporte de electrones y en la síntesis de ATP. Al final de la cadena de electrones, el O_2 actúa como aceptor final de los mismos, formando agua y produciendo ATP.

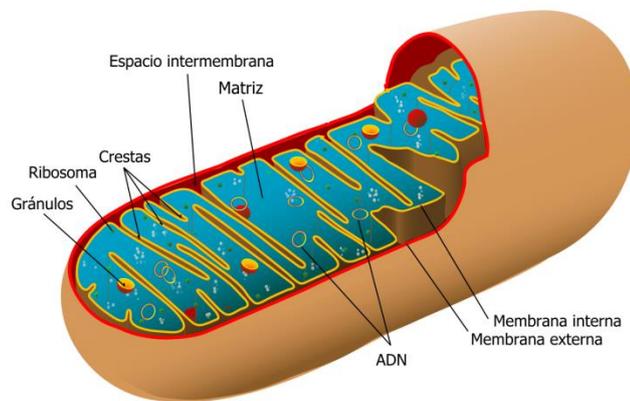


Figura 1.11. Estructura básica de una mitocondria. <http://bnj.gcrn.org.uk/>

La cadena de transporte de electrones está compuesta por proteínas que funcionan como dadores y aceptores de electrones. Cada electrón pasa a un aceptor más electronegativo, siendo el O_2 el último de ellos (figura 1.12). El pasaje de electrones libera energía que es utilizada para crear un gradiente de protones (H^+) a través de la membrana mitocondrial debido al bombeo activo de los mismos a la matriz. Esta energía potencial almacenada en el gradiente electroquímico de H^+ es la que es utilizada para sintetizar ATP a partir de ADP (Lehninger AL y cols., 2004).

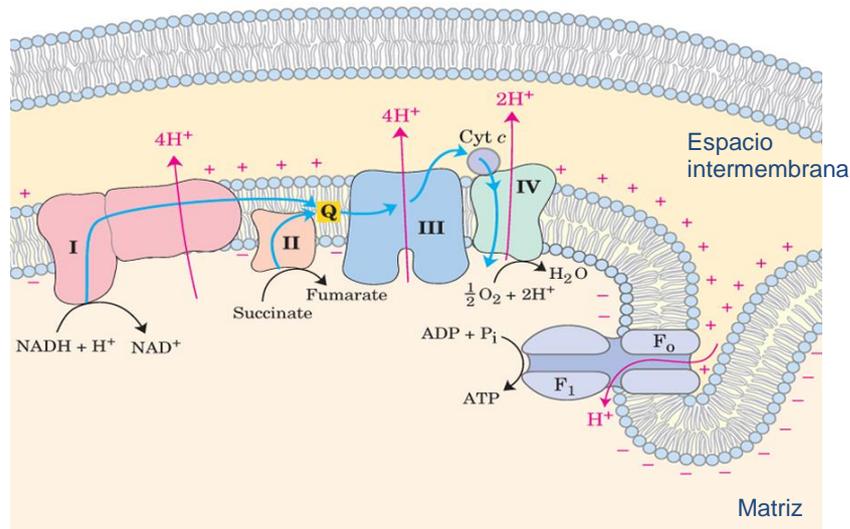


Figura 1.12. La cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa www.bioinfo.org

La cadena respiratoria está formada por 5 complejos:

- complejo I o NADH deshidrogenasa que utiliza el NADH como sustrato,
- complejo II o succinato deshidrogenasa, quien no origina bombeo de protones y como resultado contribuye con menos energía al proceso general,
- complejo III o citocromo b-c¹I,
- complejo IV o citocromo oxidasa, en donde 4 electrones son removidos del citocromo c y transferidos al O₂ formando 2 moléculas de H₂O,
- complejo V o ATP sintasa.

De acuerdo a la teoría quimiosmótica de Peter Mitchell (1961), el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa son procesos acoplados, ya que la mitocondria utiliza la energía del potencial electroquímico producido por el bombeo de H⁺ hacia el espacio intermembrana para producir ATP. Dado que la mitocondria representa el paso celular final de interacción con el O₂ ambiental, estas organelas funcionan como sensores del mismo (Czerniczyniec A y cols., 2015).

Ha sido demostrado que la respiración celular produce H₂O₂ (Chance B y cols., 1979), molécula que surge de la dismutación del O₂⁻, una especie altamente reactiva que contribuye al estrés oxidativo. Los complejos I y III son los dos sitios de la cadena respiratoria con mayor producción de O₂⁻ (Seo BB y cols., 2006). En condiciones de HX, las mitocondrias liberan H₂O₂ que inhibe la actividad de la prolil-hidroxilasa, con la consecuente activación de HIF-1 α (Chandel NS y cols., 1998).

1.6.1 Utilización de oxígeno mitocondrial durante la exposición a HX

La utilización tisular de O₂ por las mitocondrias se ve alterada de diversas maneras durante la aclimatación a HX. La reducción del tamaño celular y el menor número de mitocondrias llevan a una reducción de la capacidad metabólica de los tejidos (Hoppeler H & Vogt M, 2001). La menor capacidad mitocondrial induce un cambio en la forma de obtención de energía celular, favoreciendo la oxidación de hidratos de carbono para reducir el requerimiento de O₂ en un 12-14%. En ciertos casos, la exposición a HX puede mejorar la eficiencia de la utilización de O₂ (por ejemplo, ADP/O₂ consumido), pero generalmente la función mitocondrial en condiciones de HX se mantiene o disminuye (Essop MF, 2007).

En el campo experimental, se ha analizado el proceso de aclimatación a HX en mitocondrias de diferentes órganos. Se han encontrado mayores niveles de ON en mitocondrias de cardiomiocitos de roedores expuestos a HX con respecto a roedores normóxicos, sugiriendo que dicha molécula contribuiría al proceso de adaptación celular (Zaobornyj T y cols., 2009). Además, existen estudios que indican que animales expuestos a un mayor período de exposición a HX (7 meses vs. 1 mes) desarrollarían mejores parámetros bioenergéticos mitocondriales comparados con animales normóxicos, lo cual sugiere que la aclimatación a HX es tiempo-dependiente (Czerniczyniec A y cols., 2015). En humanos expuestos a 4590 m de altura, se ha evidenciado un aumento en la actividad del complejo IV y una mayor masa mitocondrial (Merz TM y cols., 2015).

En el campo de la biología bucal la información acerca de la función mitocondrial en condiciones de HX es escasa, en especial en lo concerniente a las mitocondrias glandulares, por lo que no queda claro si un mecanismo de aclimatación bioenergética se lleva a cabo cuando existen bajos niveles de O₂ ambiental.

1.7 Antecedentes tomados en cuenta para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral

A pesar de que los efectos de la exposición a HX en el organismo han sido extensivamente estudiados y descritos, el rol de la misma en el ecosistema oral no es aún claro. Muchos autores han reportado los efectos de la HX en animales y humanos,

pero existe en la literatura disparidad entre las condiciones experimentales, lo que dificulta sacar conclusiones acerca de los efectos de los bajos niveles de O₂ sobre los tejidos orales. Adicionalmente, la altitud a la que los animales de algunos de los mencionados experimentos han sido expuestos excede la altura a la que normalmente habitan las poblaciones humanas o animales.

Es el campo de la biología periodontal el que mayores contribuciones ha recibido con respecto a los efectos de la HX en los tejidos orales, probablemente porque la P es una afección de alta incidencia en la cavidad bucal. En estudios en ratas expuestas continuamente a una altura simulada de 4500 m y sometidas a PE, Xiao X y cols., 2012 han reportado una mayor diversidad bacteriana en el fluido crevicular, lo que derivó en un aumento de la movilidad dental y del índice gingival en los animales hipóxicos al cabo de 8 semanas. Choi CH y cols. comunicaron en 2012 que ciertos patógenos periodontales, tales como la *Porphyromona gingivalis*, han desarrollado mecanismos contra las ROS cuando se los somete a bajos niveles de O₂. Estas ROS son consideradas activadoras de metaloproteinasas (MMP), responsables de la degradación colágena periodontal y resorción ósea, dos características indiscutibles de la enfermedad periodontal (Kim K y cols., 2013). Los autores están de acuerdo en que la HX parecería ser responsable de la regulación de varios mediadores inflamatorios que cumplen un papel importante durante el desarrollo de la P. En este contexto, Jian C y cols., 2014 encontraron un aumento de ON, TNF α y PGE₂ en un cultivo de células del ligamento periodontal sometido a HX y estimulado con LPS bacteriano. Resultados similares pero utilizando un modelo de ratas expuestas a 5000 m de altura simulada fueron reportados por Zhang G y cols., 2013. Además, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado un aumento de PGE₂ y mayor actividad de la iNOS en tejido gingival de ratas en crecimiento expuestas a 506 mbar (aproximadamente 5500 m) de forma intermitente (Terrizzi AR y cols., 2013). Estos mayores niveles de mediadores inflamatorios se correlacionaron en el mismo modelo experimental con una mayor pérdida ósea alveolar y aumento en la altura del ligamento periodontal. Todos estos estudios sugieren una vinculación entre la exposición a HX y la alteración de la salud periodontal. Sin embargo, no existen en la bibliografía trabajos que abarquen el estudio del tejido periodontal en las dos modalidades de exposición a HX (HCI y HCC) en altitudes en las que habitualmente se desarrolla la vida en la altura.

Al contrario de lo que sucede con el campo periodontal, los estudios llevados a cabo en glándulas salivales son escasos. Scott J y Gradwell E observaron en 1989 cambios hiperémicos en las GSM y parótidas de ratas expuestas a 5500 metros de altitud sin alteraciones del parénquima de dichos órganos. En 1995, Elverdin JC y cols.

reportaron una menor secreción salival en ratas expuestas a HX. Sin embargo, dicho estudio fue llevado a cabo con altitudes similares a 7000 metros, donde no se encuentran asentamientos humanos permanentes. Estudios en humanos expuestos durante 2 días a 4350 m (hipoxia aguda) han reflejado un aumento del flujo salival y una disminución de la concentración de potasio salival (Pilardeau P y cols., 1990). Teniendo en cuenta lo antedicho, no existen estudios en la literatura que describan la fisiología de las GSM en condiciones de HX crónica compatibles con la vida humana.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La disminución del O₂ ambiental durante la exposición a la HX actúa como un estímulo estresante, originando alteraciones en el hueso mandibular, tejidos periodontales y glándulas submaxilares que llevarían a una merma de su función biológica. Los tejidos orales mencionados son capaces de aclimatarse durante la exposición crónica a la HX, pero esta respuesta puede variar dependiendo de si la exposición es continua o intermitente.

2.2 Objetivo general:

Estudiar los efectos de la exposición crónica a hipoxia ambiental sobre los tejidos orales de ratas en crecimiento y adultas, utilizando dos modelos de exposición crónica a HX, uno continuo y otro intermitente.

2.3 Objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario en animales en crecimiento
- 2) Estudiar el efecto de la HX sobre los tejidos de soporte dentario y las GSM de ratas adultas
- 3) Analizar los efectos de la HX sobre los tejidos de soporte dentario en ratas adultas sometidas a periodontitis experimental

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1 Animales

Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar hembras provenientes del bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los pesos iniciales de los animales fueron de 50-56 g para las ratas en crecimiento post-destete y 200-220 g para las ratas adultas de 2 meses de edad. Se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable, en ambiente con foto-períodos de luz-oscuridad de 12 hs y bajo temperatura y humedad controladas (22-25°C y 56% respectivamente). Se alimentaron con dieta estándar para roedores y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados teniendo en cuenta los principios del National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 8th Edition, National Academy Press, Washington DC, USA, 2011) y aprobados por el CICUAL de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires (Nº 11/06/2012-23).

3.2. Determinación de peso y talla

Los animales fueron pesados en una balanza electrónica digital de laboratorio, obteniéndose un registro expresado en gramos. Los pesajes se realizaron semanalmente en el caso de los animales en crecimiento, y al inicio y fin del período experimental en las ratas adultas.

Las GSM se pesaron en una balanza digital inmediatamente después de haber extraído el órgano y de haber removido la glándula sublingual. El peso se registró en mg.

La longitud corporal de los animales post destete se efectuó semanalmente. La longitud se determinó con una regla milimetrada midiéndose desde la punta de la nariz hasta los últimos pelos de la base de la cola, y desde allí hasta la punta de la cola. La longitud corporal se expresó en cm.

3.3 Diseño experimental

Durante las diferentes experiencias de este trabajo de tesis, los animales se dividieron en 3 grupos de n=15 cada uno según: Grupo 1: Control (C); Grupo 2: Hipoxia crónica intermitente (HCI) y grupo 3: Hipoxia crónica continua (HCC). Los animales fueron expuestos a HX mantenidos en una cámara de altura simulada de 4200 m sobre el nivel del mar, a una presión de 600 mbar (Wright BM, 1964) según:

- **HCI:** expuestas durante 18 hs/día de lunes a viernes, permaneciendo en condiciones de normoxia los fines de semana. (Conti MI y cols., 2012).
- **HCC:** expuestas 23.5 horas/día, siendo retiradas de la cámara sólo para administrarles alimento, agua, cambiar las jaulas y realizar las maniobras experimentales. Los fines de semana permanecieron en HX. (Bozzini C y cols., 2009).

En todas las experiencias realizadas con animales al destete, el período experimental fue de 3 meses. En el caso de los animales adultos, para poner a punto el modelo experimental, se realizaron experiencias con exposición a HX durante 1 mes y 3 meses, con el fin de identificar el tiempo mínimo de exposición luego del cual se evidencian cambios a nivel óseo. Además, se quiso identificar si existen efectos deletéreos de la HX en etapas tempranas de la exposición, que luego de 3 meses podrían no evidenciarse debido a procesos de aclimatación.

Para los experimentos correspondientes al objetivo 3, se indujo periodontitis experimental (PE) en los animales adultos con el objetivo de evaluar los efectos de la HX en un modelo animal con inducción de P. Dado que la rata presenta muchas similitudes a nivel periodontal con el humano, la inducción de EP en la misma permite utilizarla como modelo *in vivo* para sacar conclusiones acerca del desarrollo, progreso y posibles tratamientos de la P (Hajishengallis G y cols., 2015). Para inducir la EP, 15 días previos a la autopsia (día 75) se anestesió a los animales con 2% de cloruro de xilacina (5mg/kg; i.p.) y 5% de clorhidrato de ketamina (50 mg/kg, i.p.) y se realizó una ligadura con hilo de algodón alrededor del cuello de ambos primeros molares inferiores (Prestifilippo JP y cols., 2012). Si bien las experiencias fueron realizadas utilizando 6 grupos experimentales (C, CPE, HCI, HCIPE, HCC, HCCPE), no se mostrarán en este trabajo los “controles puros” de los experimentos dado que el objetivo fue evaluar el efecto de la HX en animales sometidos a PE y que el

efecto de la inducción de P sobre los tejidos orales ya ha sido previamente descrito (Vacas MI y cols., 2008, Prestifilippo JP y cols., 2012 & 2016, Terrizzi AR y cols., 2013).

Al finalizar el período experimental (30 o 90 días), se realizó la eutanasia de los animales mediante decapitación con guillotina. Se extrajeron ambas hemimandíbulas, encías de alrededor del cuello de los primeros molares inferiores, sangre y ambas glándulas submaxilares para realizar los procedimientos que a continuación se detallan.

3.4 Determinaciones

3.4.1 Hematocrito

Al finalizar el período experimental, se extrajo sangre mediante punción cardíaca para realizar el hematocrito (%) por micrométodo (Conti MI y cols., 2012)

3.4.2 Concentración de CTX-I

Se determinó la concentración sérica de un marcador de resorción ósea, el telopéptido C-terminal de colágeno tipo I, mediante un kit comercial de ELISA (Fine Test, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, China).

3.4.3 Estudios en mandíbula

A. Propiedades Biomecánicas

A.1 Propiedades estructurales

Tanto en los animales en crecimiento como en los adultos, se evaluó la calidad mecánica de la mandíbula integrada como órgano (propiedades estructurales óseas) mediante un test mecánico de flexión a 3 puntos con un equipo Instron 4442 (Instron Corp., Canton, MA, USA). Cada hemimandíbula se colocó en posición horizontal con la cara interna (lingual) hacia arriba, sobre 2 soportes separados por una distancia constante de 11 mm. La carga se aplicó a nivel de la cresta alveolar distal al tercer molar para evitar la influencia de las piezas dentarias (figura 3.1), con una fuerza constante de 50 N a una velocidad de 5 mm/min hasta la fractura.

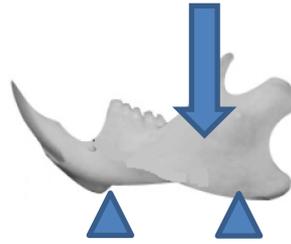


Figura 3.1. Representación del test de flexión a tres puntos, donde se indica el punto de aplicación de la carga en la hemimandíbula.

A partir del registro mecánico se obtuvieron curvas carga/deformación, en las cuales se visualizan los períodos elástico y plástico, separados por el punto de cesión, el cual representa el final del período elástico y el comienzo de la deformación permanente o irreversible con formación de microfracturas que llevan a la fractura de la pieza. A partir de la mencionada curva, se valoraron las siguientes variables representativas de las propiedades mecánicas mandibulares:

- a. Resistencia ósea a la fractura o carga de fractura (W_f ; N) que estima la resistencia del hueso a perder su integridad como órgano,
- b. Resistencia máxima ósea o carga elástica límite (W_y ; N), que determina la capacidad máxima del hueso para resistir elásticamente una carga deformante en flexión,
- c. Rigidez estructural o rigidez extrínseca (W_y/d_y , N/mm), que refleja la resistencia efectiva del hueso entero a ser deformado elásticamente por acción de cargas. Corresponde a la pendiente W_y/d_y de la relación carga/deformación hasta el punto de cesión, donde d_y representa la deformación del hueso en el sector de comportamiento elástico

Todos los parámetros mencionados anteriormente están representados esquemáticamente en la figura 3.2.

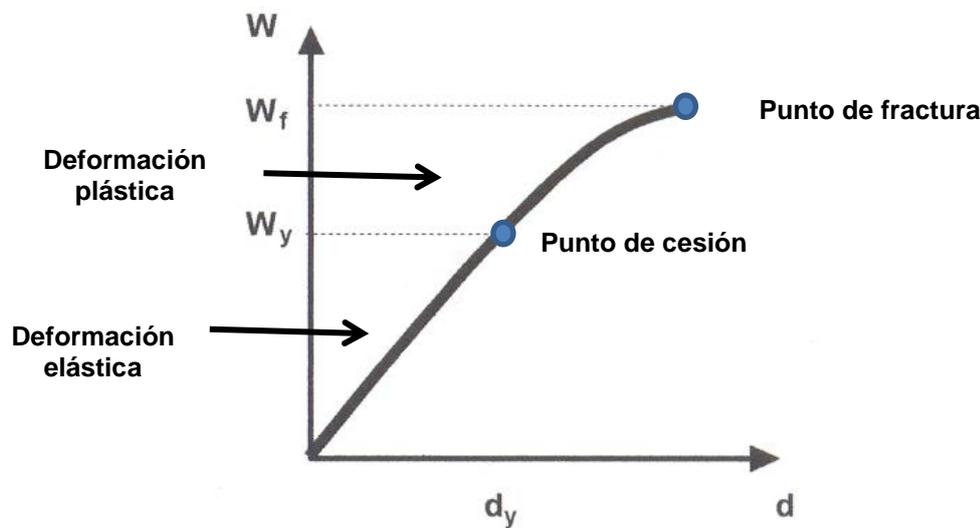


Figura 3.2. Esquema de la curva carga/deformación (W/d) con los parámetros evaluados biomecánicamente. Carga de fractura (W_f), Carga elástica límite (W_y), Deformación elástica (d_y).

A.2 Propiedades geométricas

Luego de la fractura, se utilizó un estéreo microscopio (Stemi DV4, Göttingen, Germany) y un calibre digital (Digimess, Geneva, Switzerland), para analizar las siguientes variables relacionadas con la forma y el tamaño del hueso en la hemimandíbula fracturada:

- a. Sección de área cortical (CSCA) y medular (CSMA), indicadoras de la forma y el tamaño óseos y de la eficiencia de la remodelación ósea,
- b. Momento de inercia (I_z), variable indicadora de la distribución arquitectónica del material en la sección transversal. Describe cuán eficientemente está distribuido el material en el corte, ya que depende de la ubicación periférica del material cortical. A mayor I_z , más alejada se encuentra la cortical de un determinado eje de referencia (Bozzini C y cols., 2013)

A.3 Propiedades materiales

A partir de las propiedades mecánicas y geométricas y utilizando fórmulas matemáticas especialmente adaptadas, pudieron obtenerse las siguientes propiedades materiales (Ferretti JL y cols., 2001), que reflejan la calidad del material óseo:

- a. Módulo de elasticidad o módulo de Young (E , N/mm^2), medida de la rigidez intrínseca del hueso

b. Estrés o estrés elástico límite (N/mm^2), estimador de sufrimiento mecánico hasta el punto de cesión

B. Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar

Una de las hemimandíbulas extraídas se destinó al análisis macroscópico del hueso alveolar mediante el método de la distancia. Para esto, luego de eliminado el tejido blando, las piezas se calentaron en una solución de agua corriente y agua oxigenada en relación 9:1 durante una hora. Se dejaron secar, y posteriormente fueron teñidas con azul de metileno 0,1% (Crawford J y cols., 1978). Con las piezas coloreadas fue posible observar y medir la distancia en mm entre el límite amelocementario (LAC) y la cresta del hueso alveolar (CA), utilizando un calibre digital (Degimess, Geneva, Switzerland) y un estereomicroscopio (Stemi DV4 Stereomicroscope, Carl Zeiss, Germany). Para analizar la pérdida ósea alveolar macroscópica, se realizaron 6 mediciones en cada una de las raíces del primer molar inferior (3 por la cara vestibular y 3 por la cara lingual). Las tres medidas se sumaron a modo de obtener un solo valor numérico representativo de la pérdida ósea de cada cara del primer molar inferior (figura 3.3).

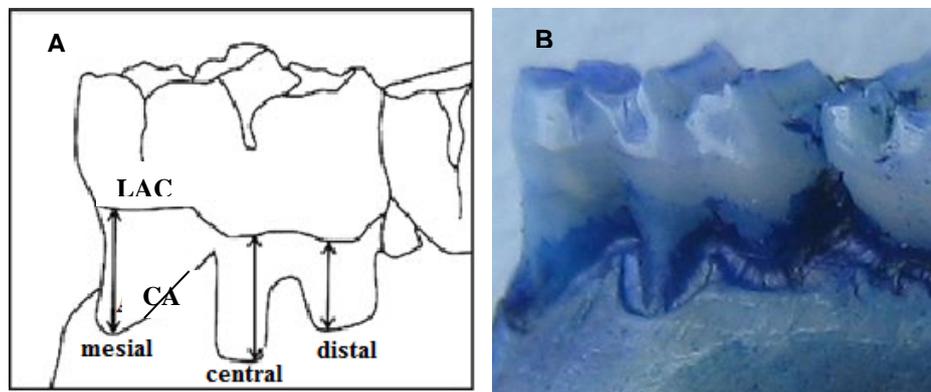


Figura 3.3. **A.** Representación del primer molar inferior con los tres sitios donde se tomaron las mediciones para estimar la pérdida ósea alveolar macroscópica. **B.** Sector del primer molar inferior de una hemimandíbula teñida con azul de metileno. LAC: límite amelocementario, CA: cresta alveolar

C. Análisis histomorfométrico del espacio interradicular

Las hemimandíbulas no utilizadas para los estudios macroscópicos también fueron extraídas inmediatamente luego de la eutanasia y colocadas en formol 10% a temperatura ambiente durante 48 hs para su fijación. Luego, las piezas fueron sometidas al proceso de descalcificación, manteniéndose en EDTA 10% a pH 7.0 durante 45 días. Transcurrido ese tiempo, los huesos fueron deshidratados utilizando concentraciones crecientes de alcohol etílico y clarificados con xilol. El sector correspondiente a los molares inferiores y el hueso mandibular circundante fue incluido en parafina a una temperatura de 56-58 °C. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor orientando los molares en sentido mesio-distal utilizando un micrótopo de rotación (Arcano, Argentina). Posteriormente, se los montó en portaobjetos, y luego de rehidratar los tejidos con concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada, se realizó la coloración con hematoxilina de Carazzi y Eosina (H&E). De cada uno de los cortes histológicos, se obtuvieron imágenes digitales con un microscopio Olympus CX31 (Tokio, Japón) con cámara Infinity 1-2C (Canadá). Las imágenes fueron analizadas morfométricamente utilizando el software Image ProPlus 6.0.

El sector interradicular fue delimitado en su extremo inferior trazando una tangente a nivel de los ápices de la raíz mesial y distal del primer molar inferior (Figura 3.4; A) y en su extremo superior se tomó como límite a la pieza dentaria, en la zona de la furcación radicular (Figura 3.4, B). Con estas imágenes se midieron 3 parámetros estáticos:

- **Pérdida ósea interradicular (VO/VT,%)**, se analizó el volumen óseo trabecular (VO) en relación al volumen óseo total, delimitado por el espacio definido anteriormente (VT), que comprende además del tejido óseo a la médula ósea y al ligamento periodontal.
- **Volumen óseo parcial (VO parcial/VT, %)**, volumen óseo de la sección media superior del hueso interradicular (sector A).
- **Altura del ligamento periodontal (µm)**, trazando 10 segmentos equidistantes entre la cresta alveolar y el cemento radicular en la zona de divergencia de las raíces. La longitud de los segmentos fue medida y se calculó el promedio (Goya JA y col., 2006). (figura 3.4, líneas a-d).

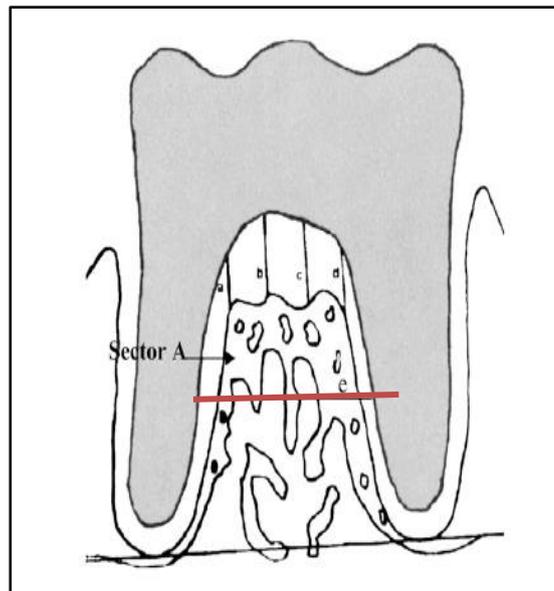


Figura 3.4. Esquema del espacio interradicular del primer molar inferior. Se observa la línea tangencial a las raíces mesial y distal como límite superior y la zona radicular como límite inferior. La línea roja divide a la zona interradicular en un sector superior, correspondiente a la zona oclusal (sector A), y un límite inferior que corresponde a la zona apical. Las líneas a-d representan los segmentos trazados para calcular la altura del ligamento periodontal. Tomado de Vacas MI y cols., 2008.

- **Tejido blando periodontal:** En algunas mandíbulas se conservaron los tejidos blandos peridentarios con el fin de analizar histológicamente la encía, evaluando el estado del epitelio, tejido conectivo y la presencia o ausencia de células inflamatorias.

3.4.5 Secreción salival estimulada

Se realizó la valoración de la secreción salival total estimulada por pilocarpina, un agonista colinérgico de receptores muscarínicos. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con 2% de clorhidrato de xilacina (5mg/kg; i.p.) y 5% de clorhidrato de ketamina (50 mg/kg, i.p.). A continuación, una dosis de pilocarpina (0,5 mg/kg de peso corporal) fue administrada vía intraperitoneal para inducir la salivación, mientras que una torunda de algodón previamente pesada (20 mg) se colocó debajo de la lengua para recolectar la saliva secretada. El peso de saliva acumulada se determinó como la diferencia de peso de la torunda antes y después de la recolección. El procedimiento de recolección de saliva fue realizado a intervalos de 30 minutos luego de la estimulación con pilocarpina, obteniéndose 3 registros: 0-30, 30-60 y 60-90 minutos (Urita Y y cols., 2009). Los animales fueron

mantenidos en decúbito lateral desde la administración de pilocarpina hasta finalizar el ensayo.

3.4.6 Mediadores inflamatorios en encía y GSM

A. Contenido de PGE₂

El tejido gingival fue homogenizado en 500 µl y la GSM en 1 ml de alcohol absoluto en tubos Khan a 4°C y, después de centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue secado en una Speedvac a temperatura ambiente, siendo el pellet remanente guardado a -20°C hasta el análisis por radioinmunoensayo (RIA). Los residuos del tubo fueron luego resuspendidos con buffer fosfato-salino (PBS) 0,01 M pH 7,4 e incubados con 100 µl de antisuero (antiPGE₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 30 min a 4°C como se describió en Mohn C y cols., 2011. Luego se agregó 100 µl de un trazador ³H-PGE₂ (New England Nuclear™ Life Science Product, Boston, MA, USA) que contiene aproximadamente 10.000 cpm/100 µl y la incubación se mantuvo por 60 minutos más a 4°C. Las formas libres y unidas fueron separadas con carbón dextrán (1%:0,1% respectivamente), dejándose reposar 10 minutos a 4°C y luego centrifugándose 15 minutos a 3200 rpm a la misma temperatura. El sobrenadante fue vertido en viales con líquido centellador y la reactividad fue medida en un contador de centelleo líquido. La curva patrón fue lineal de 15-4000 pg de PGE₂ por tubo. La sensibilidad del ensayo fue de 12,5 pg por tubo. Los resultados fueron expresados en pg de PGE₂ por mg de peso húmedo de tejido, dado que el protocolo de extracción de PGE₂ en etanol interfiere con la determinación de proteínas.

B. Actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)

La actividad de la iNOS en encía y GSM fue medida mediante una modificación del método de Bredt D y Snyder S, 1989. Luego de la extracción, los tejidos fueron conservados en tubos Eppendorf a -70°C hasta su determinación (dentro de las 2 semanas subsiguientes). La técnica comenzó con la homogenización de la encía en 500 µl y de una GSM en 600 µl de Hepes 20 mM pH 7,4 en hielo, con EGTA 2mM y DL-ditiotreitol (DTT 1mM). Una vez logrado el homogenato, se agregó NADPH 120 µM y 200.000 dpm de ¹⁴C-arginina a cada tubo, incubándose durante 10 minutos a 37°C en un baño Dubnoff (50 ciclos por minuto, 95%O₂/5%CO₂). Luego, los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron colocados en columnas de intercambio catiónico

que contenían 1 ml de resina Dowex AG W-X8 Na⁺ (BioRad Lab, UK) con el fin de retener la arginina y eluir la citrulina, y lavados con 2,5 ml de agua destilada. Todo el fluido filtrado de cada columna fue contado como actividad de ¹⁴C-citrulina en un contador de centelleo líquido. Dado que la NOS convierte arginina en cantidades equimolares de ON y citrulina, los datos se expresaron como pmol de ON producidos por mg de proteínas.

3.4.7 Caracterización mitocondrial y evaluación del estado REDOX en GSM

Aislamiento de mitocondrias

Inmediatamente luego de la eutanasia, se colocaron ambas GSM en buffer STE (0,07 M sucrosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, pH 7.4) y se procedió a la homogenización del tejido en una relación 1 g tejido/ 9 ml STE. El primer centrifugado se realizó a 700 g durante 10 minutos para descartar núcleos y detritos celulares. En este punto, se separaron 500 µl de homogenato y se almacenaron a -70°C para posteriores determinaciones. Luego se realizaron dos centrifugaciones a 8000 g durante 10 minutos para precipitar las mitocondrias (Valdez LB y cols., 2006). El pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de STE para utilizarlo en los siguientes experimentos:

A. Consumo de oxígeno mitocondrial

Se determinó polarográficamente con un oxígrafo con electrodo de tipo Clark (Hansatech, Norfolk, Inglaterra), utilizando una cámara de medida de 1,5 ml a 30°C (figura 3.5) La muestra mitocondrial (1 mg proteínas) se colocó en un buffer de respiración conteniendo 0.23 M manitol, 0.07 M sucrosa y 20 mM Tris (pH 7.4. Se utilizó 6 mM de malato/glutamato u 8 mM de succinato como sustrato para el complejo I y II respectivamente. El estado 3 se estableció por adición de 200 mM de ADP. El consumo de oxígeno se expresó en ng O/min mg proteína (Boveris A y cols., 1999).

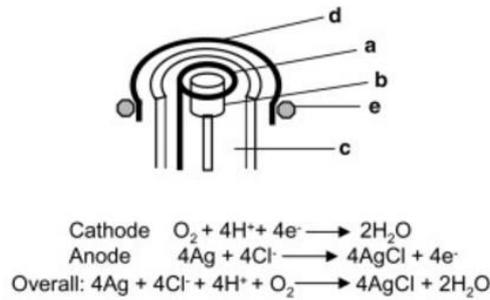


Figura 3.5. Esquema del electrodo tipo Clark. Consiste en un electrodo de platino (a) y un electrodo de referencia Ag/AgCl (b) cubierto por un film saturado en KCl (c) dentro de una membrana (d) sostenida por un anillo de goma (e). Tomado de Diepart C y cols., 2010.

El consumo de oxígeno depende del estado metabólico de las mitocondrias y del tejido del cual son aisladas. En la tabla 3.1 pueden observarse las condiciones generales que afectan la respiración mitocondrial y el estado redox de sus componentes.

Estado	O ₂	ADP	Sustrato	Consumo O ₂	Factor limitante
1	disponible	bajo	bajo	lento	ADP
2	disponible	alto	muy bajo	lento	sustrato
3	disponible	alto	alto	rápido	cadena respiratoria
4	disponible	bajo	alto	lento	ADP
5	no disponible	alto	alto	0	O ₂

Tabla 3.1. Estados metabólicos en la mitocondria. Tomado de Lenhinger AL, 1965

El consumo de oxígeno se midió en estado 4 (respiración de reposo) y en estado 3 (respiración activa o máxima) (Boveris A y cols., 1999). El control respiratorio (CR), considerado el indicador más sensible del acoplamiento durante la fosforilación oxidativa, fue calculado como la relación entre estado 3/estado 4 (figura 3.6).

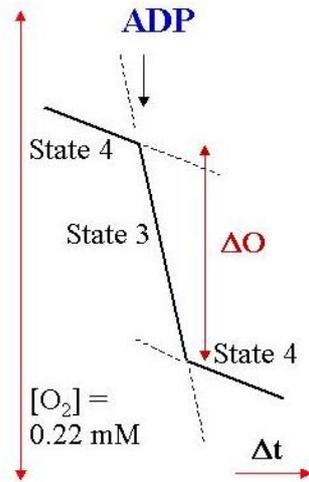
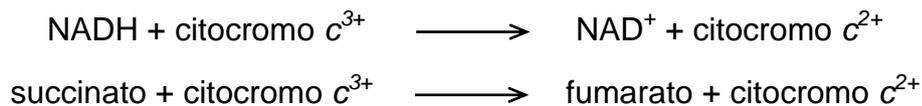


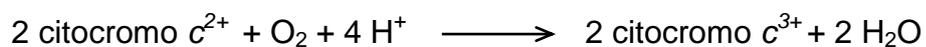
Figura 3.6. Consumo de oxígeno en distintos estados metabólicos. Boveris DL & Boveris A, 2007.

B. Actividad de los complejos mitocondriales

La actividad de los complejos I-III y II-III se determinó espectrofotométricamente a 30°C con membranas mitocondriales resuspendidas en buffer fosfato 100 mM pH 7.4, luego de haber sido homogenizadas mediante 3 pasajes por una aguja hipodérmica 29G. Para la actividad de los complejos I-III y II-III, se agregó 0.2 mM NADH o 5mM de succinato respectivamente, 25 μM citocromo c^{3+} y 0.5 mM KCN. La actividad enzimática se evaluó a 550 nm ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), siguiendo la reducción de citocromo c^{3+} a citocromo c^{2+} como se detalla a continuación:



La actividad del complejo IV se determinó agregando 60 μM de citocromo c^{2+} en el mismo buffer descrito anteriormente. El citocromo reducido se preparó mediante la reducción de citocromo c^{3+} con ditionito de Na^+ , seguido por pasaje por una columna Sephadex G-25 (Zaobornyj T y cols., 2009). Se determinó la actividad de este complejo siguiendo la oxidación de citocromo c^{2+} a citocromo c^{3+} como sigue:



C. Velocidad de producción de H₂O₂

La velocidad de producción mitocondrial de H₂O₂ se determinó en mitocondrias intactas a través de la técnica fluorométrica que utiliza peroxidasa de rábano rusticano (HRP) en presencia de escopoletina (6-metoxi-7-hidroxi-1,2-benzopirano). La escopoletina es una sustancia fluorescente en su forma reducida y no fluorescente en su forma oxidada. Se determinó la reducción de la escopoletina a 365-450 nm a 30°C durante 2 minutos (Boveris A, 1984). El H₂O₂ intramitocondrial es producto de la dismutación del O₂⁻, sin embargo, parte de este O₂⁻ puede ser transportado hacia el citosol antes de transformarse en H₂O₂. El agregado de SOD al medio de reacción convierte estequiométricamente el O₂⁻ en H₂O₂, permitiendo determinar la producción de H₂O₂ intramitocondrial total. Los resultados se expresaron en nmol H₂O₂/min.mg prot. La figura 3.7 muestra la reacción entre H₂O₂ y escopoletina catalizada por HRP.

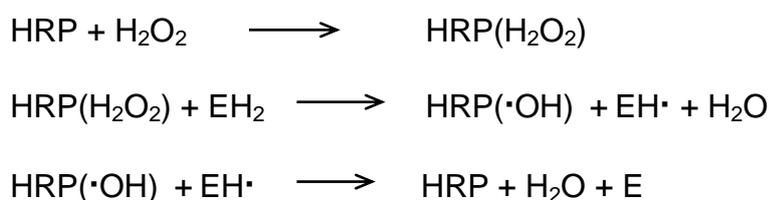


Figura 3.7. H₂O₂ forma un complejo con HRP. La escopoletina (EH₂) reacciona con este complejo y se transforma en escopoletina oxidada (E).

El medio de reacción consistió en manitol 230 mM, sucrosa 70 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.4, succinato 7 mM, Cu,Zn-SOD 0,6 μM, HRP 1 μM, escopoletina 1 μM y mitocondrias intactas (0,2 mg/ml proteínas). Previamente se realizó una curva de calibración para calcular la velocidad de producción utilizando concentraciones stock de H₂O₂.

D. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido (O₂⁻) a H₂O₂ y O₂. Su actividad se determinó espectrofotométricamente (Beckman Coulter, California, USA) utilizando el método del citocromo c. Este experimento se basa en la determinación de la velocidad de reducción de citocromo c³⁺ en citocromo c²⁺ por el O₂⁻, siendo la fuente del O₂⁻ el sistema xantina-xantina oxidasa. La SOD compite por el O₂⁻, disminuyendo la velocidad de reducción del ferrocitocromo c (Mc Cord JM & Fridovich I, 1969). Se agregó a la cubeta de medida 850 μl de solución amortiguadora (HK₂PO₄-H₂KPO₄ 50 mM, pH = 7.8, EDTA 0.1 mM), 100 μl xantina (C_f = 50 μM), 50 μl de citocromo c (C_f = 20 μM) y suficiente cantidad de xantina oxidasa (~5 nM) para

producir una variación de absorbancia de 0.025/minuto a 25°C. Se monitoreó el cambio de absorbancia a 550-540 nm durante 2 min y se determinó la pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{min}_A$. Se repitió la determinación agregando volúmenes de muestra variable (homogeneizado y/o membranas mitocondriales) y se registró la pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{min}_B$ (se realizaron 4 determinaciones con 4 volúmenes de muestra diferentes). Con el fin de expresar el contenido de SOD en pmol/mg proteína, se realizó la determinación enzimática agregando 4 volúmenes diferentes de SOD comercial (en lugar de muestra).

E. Contenido de TBARS

El contenido de TBARS fue analizado en tejido gingival y en la GSM mediante cuantificación de malondialdehído como producto de la peroxidación lipídica que reacciona con ácido tricloroacético conduciendo a TBARS. Brevemente, el tejido fue homogenizado en buffer fosfato pH 7.4 y luego transferido a un tubo con ácido tricloroacético, ácido clorhídrico y ácido tiobarbitúrico. La mezcla se hirvió durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La absorbancia de los sobrenadantes se midió en un espectofotómetro (Hitachi-U, 2001) a 535 nm (Yagi K, 1976).

3.4.8 Niveles de ARNm de AQP-5 mediante RT-PCR

Fragmentos de la GSM de aproximadamente 50 mg fueron homogenizados en TRIzol (Invitrogen, California, USA) inmediatamente luego de la eutanasia. El ARN fue extraído según las indicaciones del fabricante, cuantificado a través de NanoDrop (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y almacenado a -70°C. Luego, se sintetizó ADN a partir del ARN mensajero (ARNm) total (3 μg) utilizando M-MLV RT, inhibidor de ribonucleasa y random primers. Los primers específicos para realizar la amplificación fueron diseñados utilizando Primer 3 Software. Las secuencias utilizadas fueron:

β -actina:	5'ACCCGCCGAGTACAACCTTC 3' (forward)
	5'ATGCCGTGTTCAATGGGGTA 3' (reverse)
AQP-5	5'GAGATTCGTGAATGCGGTGC 3' (forward)
	5'GTGGTTTATTGGGAAGCGCC 3' (reverse)

Los productos se cargaron en un gel de agarosa al 2%. Las bandas se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV. Se tomaron fotografías con una cámara digital (Olympus

C-5060), las que se analizaron mediante el software Image Lab 4.1. El nivel de ARNm se normalizó con la β -actina y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (AU) de densidad óptica relativa (Surkin PN y cols., 2018).

3.4.9 Análisis histológico de GSM

A. Histología de rutina

Luego de la extracción de las GSM, una porción de la misma fue fijada en formaldehído 4% en PBS durante 24 hs, deshidratada en concentraciones crecientes de alcohol y posteriormente embebida en parafina. Se cortaron secciones de 5 μ m en un micrótopo de rotación (Arcano, Argentina) y, previa rehidratación de los preparados, se procedió a realizar la tinción de H&E.

B. Inmunohistoquímica

Luego de realizar los cortes de 5 μ m como se mencionó en el punto anterior, se realizó la marcación inmunohistoquímica (IHQ) para evaluar la inmunorreactividad de HIF-1 α y AQP-5 en GSM. Las secciones de tejido fueron tratadas para lograr la exposición de antígenos en buffer citrato pH 6 durante 15 minutos en microondas a potencia 300 W. Posteriormente, se bloqueó la unión de proteínas inespecíficas con BSA 3% en PBS, seguido del bloqueo de la actividad endógena de las enzimas peroxidasas durante 20 minutos con un buffer comercial (EnVision™ FLEX Systems FLEX, Dako, Carpinteria, CA, USA). Las secciones de tejido fueron incubadas a 4° C durante la noche con los anticuerpos primarios (HIF-1 α o AQP- 5; Biorbyt, UK) y luego expuestas al segundo anticuerpo conjugado con HRP (EnVision™ FLEX Systems Dako). Se utilizó diaminobencidina como cromógeno para revelar la expresión de los anticuerpos y se realizó el teñido de contraste con hematoxilina (Hidalgo JV y cols., 2014).

C. Microscopía electrónica de transmisión

El análisis ultraestructural se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM 109T). Secciones de 1 mm³ de tejido se fijaron con 1% de glutaraldehído en 0,1 M de buffer fosfato pH7.4 durante 4 hs y posteriormente se lavaron 3 veces con buffer fosfato. Luego de la deshidratación, las secciones fueron embebidas en resina Durcupan (Fluka

AG, Switzerland). Se obtuvieron cortes de 5 nm que se tiñeron con uranilo y citrato de plomo. Se analizó la morfología de las células de los acinos mucosos y serosos y las de los conductos intercalares. El tamaño mitocondrial fue medido y se evaluó la presencia de disrupción de membrana o crestas mitocondriales y el estado de la matriz mitocondrial. También se realizó la morfometría de área (μm^2) y perímetro (μm) en aquellos preparados que presentaron dilatación del espacio intercelular, manteniendo los parámetros de iluminación, contraste y brillo en cada imagen y pasando las mismas a una resolución de 8 bits. Se eligieron 3 zonas de interés en cada preparado y se analizaron 10 células por grupo.

3.4.10 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se analizó en homogenato de tejido (encía o GSM) de acuerdo al método de Bradford usando seroalbúmina bovina como estándar (Bradford MM, 1976)

3.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar medio (SEM). Los valores de los grupos experimentales fueron comparados entre sí utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. Los experimentados fueron realizados 2 o 3 veces, siendo los resultados estadísticamente equivalentes, por lo que las figuras que se presentan fueron tomadas de experimentos individuales elegidos al azar. Los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad Software Inc., San Diego, USA.

RESULTADOS

4. Resultados

Objetivo I

EFFECTO DE LA HIPOXIA AMBIENTAL CRÓNICA SOBRE LOS TEJIDOS DE SOPORTE DENTARIO EN ANIMALES EN CRECIMIENTO

En una primera etapa de experimentos, se realizaron estudios biomecánicos e histomorfométricos del hueso mandibular y/o alveolar de ratas al destete con la finalidad de analizar el efecto de los dos tipos de exposición crónica a hipoxia (HCI y HCC) sobre el hueso sano en crecimiento. Para ello, se utilizaron ratas Wistar hembras de 21 días, de aproximadamente 50 g de peso, divididas en los 3 grupos de n=15: C, HCI y HCC. Luego de determinar los parámetros óseos (biomecánica y análisis histomorfométrico del hueso alveolar), se evaluaron marcadores inflamatorios en la encía adyacente al primer molar inferior, a fin de obtener una primera estimación del efecto de la HX en el tejido de soporte dentario. También se analizaron histológicamente las GSM, con el objetivo de evidenciar si la HX producía alteraciones arquitectónicas en dicho órgano.

1. Peso corporal y mandibular, talla y hematocrito

Con respecto al peso corporal y mandibular, ambos parámetros disminuyeron significativamente en los animales expuestos a ambos tipos de HX. La talla de los animales hipóxicos también fue menor al concluir el período experimental. Este resultado era esperable, ya que es conocido el efecto nocivo de la HX sobre el crecimiento (Bozzini CE y cols., 2005). En conjunto, estos resultados indican que la exposición crónica a HX, tanto de forma intermitente como continua, afecta negativamente el crecimiento corporal. Por otra parte, el valor de hematocrito fue medido con el fin de verificar si la exposición a HX había sido efectiva, ya que este parámetro aumenta por incremento de la tasa de eritropoyesis en respuesta a los bajos niveles de O₂. Ambos grupos hipóxicos evidenciaron mayores niveles de hematocrito que los C (Tabla 4.1).

	C	HCI	HCC
Peso corporal (g)	293,15±26,70 ^a	249,41±14,25 ^b	250,12±15,92 ^b
Longitud corporal (cm)	22,29±0,76 ^a	21,57±0,63 ^b	21,58±0,85 ^b
Peso mandíbula (mg)	0.54±0.03 ^a	0.49±0.02 ^b	0.50±0.01 ^b
Hematocrito (%)	36.75±3.40 ^a	42.07±3.47 ^b	44.82±3.68 ^b

Tabla 4.1. Efecto de la HX sobre los parámetros morfométricos de ratas en crecimiento: C (control), HCI (hipoxia crónica intermitente), HCC (hipoxia crónica continua). Letras distintas indican diferencias significativas.

2. Estudios en mandíbula

2.1. Propiedades Biomecánicas

A. Propiedades estructurales

Además de los parámetros morfométricos descritos anteriormente, se evaluaron las propiedades biomecánicas del hueso mandibular integrado como órgano. Para esto, se utilizó un test mecánico de flexión a 3 puntos que permitió estimar las propiedades estructurales mandibulares.

La exposición a HX disminuyó la carga ósea de fractura mandibular (W_f), incrementando las probabilidades de que el hueso pierda su integridad como órgano. Además, la carga elástica límite (W_y) también se vio disminuida en ambos grupos expuestos a HX, sugiriendo una menor capacidad del hueso en crecimiento de resistir elásticamente la deformación. Por último, la rigidez estructural (W_y/dy) también fue significativamente menor en ambos grupos experimentales con respecto al control, estableciendo una mayor propensión del hueso en crecimiento a sufrir microfracturas. Las 3 variables estructurales analizadas se vieron más afectadas en los animales del grupo HCI que en HCC, hecho que puede observarse en la tabla 4.2.

	C	HCI	HCC
Área cortical mandibular, mm ²	10.51±0.91 ^a	8.64±0.73 ^b	9.92±0.58 ^c
Área medular mandibular, mm ²	1.92±0.25 ^a	1.76±0.23 ^a	2.08±0.31 ^a
Momento de inercia (Iz), mm ⁴	4.05±0.29 ^a	3.07±0.43 ^b	3.59±0.27 ^c

Tabla 4.3. Propiedades geométricas mandibulares de ratas en crecimiento. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

C. Propiedades materiales

En tercer lugar analizamos las propiedades materiales mandibulares. Éstas son independientes de la forma y tamaño del hueso y dependen no sólo de la densidad volumétrica del mineral, sino también de la forma y empaquetamiento de los cristales de hidroxiapatita. En la tabla 4.4 se resumen los resultados. El Módulo de Young (E), medida de la rigidez intrínseca del material óseo, es afectado por el crecimiento, modelado y remodelado óseo. Cuanto > E > Resistencia (< Fragilidad). En nuestro modelo experimental, el E disminuyó significativamente sólo en los animales expuestos a HCI. El estrés elástico hasta el punto de cesión, en cambio, se vio disminuido en ambos grupos expuestos a HX. La disminución de estas propiedades indicaría defectos minerales o colágenos en el hueso, que podrían deberse a alteración en los procesos de modelado/remodelado óseo.

	C	HCI	HCC
Módulo de Young (E), N/mm ²	941.72±202.95 ^a	643.94±77.00 ^b	1084.23±46.75 ^a
Estrés, N/mm ²	41.55±3.93 ^a	28.33±5.07 ^b	33.17±3.98 ^b

Tabla 4.4. Propiedades materiales mandibulares de ratas en crecimiento. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

En resumen, las propiedades biomecánicas del hueso mandibular de ratas en crecimiento se vieron negativamente afectadas por exposición a HX, incrementando el riesgo de fractura, probablemente debido a una peor distribución del material óseo y de alteraciones colágenas o minerales. La exposición intermitente afecta en mayor medida las propiedades biomecánicas de la mandíbula de ratas en crecimiento, probablemente por una mayor dificultad para lograr la aclimatación a HX.

2.2. Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar

Ya evaluadas las propiedades biomecánicas mandibulares, se pasó a analizar en detalle el tejido óseo alveolar. En primer lugar, se estimó la pérdida ósea asociada al primer molar inferior por su cara vestibular y lingual mediante el método de la distancia desde el límite amelo-cementario (LAC) hasta la cresta ósea alveolar (CA). Tanto los animales expuestos a HCI como a HCC sufrieron un aumento de pérdida ósea alveolar a nivel de la cortical lingual. La cortical vestibular no se vio afectada en ninguno de los grupos experimentales (figura 4.1 A). Este resultado sugiere un efecto deletéreo de la exposición a ambas modalidades de HX ambiental sobre el hueso alveolar, siendo mayor en el caso de HCC ($p < 0,001$). En la figura 4.1 B. se puede observar una foto seleccionada al azar de un animal por cada grupo experimental.

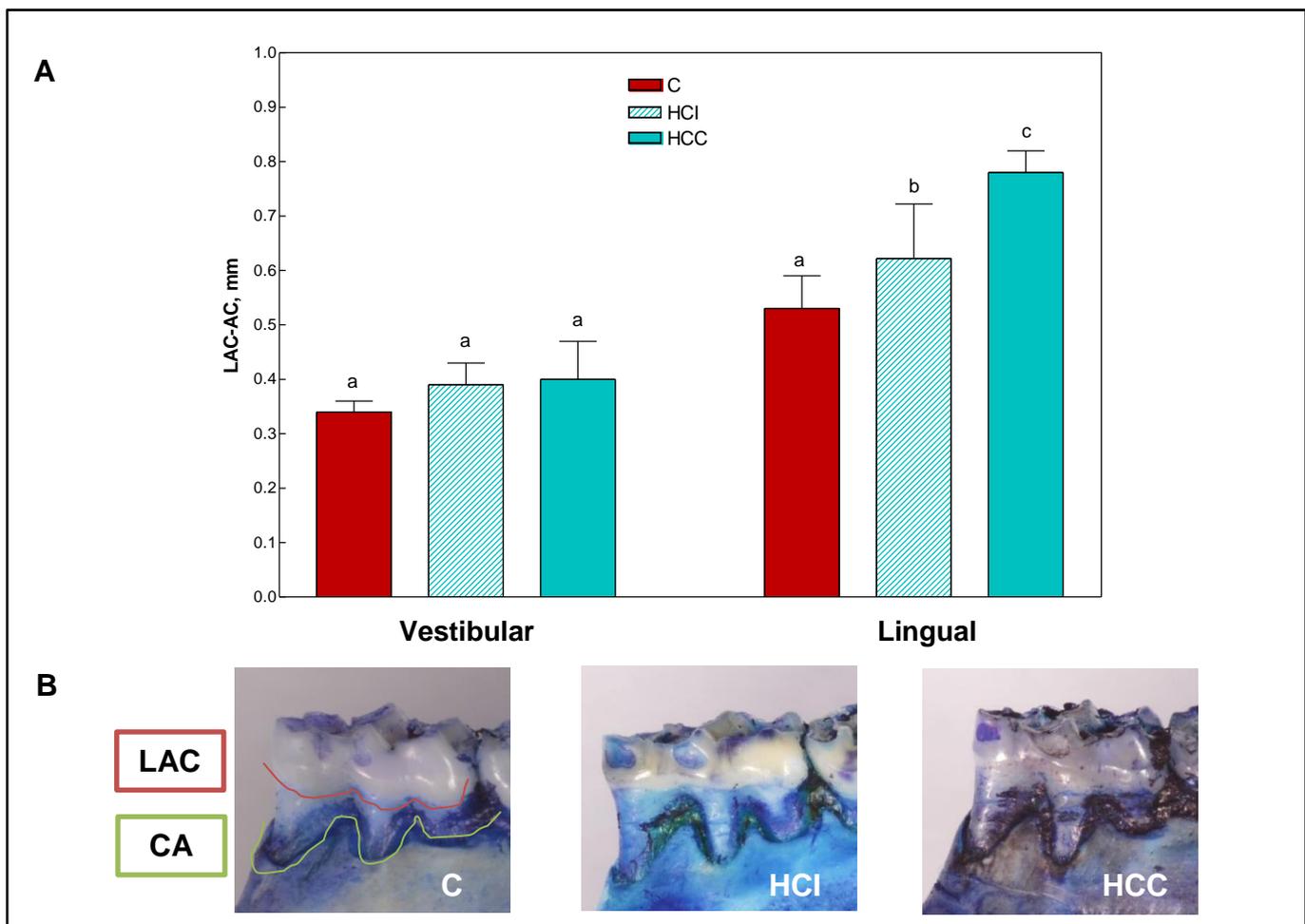


Figura 4.1. A. Efecto de la exposición a HX sobre la pérdida ósea alveolar expresada en mm de la cortical vestibular y lingual del primer molar inferior. Letras distintas indican diferencias significativas.

B. Fotografías de la cortical lingual del primer molar inferior de un animal seleccionado al azar. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. LAC: límite amelocementario, CA: cresta alveolar

2.3 Análisis histomorfométrico del espacio interradicular

Para continuar el análisis del efecto de la HX sobre el hueso alveolar, se procedió a evaluar el hueso interradicular mediante histomorfometría estática. Para diferenciar si la resorción ósea se produjo a expensas de la porción coronal del hueso interradicular o por un incremento del área medular, el volumen óseo trabecular se evaluó de manera total (VO/VT) o parcial (VO parcial/VT) según fue descrito en Materiales y Métodos.

Con respecto al VO/VT, las dos modalidades de exposición a hipoxia produjeron una pérdida ósea alveolar interradicular como se observa en la figura 4.2 A ($p < 0,01$). Cuando fue medido el VO parcial, tomando en cuenta el sector coronal, también se observó un aumento significativo de la pérdida interradicular en ambos grupos experimentales. Dada la gran expansión medular que se observó en los grupos hipóxicos, estos resultados sugieren que la resorción ósea observada se da mayormente a expensas de un aumento de la cavidad medular.

También se estimó la altura del ligamento periodontal, evidenciándose un incremento en HCC con respecto al C, que no fue observado en HCI (figura 4.2 A). Dada la ausencia de componente inflamatorio en la zona del ligamento periodontal, suponemos que este aumento del ligamento se debe a fuerzas generadas durante el trauma oclusal que lleva a un aumento del espacio periodontal y modificación de las características óseas.

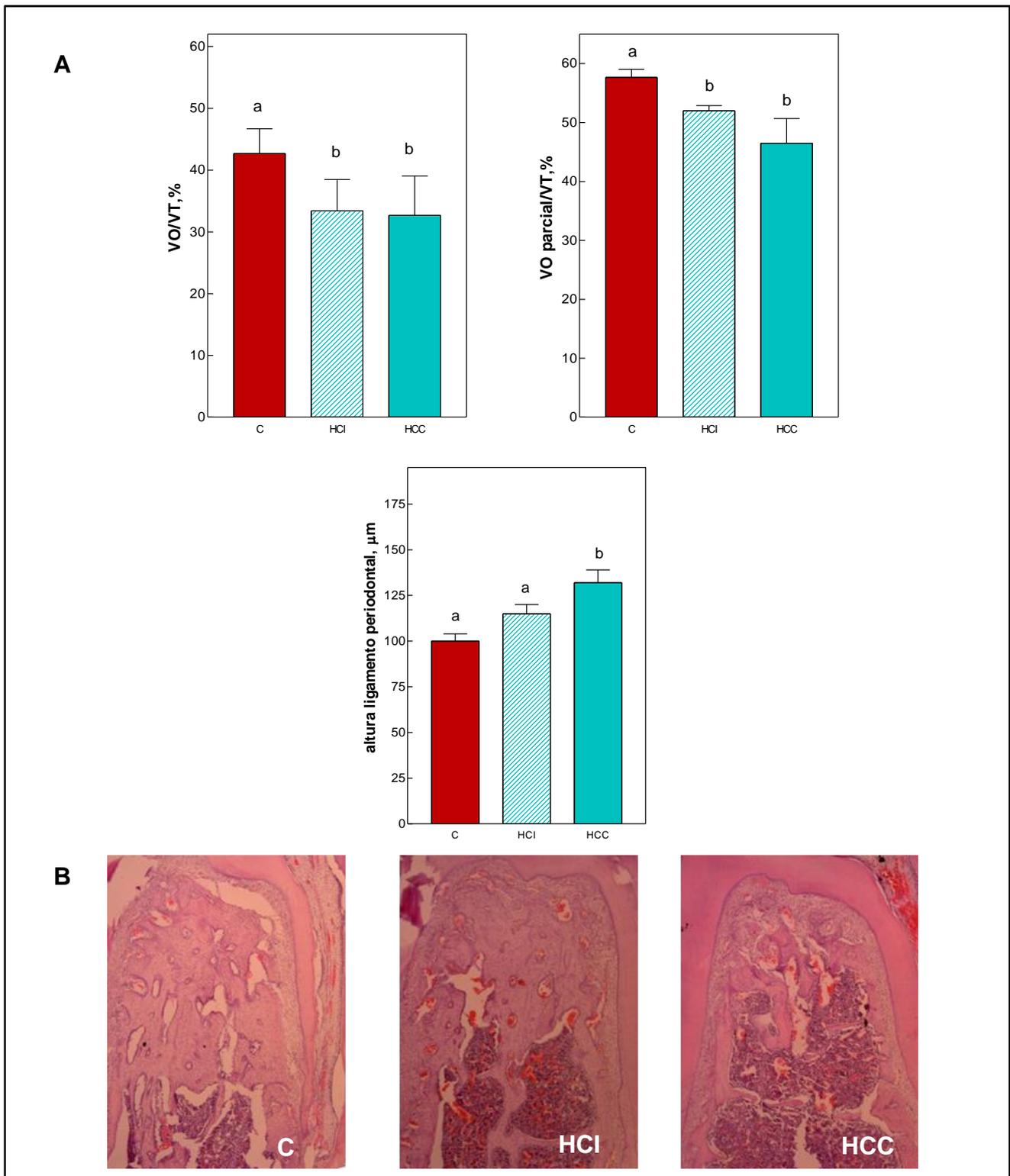


Figura 4.2. A. Pérdida ósea interradicular expresada como VO/VT (izquierda) y VO parcial/VT (derecha). Abajo: altura del ligamento periodontal. Letras distintas indican diferencias significativas.

B. Microfotografías del espacio interradicular del primer molar inferior de un animal de cada grupo seleccionado al azar (40X). C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

3. Contenido de PGE₂ y actividad de la iNOS en tejido gingival

Como marcador de los procesos inflamatorios orales se midió el contenido de PGE₂ en la encía que rodea al primer molar inferior. La exposición a HX, ya sea intermitente o continua, no modificó significativamente los valores de PGE₂ en el tejido estudiado (figura 4.3, izquierda).

A diferencia de lo ocurrido con el contenido de PGE₂, la actividad de la iNOS aumentó significativamente en los dos grupos hipóxicos, sugiriendo una mayor producción de ON en el tejido gingival circundante al primer molar durante la exposición a HX de ratas en crecimiento (figura 4.3, derecha).

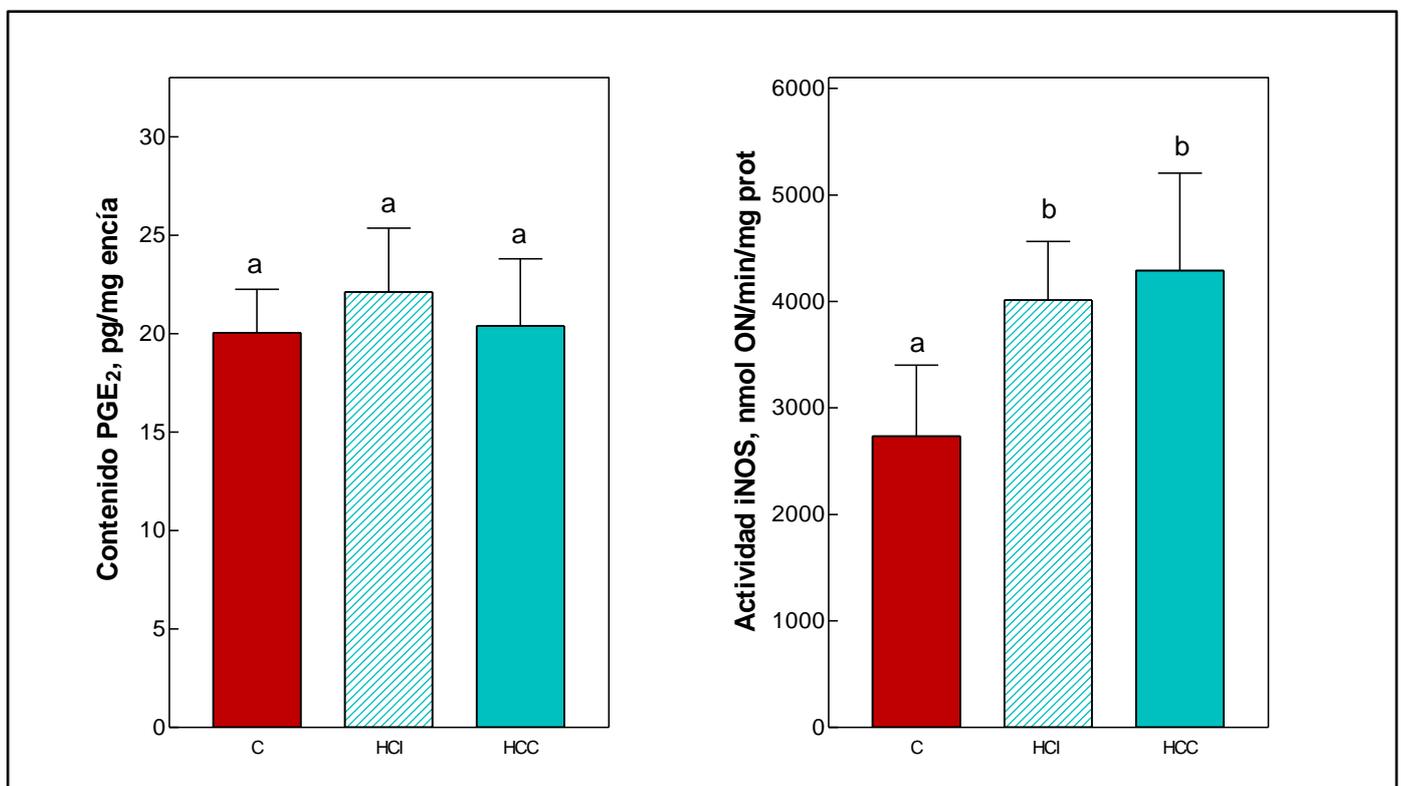


Figura 4.3. Efecto de la HX ambiental sobre el contenido de PGE₂ (izquierda) y actividad de la iNOS (derecha) en tejido gingival de ratas en crecimiento. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

4. Análisis histológico de las GSM

En la figura 4.4 puede observarse una foto seleccionada al azar de la GSM de un animal de cada grupo experimental, teñidas con H&E. Se observa organización estructural normal, sin presencia de células inflamatorias ni edema. Cabe destacar que se evidenció vasodilatación y extravasación sanguínea en las GSM de los animales expuestos a HCl.

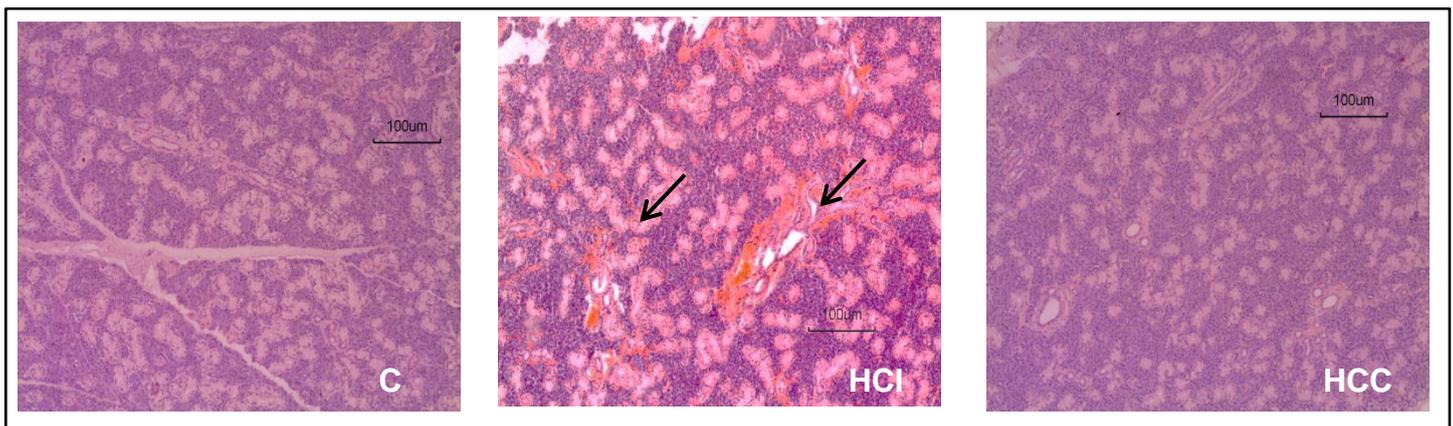


Figura 4.4. Efecto de la HX sobre las GSM de animales en crecimiento. Se observa estructura celular normal. Las flechas indican extravasación sanguínea. (40X) C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua

5. Contenido de PGE₂ y actividad de la iNOS en GSM

A pesar de no encontrar cambios estructurales mediante el análisis histológico de rutina, no pueden descartarse alteraciones bioquímicas en las GSM. Es por ello que medimos dos marcadores importantes de la función glandular: el contenido de PGE₂ y la actividad de la iNOS.

En el primer caso, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (figura 4.5, izquierda). En cuanto a la actividad de la iNOS, se vio incrementada en ambos grupos hipóxicos al finalizar el periodo experimental (figura 4.5, derecha). Dado que el NO es un importante agente vasodilatador, suponemos que la actividad de esta enzima no estaría siendo inducida por un proceso inflamatorio, sino como respuesta a la HX para aumentar el aporte de O₂ tisular.

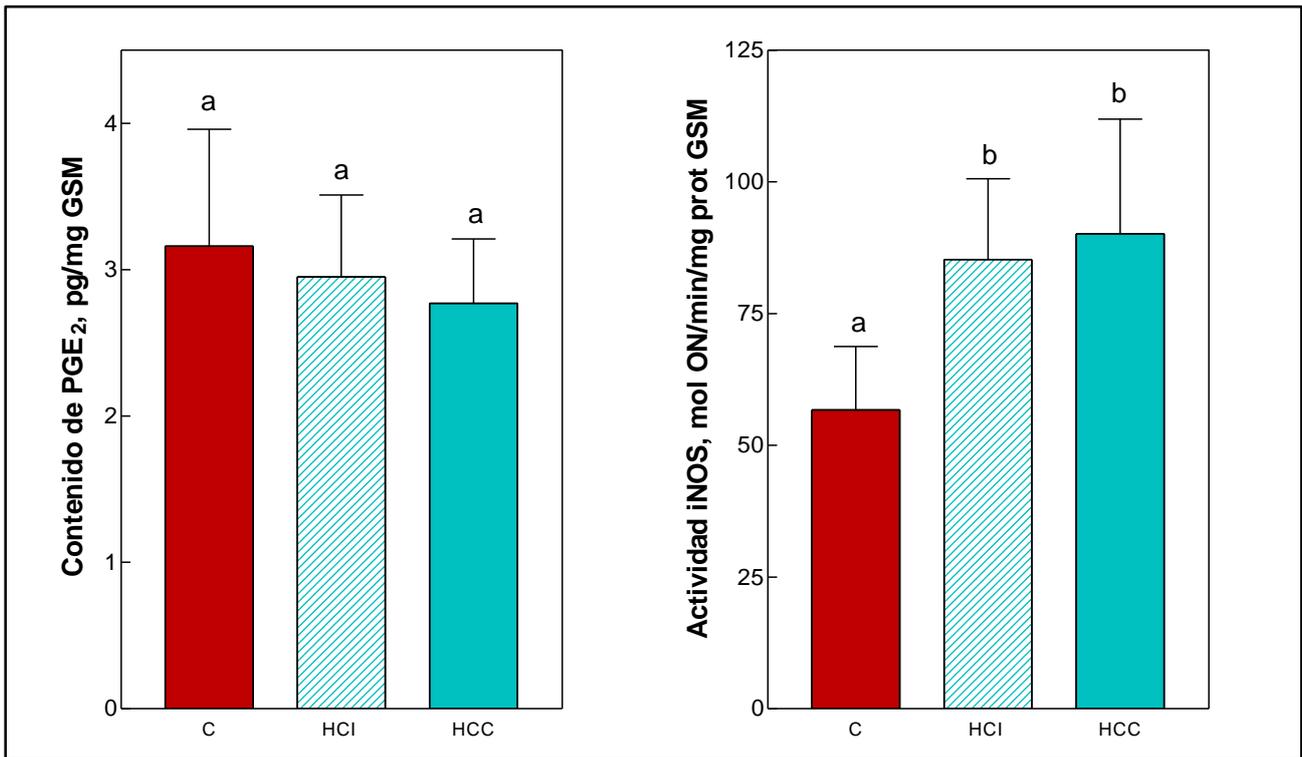


Figura 4.5. Contenido de PGE₂ (izquierda) y actividad de la iNOS (derecha) en GSM de animales en crecimiento expuestos a HX durante 3 meses. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

Objetivo II

EFFECTO DE LA HIPOXIA AMBIENTAL CRÓNICA SOBRE LOS TEJIDOS DE SOPORTE DENTARIO Y LA GSM DE RATAS ADULTAS

En esta serie de experimentos se utilizaron ratas adultas (2 meses de edad, 250 g aproximadamente) para poder descartar posibles influencias del crecimiento en los parámetros estudiados sobre el tejido óseo alveolar, gingival y glandular. Adicionalmente, permitiría extrapolar datos a poblaciones que habitan en zonas hipóxicas desde la adultez, tanto de forma continua como intermitente por razones laborales.

En la primera etapa se realizaron experimentos preliminares con distintos períodos de exposición a HX como puesta a punto del modelo en ratas adultas, con el objetivo de establecer el tiempo adecuado para estudiar efectos de las distintas condiciones ambientales sobre los tejidos de interés. Para minimizar el tiempo de permanencia de los animales en las cámaras de altura simulada, planificamos estudios a 1 mes y 3 meses. Los resultados que se presentan a continuación resumen las experiencias realizadas en ambos períodos experimentales.

1. Peso corporal, mandibular, glandular y hematocrito

No se evidenciaron diferencias significativas en el peso corporal, mandibular ni en el de las GSM en ninguno de los 3 grupos experimentales al cabo de 1 mes de exposición a HCl y HCC. Con respecto al hematocrito, éste aumentó significativamente sólo en los animales expuesto a HCC comparado con C. Los animales expuestos a HCl durante 1 mes no mostraron diferencias con respecto al control, probablemente debido al poco tiempo de exposición a HX (tabla 4.5).

1 mes	C	HCI	HCC
Peso corporal (g)	288.8±4.42 ^a	292.2±5.26 ^a	297.14±5.63 ^a
Peso mandíbula (mg)	0.49±0.039 ^a	0.50±0.011 ^a	0.52±0.031 ^a
Peso GSM (mg)	181.33±3.85 ^a	185.24±5.49 ^a	202.11±7.82 ^a
Hematocrito (%)	39.5±3.61 ^a	39.01±5.29 ^a	49.25±7.36 ^b

Tabla 4.5. Parámetros morfométricos corporales y hematocrito de ratas adultas con 1 mes de exposición a HX. C (control), HCI (hipoxia crónica intermitente), HCC (hipoxia crónica continua). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Luego de 3 meses de exposición a HX, tampoco se encontraron diferencias significativas en el peso corporal, mandibular ni glandular en los animales de ninguno de los grupos experimentales. Estos resultados marcan una diferencia fundamental con respecto a los presentados para animales en crecimiento, ya que puede descartarse la influencia del peso en los parámetros analizados para cada tejido. El hematocrito fue significativamente mayor en los dos grupos de animales hipóxicos, siendo más alto en el expuesto continuamente ($p < 0,001$ vs. $p < 0,05$ en HCI). Este resultado es esperable, ya que los animales expuestos intermitentemente pasan mayores periodos de tiempo en normoxia, donde la pO_2 es la normal (Tabla 4.6)

3 meses	C	HCI	HCC
Peso corporal (g)	357.20±31.33 ^a	320.41±21.42 ^a	337.08±17.60 ^a
Peso mandíbula (mg)	0.59±0.04 ^a	0.57±0.01 ^a	0.58±0.04 ^a
Peso GSM (mg)	218.16±16.40 ^a	198.20±10.86 ^a	192.87±21.17 ^a
Hematocrito (%)	41.2±2.55 ^a	50.2±4.76 ^b	57.33±7.09 ^c

Tabla 4.6. Parámetros morfométricos corporales y hematocrito de ratas adultas con 3 meses de exposición a HX: C (control), HCI (hipoxia crónica intermitente), HCC (hipoxia crónica continua). Letras diferentes indican diferencias significativas.

2. Estudios en mandíbula

2.1. Propiedades Biomecánicas

A. Propiedades estructurales

Se realizaron las pruebas biomecánicas a un mes y a tres meses de exposición a HX. No se observaron cambios significativos en ninguna de las propiedades estructurales analizadas en los animales adultos (Tabla 4.7). Estos resultados sugieren que una vez completado el crecimiento, la HX no afectaría la resistencia a la fractura mandibular.

	1 mes			3 meses		
	C	HCI	HCC	C	HCI	HCC
Carga de fractura (Wf), N	47.89±13.14	49.39±5.74	53.20±10.55	56.41±13.61	57.57±10.56	63.40±12.87
Carga elástica límite (Wy), N	29.88±6.23	35.11±10.44	42.2±5.49	35.06±3.49	36.25±8.66	40.75±10.56
Rigidez estructural (Wy/dy), N/mm	73.33±4.65	74.71±11.37	80.04±3.16	106.74±26.03	101.72±22.55	78.01±19.08

Tabla 4.7. Efecto de la exposición a HX crónica e intermitente sobre las propiedades estructurales mandibulares a 1 mes y 3 meses en C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

B. Propiedades geométricas

No se observaron alteraciones arquitectónicas en las mandíbulas de los animales de ningún grupo (Tabla 4.8). Estos datos reflejan que la exposición a HX no induciría la redistribución del material óseo en el hueso mandibular en los animales adultos. Es esperable que, de no existir necesidad mecánica de adaptación (como se vislumbra en los resultados anteriores), la distribución arquitectónica permanezca inalterada.

	1 mes			3 meses		
	C	HCI	HCC	C	HCI	HCC
Área cortical mandibular, mm ²	11.04±0.80	11.38±0.58	11.42±0.52	11.54±0.66	11.96±0.67	11.28±0.61
Área medular mandibular, mm ²	4.02±0.48	4.47±0.52	4.33±0.64	3.32±0.55	3.66±0.41	3.28±0.30
Momento de inercia (Iz), mm ⁴	3.60±0.59	3.88±0.44	3.92±0.43	3.99±0.25	4.18±0.19	3.91±0.22

Tabla 4.8. Efecto de la exposición a HX crónica e intermitente sobre las propiedades geométricas mandibulares a 1 mes y 3 meses en C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

C. Propiedades materiales

El módulo de elasticidad (E) se vio significativamente disminuido en los animales hipóxicos al cabo de 3 meses de exposición (Tabla 4.9). Este resultado podría correlacionarse con alteraciones en el remodelado óseo que afecta la forma/cristalinidad de los minerales pero sin llegar a afectar significativamente al tejido óseo, por lo que no se observarían alteraciones a nivel biomecánico. Esto refleja la necesidad de evaluar las 3 propiedades conjuntamente para determinar la participación de cada variable en los procesos biológicos óseos.

	1 mes			3 meses		
	C	HCI	HCC	C	HCI	HCC
E, N/mm ²	552.08±73.09 ^a	582.95±145.84 ^a	623.32±51.62 ^a	916.42±268.93 ^a	601.42±120.28 ^b	643.47±108.95 ^b
Stress, N/mm ²	26.87±7.82 ^a	28.91±5.89 ^a	28.75±3.40 ^a	29.56±5.29 ^a	29.44±8.28 ^a	30.35±7.66 ^a

Tabla 4.9. Efecto de la exposición a HX crónica e intermitente sobre las propiedades materiales mandibulares a 1 mes y 3 meses en C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

2.2. Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar

Al cabo de 1 mes de exposición a HX no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distancia LAC-CA en ninguno de los grupos experimentales (dato no mostrado). Luego de 3 meses de exposición, los animales tanto del grupo HCI como de HCC mostraron valores incrementados de pérdida ósea de la cortical lingual, sin exhibir cambios a nivel vestibular. El grupo HCI sufrió mayor pérdida ósea a nivel de la cortical lingual que HCC (figura 4.6 A). En la figura 4.6 B pueden observarse fotografías seleccionadas al azar de 1 animal de cada grupo luego de 3 meses de exposición a HX.

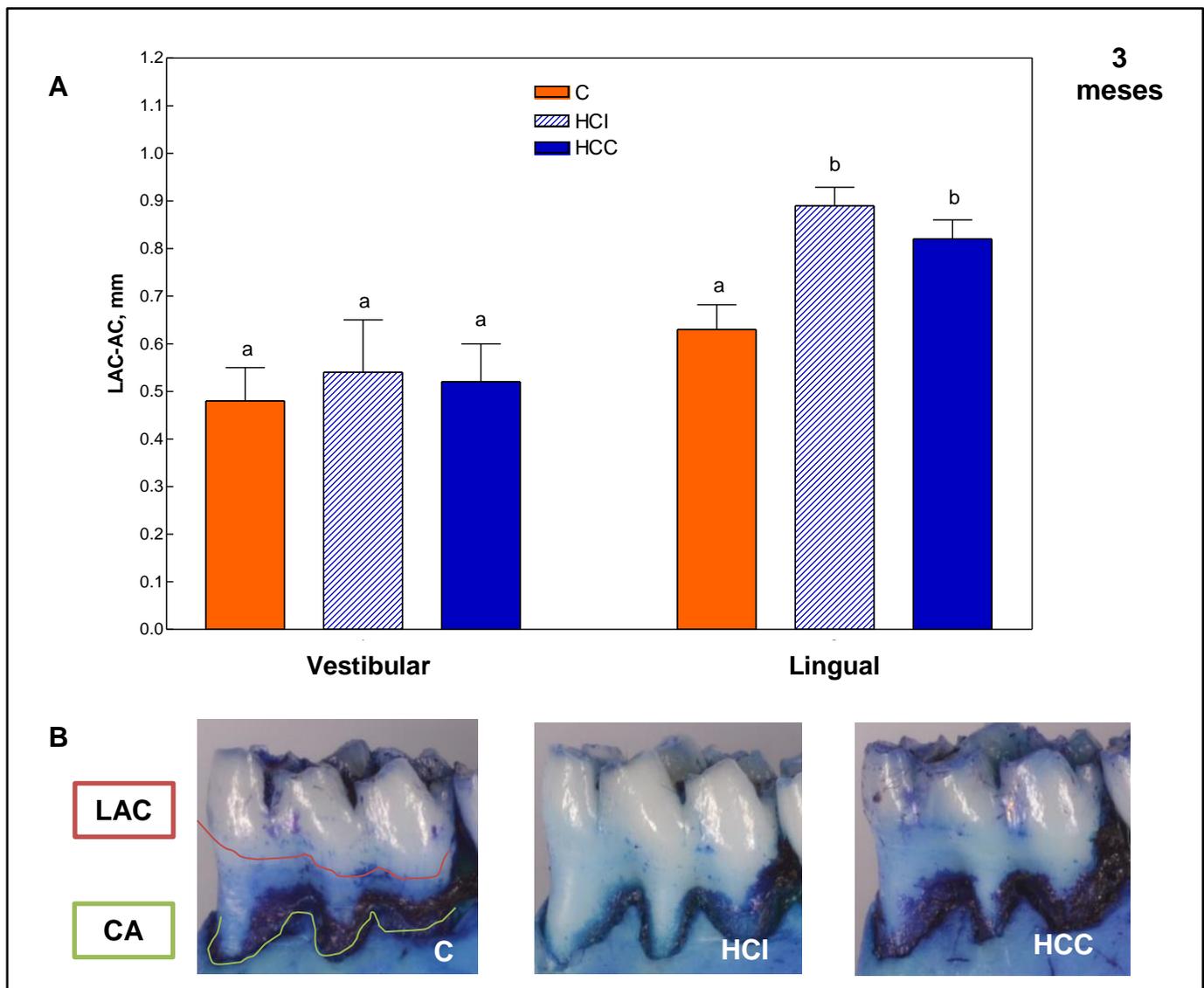
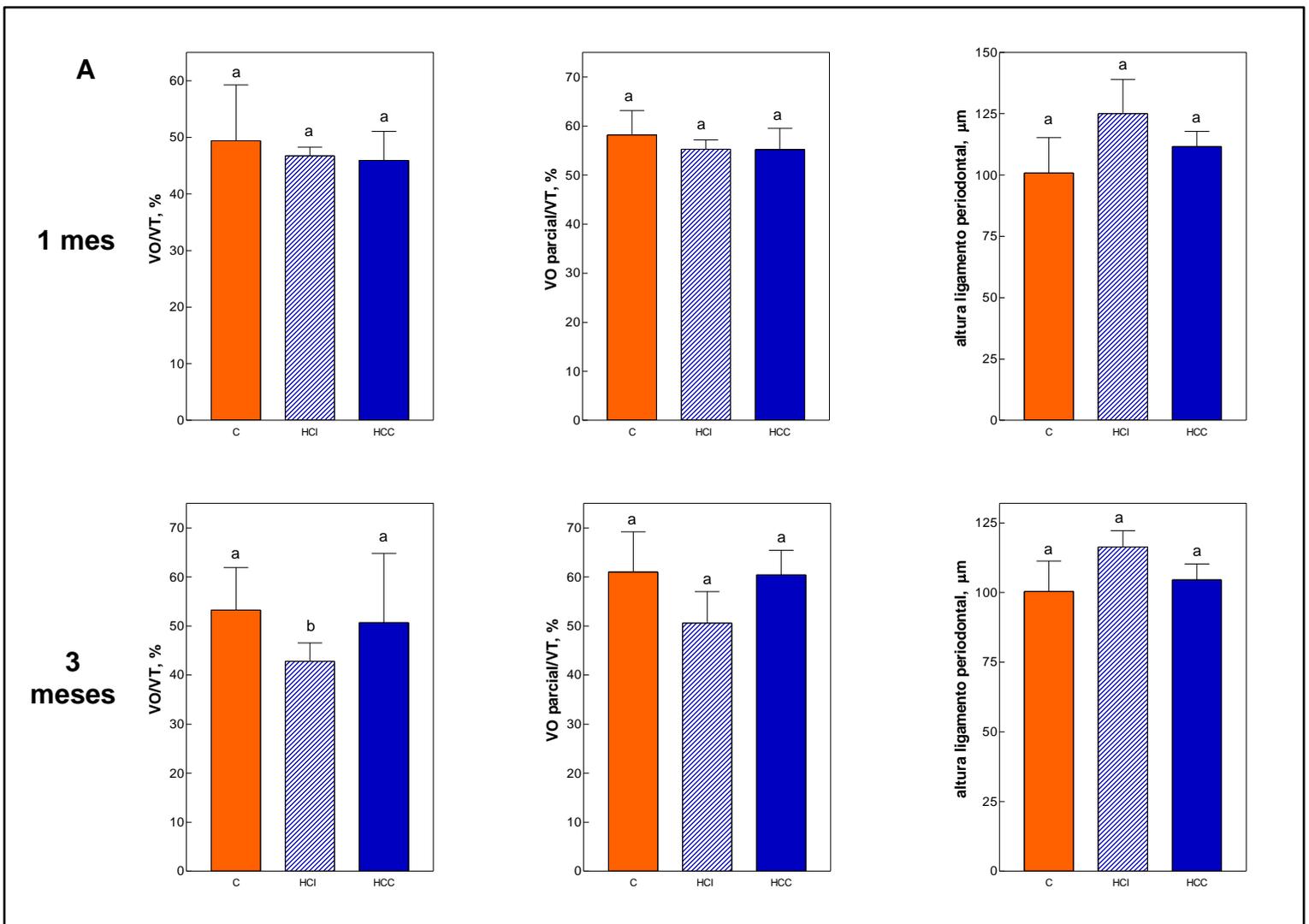


Figura 4.6. A. Pérdida ósea alveolar expresada en mm de la cortical vestibular y lingual del primer molar inferior. Letras distintas indican diferencias significativas. **B.** Fotografías de la cortical lingual del primer molar inferior de un animal seleccionado al azar. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. LAC: límite amelocementario, CA: cresta alveolar.

2.3 Análisis histomorfométrico del espacio interradicular

En los animales expuestos a 1 mes de hipoxia no se encontraron cambios significativos en el VO/VT, así como tampoco en el VO parcial ni en la altura del ligamento periodontal en ninguno de los grupos experimentales (Figura 4.7 A).

En cambio, a los 3 meses el grupo HCI mostró mayor pérdida ósea (VO/VT) respecto al control. El grupo expuesto continuamente no presentó diferencias significativas con respecto al control (Figura 4.7 A). Si bien el VO parcial y la altura del ligamento periodontal no presentaron diferencias significativas con respecto a C en ninguno de los grupos experimentales, se observa una tendencia a la disminución de VO parcial y al aumento en la altura del ligamento en HCI. En la figura 4.7 B se puede observar que la pérdida ósea incipiente en el grupo HCI se debería a una expansión de la cavidad medular, al igual que lo analizado para el Objetivo I.



B

3 meses

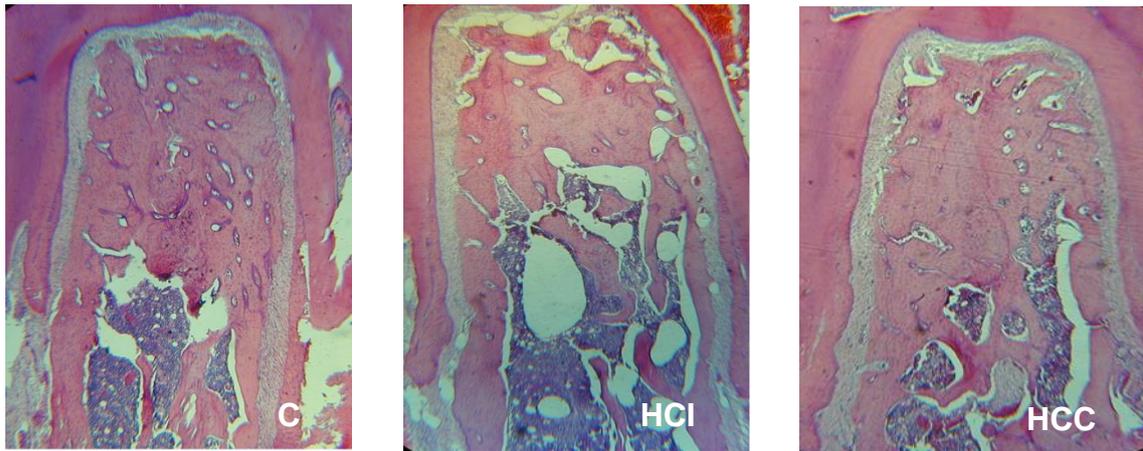


Figura 4.7. A. Pérdida ósea interradicular (expresada como VO/VT y VO parcial/VT) y altura del ligamento periodontal de animales adultos expuestos a HX durante 1 mes y 3 meses. Letras distintas indican diferencias significativas. **B.** Microfotografías del espacio interradicular del primer molar inferior de un animal de cada grupo sometido a HX durante 3 meses, seleccionado al azar (40 X). C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

3. Concentración de CTX-I

Con el objetivo de analizar la tasa de recambio óseo, se evaluó la concentración de CTX-I, marcador de resorción ósea, en suero de las ratas expuestas 3 meses a HX. Como indica la figura 4.8, se encontraron valores incrementados de este marcador en el grupo HCl con respecto a C.

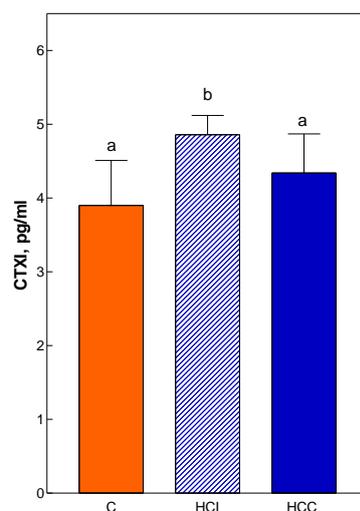


Figura 4.8. Efecto de la HX sobre la concentración de CTXI. Letras distintas indican diferencias significativas. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

4. Contenido de PGE₂ y actividad de la iNOS en tejido gingival

En los animales adultos, el contenido de PGE₂ en encía no se modificó cuando la exposición a HX se realizó durante 1 mes. En el caso de exposición durante 3 meses, el contenido de este mediador en encía aumentó significativamente en el grupo HCI, estableciendo una posible correlación con la pérdida ósea interradicular observada en el mismo grupo experimental (Figura 4.9 A). Al analizar la actividad de la iNOS en encía, se observaron diferencias en los animales expuestos durante 1 y 3 meses a HX. En el primer caso, una mayor actividad de la enzima se verificó en HCI. Al cabo de 3 meses, este grupo no mostró diferencias con respecto al control, mientras el grupo HCC que al mes no mostraba cambios, aumentó significativamente la actividad enzimática (Figura 4.9 B).

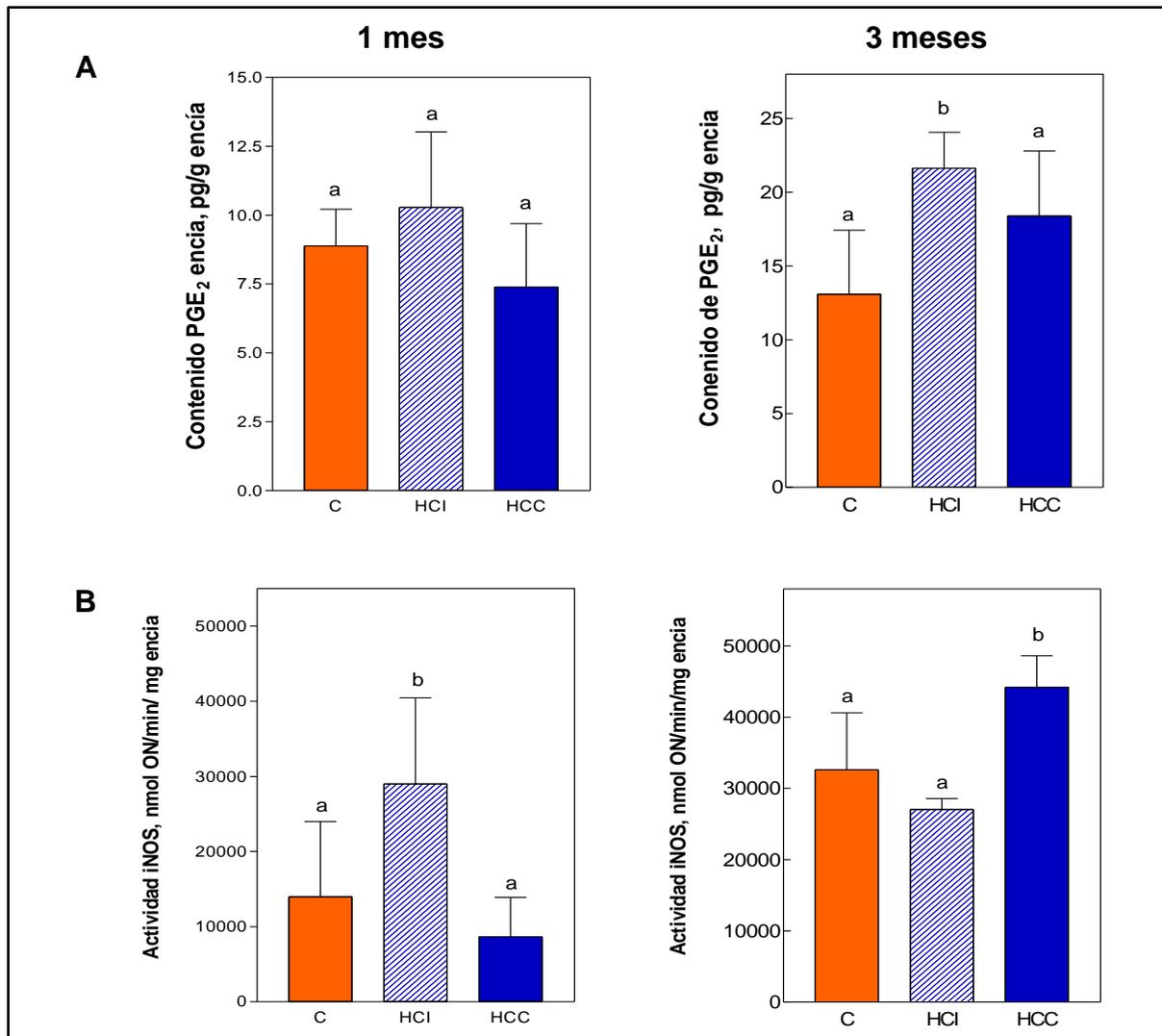


Figura 4.9. A. Contenido de PGE₂ en encía de animales adultos expuestos a HX durante 1 mes (izquierda) y 3 meses (derecha). **B.** Actividad de iNOS en encía de animales adultos expuestos a HX durante 1 mes (izquierda) y 3 meses (derecha). C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

5. Análisis histopatológico del tejido gingival y del ligamento periodontal

En la figura 4.10 A se puede observar el tejido epitelial y conectivo de la encía que circunda al primer molar inferior, pieza dentaria que ha sido objeto de estudio en este trabajo de tesis. La arquitectura de ambos tejidos se encuentra conservada en ambos grupos experimentales, sin presentar diferencias parenquimales con respecto a C. Se evidenció un mayor número de vasos sanguíneos en el tejido conectivo gingival tanto en HCl como en HCC, hecho que es atribuido a la angiogénesis como respuesta a la exposición a HX.

Con respecto a la histología del ligamento periodontal, no encontramos alteraciones histoarquitectónicas en ninguno de los grupos hipóxicos con respecto a C (figura 4.10 B). Al igual que el tejido gingival, el ligamento periodontal se encuentra muy vascularizado con capilares dilatados, como respuesta compensatoria a los bajos niveles de O₂ ambiental.

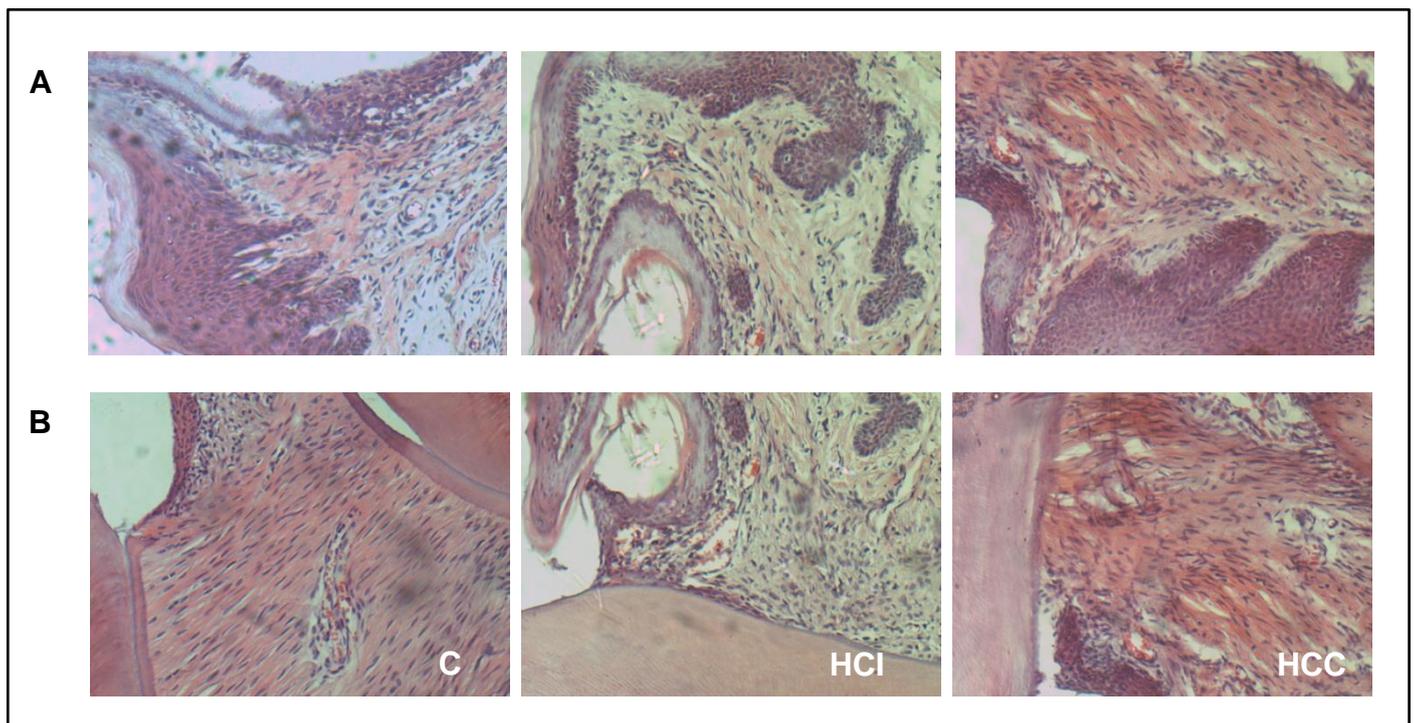


Figura 4.10. Microfotografías del tejido gingival (**A**) y ligamento periodontal (**B**) en ratas adultas expuestas 3 meses a HX. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

6. Secreción salival estimulada

Para estudiar el efecto de la exposición a HX intermitente y continua sobre la funcionalidad de las glándulas salivales, se llevó a cabo el estudio de la secreción salival total en respuesta al agonista muscarínico pilocarpina. Este estudio, al igual que todos los realizados sobre GSM, se realizó exclusivamente en animales expuestos durante 3 meses a ambas modalidades de HX, ya que en este tiempo experimental se evidenciaron cambios en el tejido óseo alveolar.

La secreción salival estimulada disminuyó en un 44% en ambos grupos hipóxicos luego de transcurridos los primeros 30 minutos del experimento ($p < 0,05$). Luego de 60 minutos de estimulación, la secreción salival continuó siendo estadísticamente menor en ambos grupos expuestos a HX con respecto al grupo control (75% en HCI vs. 46% en HCC). Al cabo de los 90 minutos, el mismo patrón de secreción fue observado, siendo la saliva total del grupo HCI un 95% ($p < 0,01$) menor que el grupo control y la del grupo HCC 59% menor que C ($p < 0,05$). En resumen, la exposición a HX disminuyó la secreción salival en animales adultos, más aún cuando la exposición fue de forma intermitente (Figura 4.11).

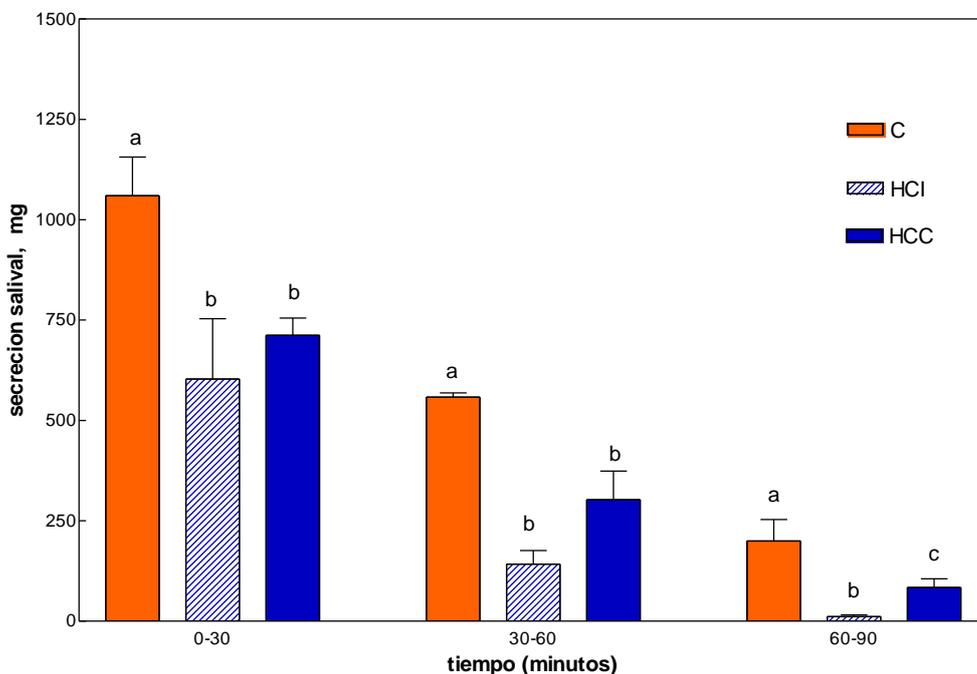


Figura 4.11. Efecto de la HX en la respuesta saliva estimulada por pilocarpina en C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

7. Contenido de PGE₂ y actividad de la iNOS en GSM

Luego de evidenciar una disminución de la secreción salival por exposición a HX, decidimos estudiar la producción de PGE₂ y ON, dos importantes indicadores de la funcionalidad de la GSM. El incremento de PGE₂ se ha vinculado experimentalmente con un descenso en la actividad secretoria glandular (Lomniczi y cols., 2001), mientras que el ON juega un rol estimulante sobre las secreciones exocrinas (Jyotheeswaran y cols., 2000).

Al analizar el contenido de PGE₂ en GSM, observamos un aumento significativo de este mediador sólo en los animales del grupo HCl (Figura 4.12, izquierda). Dado que la PGE₂ tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción salival, el incremento observado en este parámetro podría vincularse con la secreción salival disminuida significativamente en este grupo experimental.

Con respecto a la iNOS, no se registraron diferencias significativas en ningún grupo al cabo de 3 meses de exposición a HX (Figura 4.12, derecha), por lo tanto los niveles de ON provenientes de esta isoforma enzimática, no estarían aumentados en ninguno de los grupos experimentales estudiados.

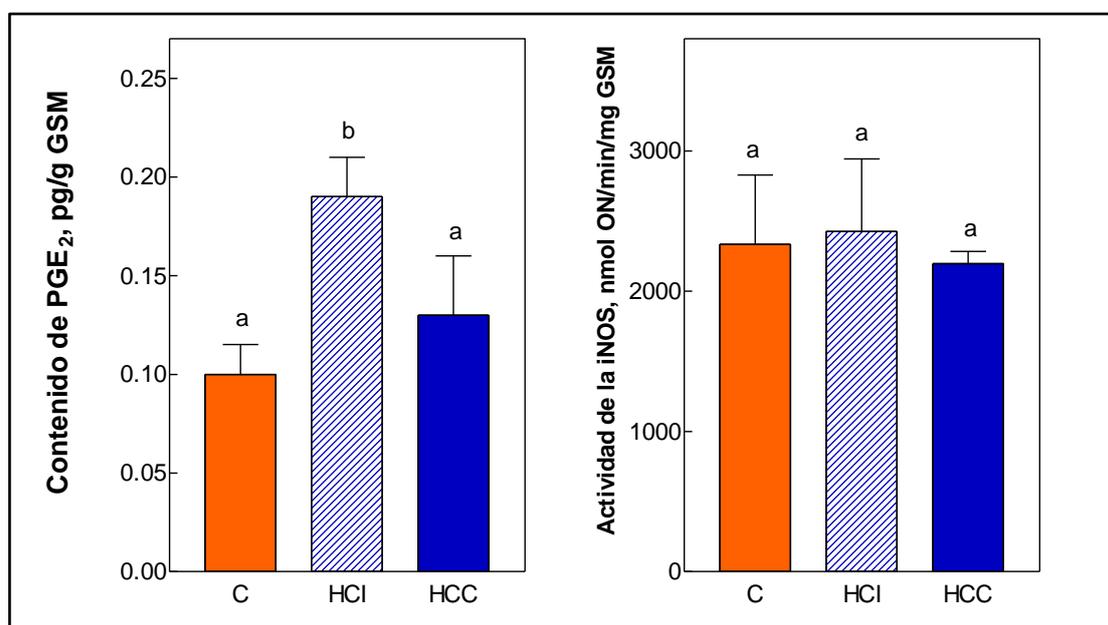


Figura 4.12. Contenido de PGE₂ (izquierda) y actividad de la iNOS (derecha) en GSM de animales adultos expuestos a HX durante y 3 meses. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

8. Caracterización mitocondrial y estado REDOX en GSM

Fue de nuestro interés continuar el estudio de las GSM caracterizando el estado REDOX de dicho órgano, ya que uno de los principales mecanismos deletéreos de la exposición a HX es el incremento del estrés oxidativo celular. Además, teniendo en cuenta el papel de las mitocondrias como sensores de O_2 celular, consideramos indispensable su caracterización y evaluación de su estado bioenergético para dilucidar las implicancias de la HX a nivel de esta organela celular. Para ello, en primer lugar tuvimos que caracterizar las mitocondrias de las GSM mediante el consumo de O_2 y la actividad de los complejos mitocondriales para luego evaluar el estado de oxidantes/antioxidantes mitocondriales.

A. Consumo de O_2 mitocondrial

El consumo de O_2 utilizando malato-glutamato como sustrato fue medido en estado 4 (respiración en reposo) y en estado 3 (respiración activa, cuando se da el máximo consumo fisiológico de O_2 y síntesis de ATP, Boveris y cols. 1999). El control respiratorio (CR), el indicador más sensible del acoplamiento de la fosforilación oxidativa, se calculó como la relación entre estado 3/estado 4.

Se evidenció un mayor consumo de O_2 en los animales expuestos a HX ($p < 0,001$). Cuando se utilizó malato-glutamato como sustrato del complejo I, el consumo de O_2 mitocondrial en HCl aumentó un 25% en estado 4 y un 48% en estado 3, mientras que en HCC el aumento fue de 62 y 64% respectivamente. Cuando se utilizó succinato, sólo el grupo HCl aumentó significativamente el consumo de O_2 un 22% en reposo y 21% en respiración activa. El CR en estado 3 fue significativamente mayor en los animales expuestos a HX cuando se utilizó malato-glutamato como sustrato (21% en HCl y 17% en HCC), indicando que las mitocondrias de estos animales muestran una mejor integridad mitocondrial y función oxidativa (tabla 4.10).

Consumo de O ₂ mitocondrial			
	C	HCI	HCC
Malato-glutamato			
Estado 4	5.49±0.36 ^a	6.89±0.58 ^b	8.89±0.49 ^b
Estado 3	35.9±2.4 ^a	53.1±2.6 ^b	58.9±4.7 ^b
CR	6.6	8.0	7.7
Succinato			
Estado 4	24.8±2.2 ^a	30.4±1.6 ^b	24.7±0.9 ^a
Estado 3	81.4±5.7 ^a	98.8±9.0 ^b	90.0±4.5 ^a
CR	3.3	3.3	3.3

Tabla 4.10. Consumo de oxígeno en GSM en C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

Considerando el consumo de O₂ en estado 3 con concentraciones limitantes de ADP se estimó el ADP/O, que da cuenta del número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de O₂ consumido (Magnani N y cols 2013). El ADP/O indica la eficacia de la fosforilación oxidativa, ya que relaciona el consumo de O₂ con la cantidad de ADP utilizada para sintetizar ATP. Cuando el sustrato fue malato-glutamato, las mitocondrias de los animales expuestos intermitentemente a HX mostraron un incremento significativo en el ADP/O del 21% comparado con el grupo control (Figura 4.13, izquierda). Cuando se utilizó succinato, no se encontraron diferencias significativas en el valor de este indicador (Figura 4.13, derecha).

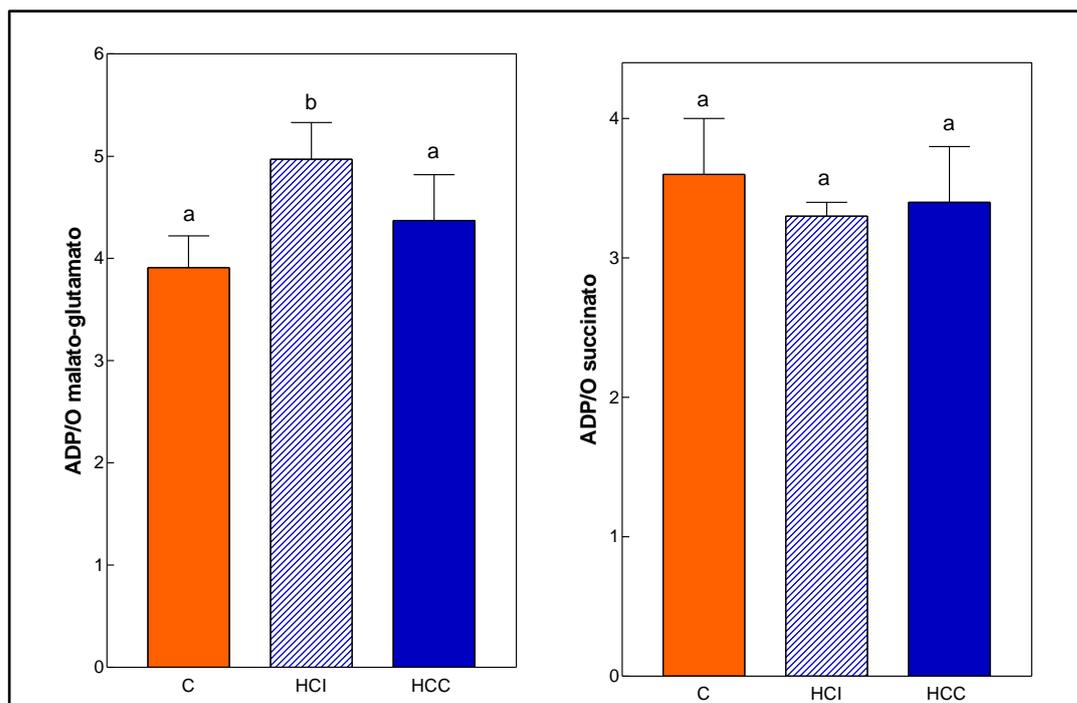


Figura 4.13. ADP/O en GSM en C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

B. Actividad de los complejos mitocondriales

Teniendo en cuenta que los cambios observados en el consumo de O_2 mitocondrial pueden deberse a cambios en la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones, la actividad de los complejos I, II y IV fue analizada. Con respecto a la actividad del NADH-citocromo c reductasa, que representa la actividad conjunta de los complejos I y III, ésta fue 45% mayor en los animales expuestos a HCC ($p < 0,001$, Figura 4.14 A). La actividad de succinato-citocromo c reductasa (complejos II y III) y de citocromo oxidasa (complejo IV) permanecieron sin alteraciones durante la exposición a HX (Figura 4.14 B y C)

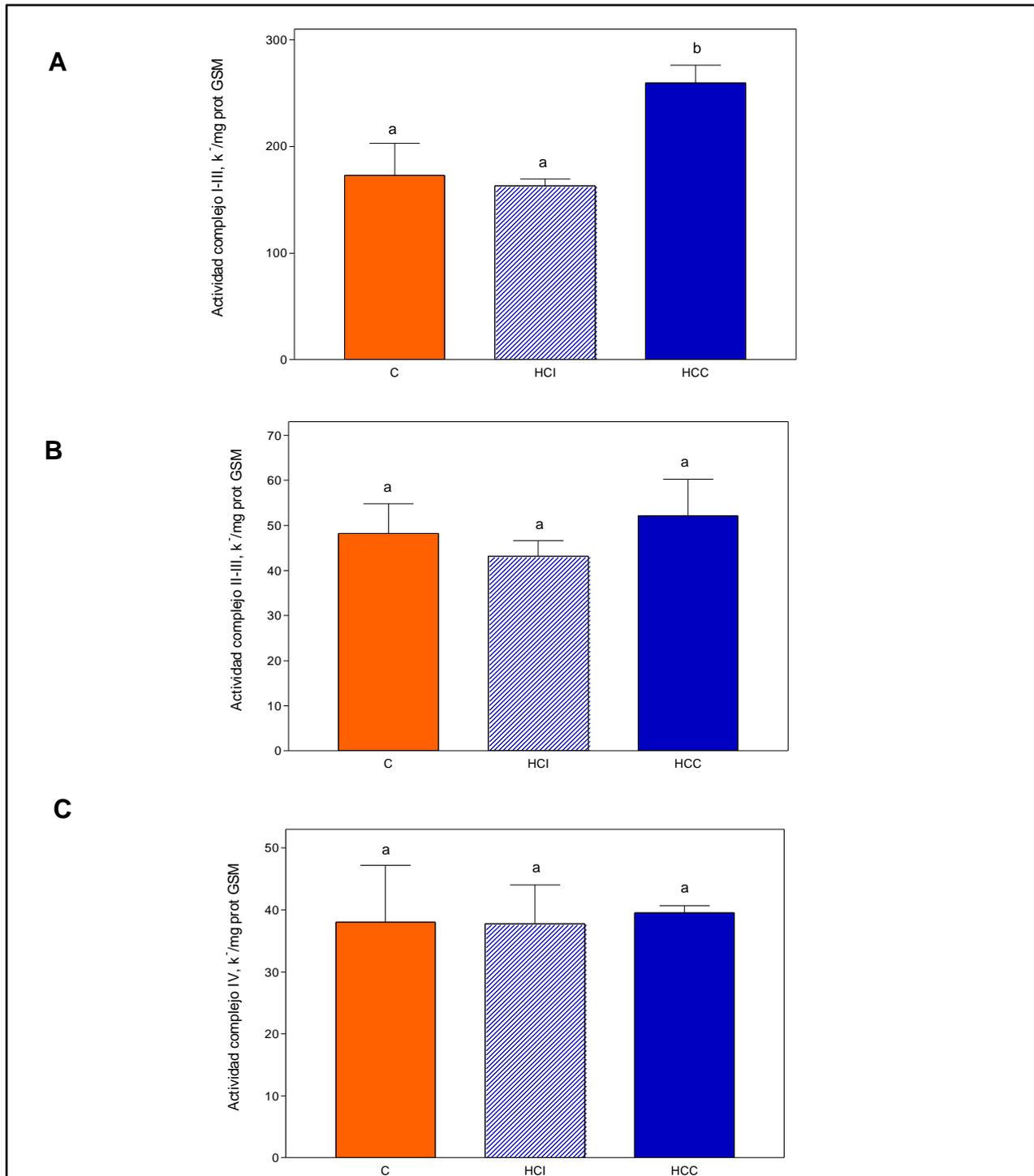


Figura 4.14. Actividad de los complejos mitocondriales I-III (A), II-III (B) y IV (C) en GSM de C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

C. Velocidad de producción de H_2O_2 mitocondrial

Con el fin de analizar los posibles cambios en el estado redox en mitocondrias y citosol de las células de las GSM, la producción de H_2O_2 se evaluó usando malato-glutamato y succinato como sustrato en estado 4. No se encontraron diferencias significativas en la producción de esta sustancia en ninguno de los grupos experimentales con ninguno de los sustratos utilizados (Figura 4.15).

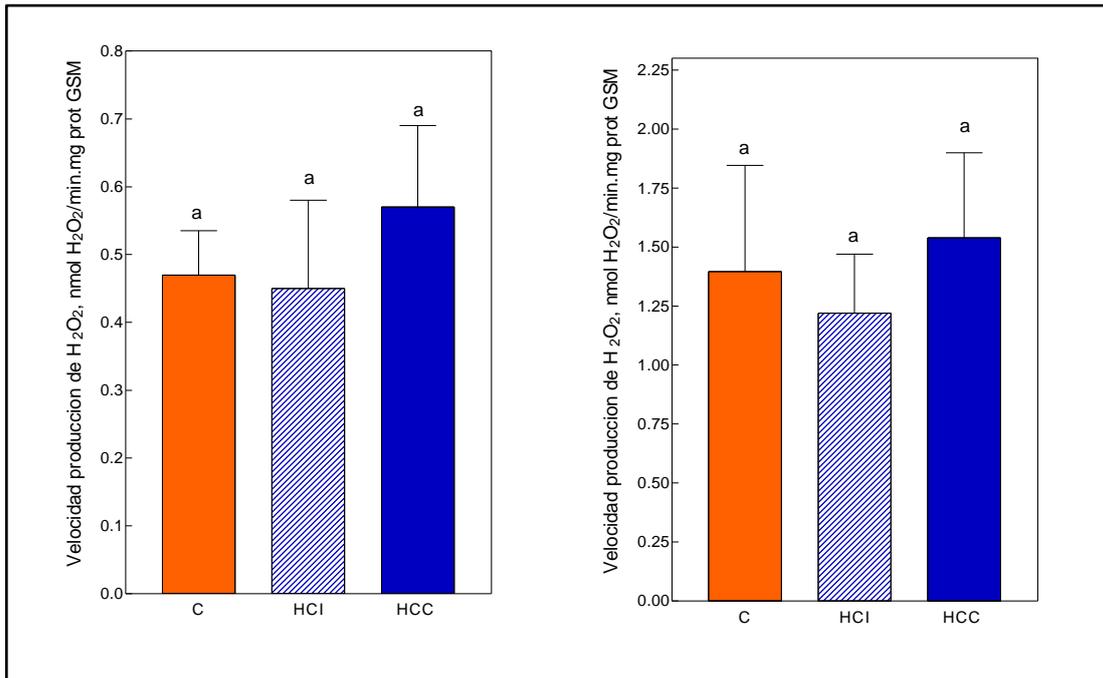


Figura 4.15. Efecto de la HX sobre la velocidad de producción de H_2O_2 en mitocondrias de GSM. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

D. Actividad de la superóxido dismutasa

La SOD es una enzima que cataliza la descomposición de O_2^- en O_2 y H_2O_2 . El O_2^- es un producto del metabolismo del O_2 en la cadena respiratoria. Se evaluó la actividad de la SOD mitocondrial, la cual es principalmente Mn-SOD y la actividad total, que consiste en la sumatoria de la actividad de la Mn-SOD mitocondrial y la Cu, Zn-SOD citosólica. En la figura 4.16 se observa que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de ambas enzimas de ninguno de los grupos analizados.

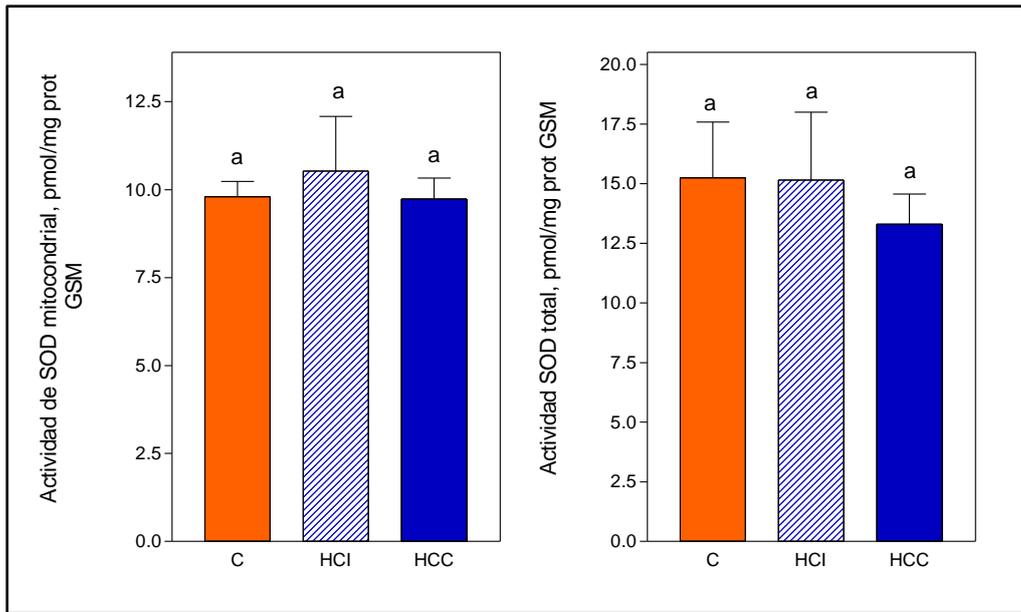


Figura 4.16. Actividad de la SOD mitocondrial y total en GSM de C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua.

E. Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Las TBARS se midieron en GSM entera (a diferencia de los estudios anteriores en donde sólo se analizaron las distintas variables a nivel mitocondrial). Este indicador de peroxidación lipídica fue significativamente mayor en GSM de los dos grupos expuestos a HX, indicando un efecto deletéreo de dicha condición ambiental a nivel glandular (figura 4.17).

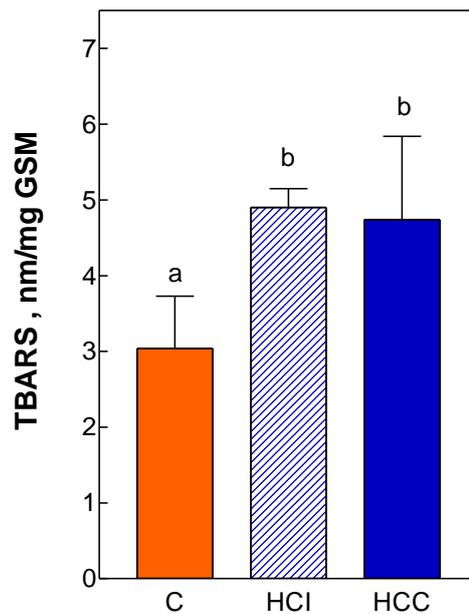


Figura 4.17. Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) en GSM de C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Letras distintas indican diferencias significativas.

9. Niveles de ARNm de AQP-5 en GSM

Los niveles de ARNm de AQP-5 en GSM fueron menores en los animales expuestos a HCl y HCC con respecto al control (tabla 4.11), por lo que se podría relacionar este resultado con la menor secreción salival observada en ambos grupos hipóxicos.

	C	HCl	HCC
Niveles ARNm AQP-5 (UA)	6,03±1,23 ^a	2,37±0,73 ^b	1,10±0,75 ^b

Tabla 4.11. Niveles de ARNm de AQP-5 en GSM de ratas expuestas a HX durante 3 meses. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) ARNm AQP-5/ β -actina. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua

10. Análisis histológico de las GSM

A. Histología de rutina (H&E)

En una primera instancia se realizaron tinciones de rutina (H&E) para obtener una primera aproximación de la histoarquitectura glandular. En la figura 4.18 se pueden observar las microfotografías de los cortes de GSM teñidos con H&E. No se encontraron alteraciones en el parénquima glandular de los animales expuestos a HX. Un mayor número de vasos sanguíneos fue evidente en ambos grupos hipóxicos, en concordancia con lo publicado en la literatura (Scott & Gradwell, 1989; Terrizzi y cols., 2014), estando más vasodilatados en HCC. Este resultado era esperable y se relaciona con los esfuerzos del órgano para mantener la fisiología del parénquima glandular en condiciones de bajo aporte de O₂.

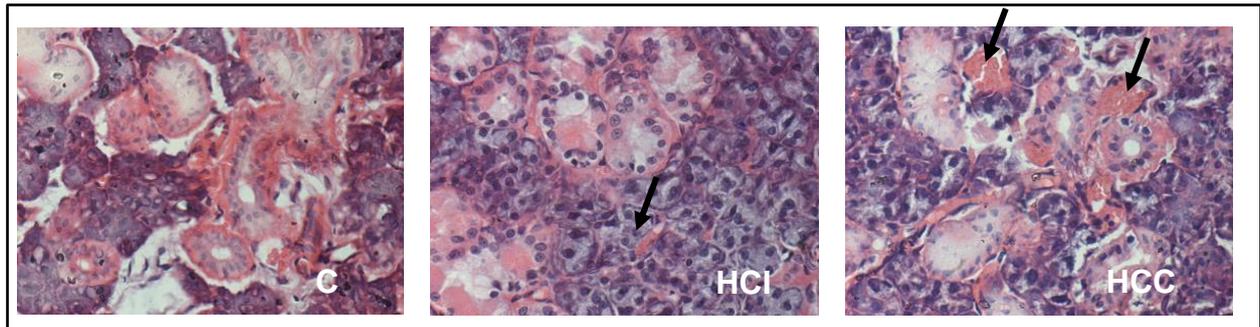


Figura 4.18. Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (40X). C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. Las flechas señalan los vasos sanguíneos.

B. Inmunohistoquímica de HIF-1 α y AQP-5

Luego de analizar las GSM mediante histología de rutina, determinamos la presencia de HIF-1 α en el tejido glandular mediante inmunohistoquímica (IHQ). Como era esperable, se evidenció ausencia de coloración en el grupo C (Figura 4.19 A, izquierda), lo que indica que existe escasa activación de este factor de transcripción en NX. Las GSM de los animales expuestos a HX mostraron mayor marcación de HIF-1 α en el citoplasma celular de los acinos serosos y conductos, con poca o ninguna coloración en los acinos mucosos. Las glándulas de los animales de HCl mostraron una coloración irregular (figura 4.19 A, medio). En cambio, el grupo HCC mostró un marcado aumento de la inmunorreactividad de HIF-1 α , con precipitado uniforme (Figura 4.19 A, derecha). En resumen, sólo la exposición continua a HX fue capaz de aumentar la inmunorreactividad de este factor de transcripción. La exposición intermitente no sería tan eficaz como la continua para inducir la activación de HIF-1 α debido a los mayores tiempos de exposición a NX.

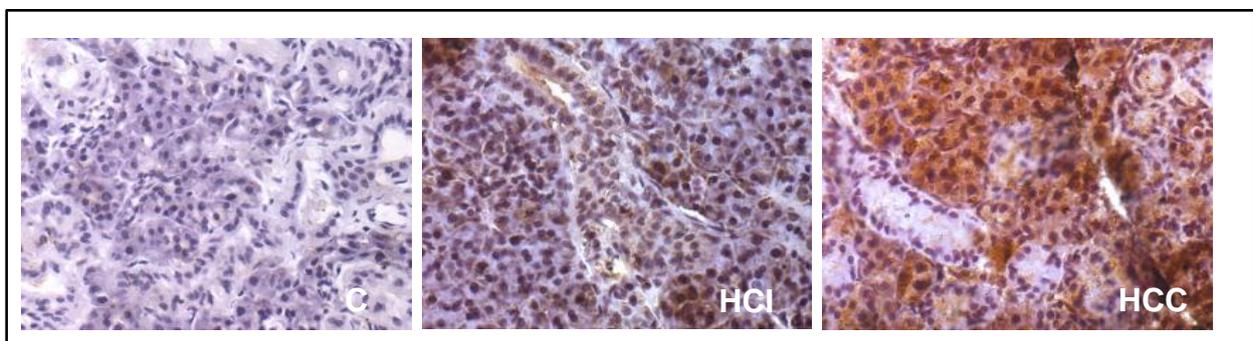


Figura 4.19. Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (40X). La coloración marrón indica estructuras positivas para HIF-1 α . C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua

Al analizar la AQP-5 por IHQ, no se encontraron cambios en su localización ni inmunorreactividad en ninguno de los grupos experimentales (Figura 4.20). La localización de la AQP-5 fue principalmente en los conductos intercalares y en los acinos mucosos, con escasa o nula reactividad en los acinos serosos.

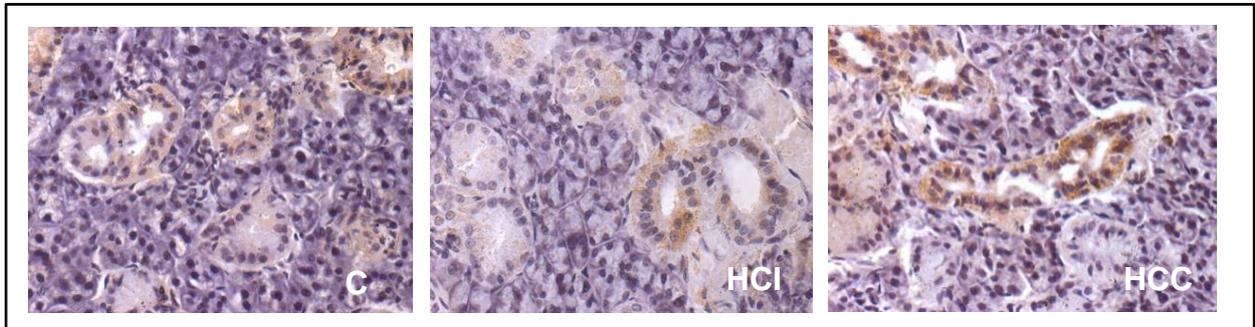


Figura 4.20. A. Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (40X). La coloración marrón indica estructuras positivas para AQP-5. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua

C. Microscopía electrónica de transmisión

La figura 4.21 A muestra fotos de los acinos serosos y mucosos. Se evidencian las células epiteliales sin alteraciones morfológicas en C y HCC. En HCI se observaron numerosos núcleos apoptóticos y menor cantidad de gránulos secretorios. Las mitocondrias de las GSM no mostraron alteraciones estructurales, pero su tamaño fue menor en comparación con las de otros tejidos (Figura 4.21 B).

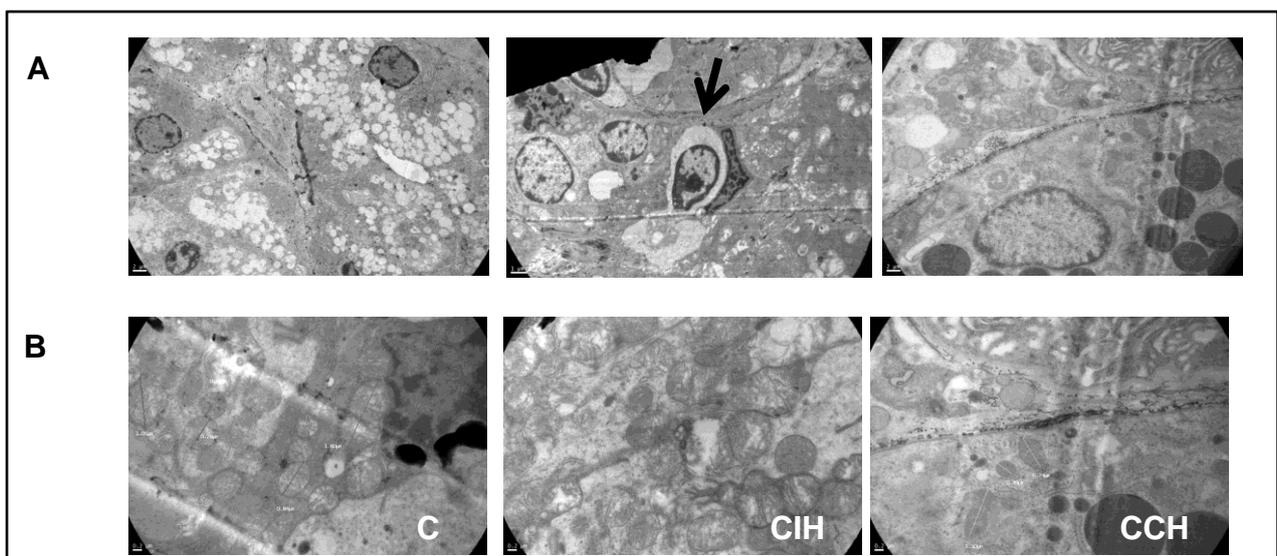


Figura 4.21. A. Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (7000X). Se observan los acinos mucosos y/o serosos. La flecha indica núcleo en apoptosis. C: control, HCI: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua. B. mitocondrias acinares (20000 X).

Con respecto a la estructura de los conductos intercalares, en los grupos C y HCC se observa la estructura normal celular. En las células ductales de los animales expuestos a HCl se evidenciaron núcleos apoptóticos (Figura 4.22 A). Las mitocondrias ductales no conservaron su morfología en ninguno de los grupos expuestos a HX, mostrando irregularidad en las crestas mitocondriales (Figura 4.22 B)

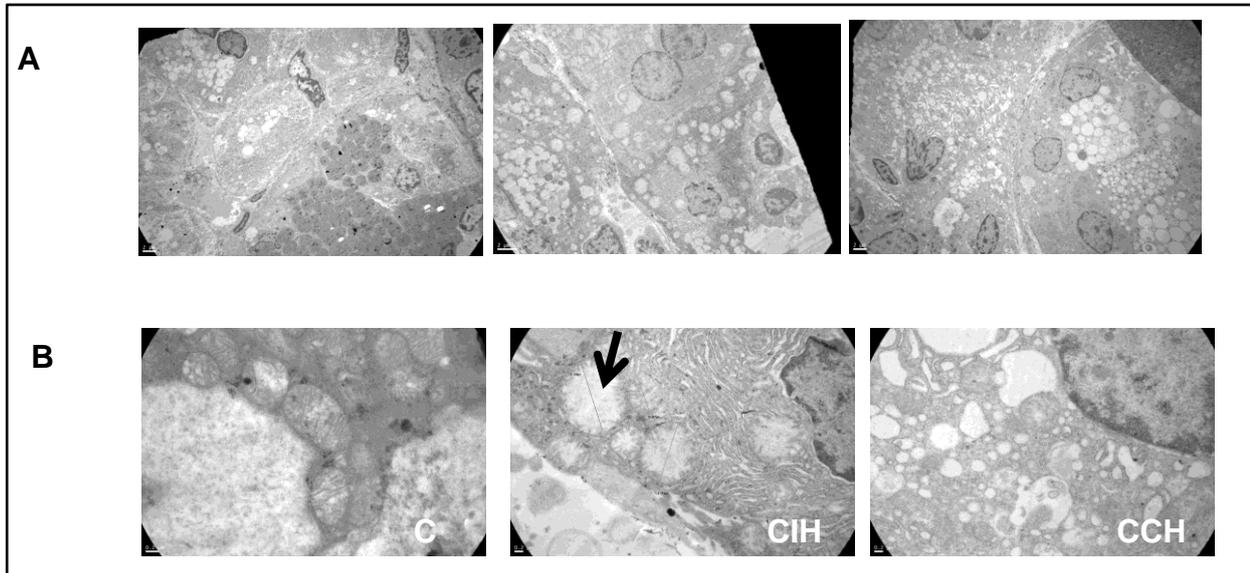


Figura 4.22. A. Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (5000X). Se observan los conductos intercalares. C: control, HCl: hipoxia crónica intermitente, HCC: hipoxia crónica continua **B.** mitocondrias ductales (20000X). Las flecha indica alteración en las crestas mitocondriales.

Objetivo III

EFFECTO DE LA HIPOXIA AMBIENTAL CRÓNICA SOBRE LOS TEJIDOS DE SOPORTE DENTARIO EN RATAS ADULTAS SOMETIDAS A PERIODONTITIS EXPERIMENTAL

En esta serie de experimentos se quiso determinar si la exposición a HX ambiental en sus dos modalidades producía efectos adversos sobre los tejidos de soporte dentario afectados por periodontitis. Para ello se emplearon ratas Wistar hembras adultas a las que se les indujo periodontitis experimental (PE), durante las últimas 2 semanas de exposición a HX, quedando conformados tres grupos (CPE, HCIPE y HCCPE). Se corroboraron los efectos de la PE comparando con un grupo C “puro”, asegurándonos de esta forma que la ligadura haya generado correctamente el desarrollo de la P en los animales (generación de pérdida ósea cortical e interradicular, aumento de la altura del ligamento periodontal). Como fuera mencionado en materiales y métodos, no se mostrarán los resultados correspondientes a la comparación con los grupos controles por haber sido la misma ampliamente expuesta en la literatura (Vacas MI y cols., 2008, Prestifilippo JP y cols., 2012 & 2016, Terrizzi AR y cols., 2013) y porque exceden los objetivos de este trabajo de tesis.

1. Peso corporal, glandular y hematocrito

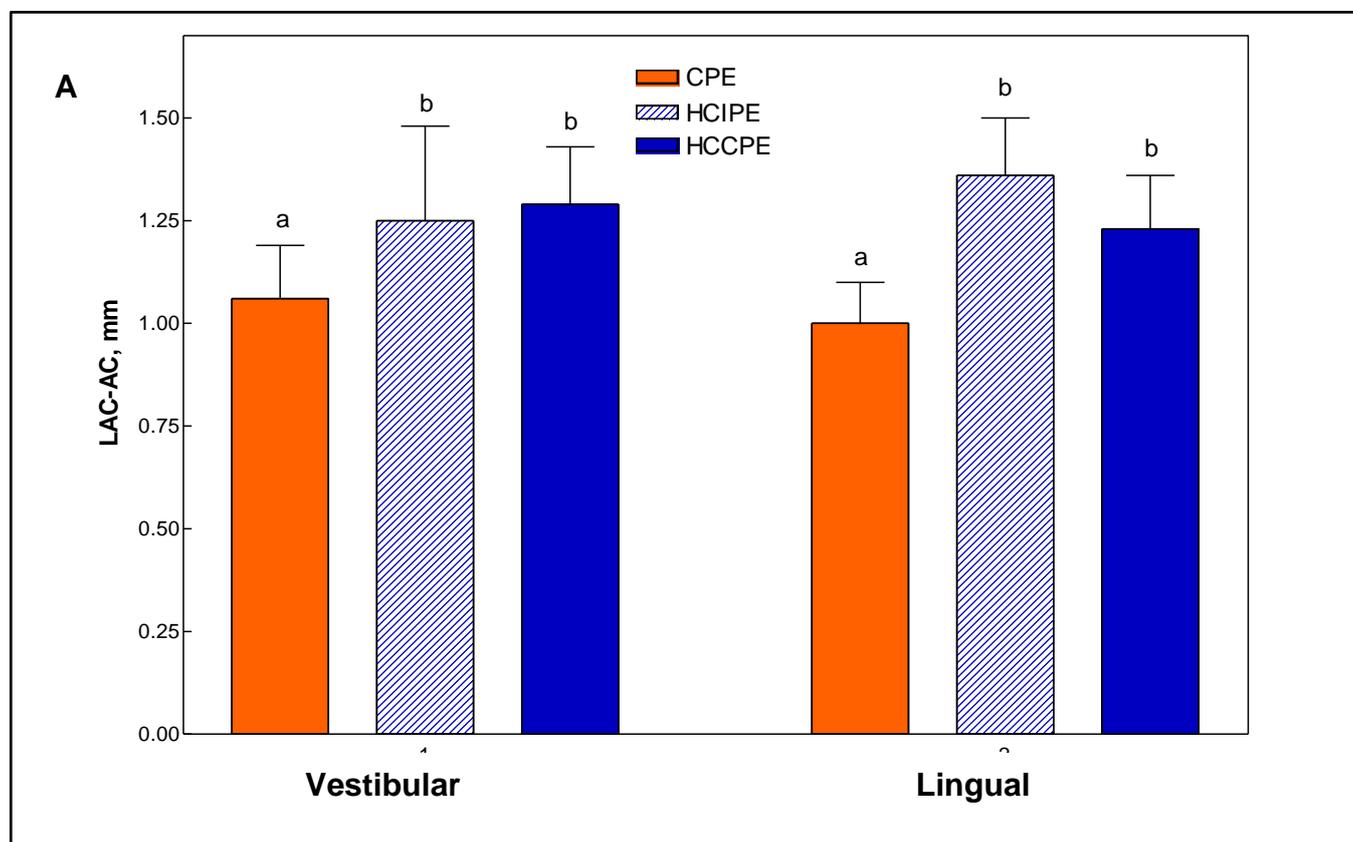
El peso corporal de los animales con PE expuestos a HX fue menor que en los animales CPE al finalizar el período experimental (Tabla 4.12). Esto constituye una diferencia con respecto a los animales adultos expuestos a HX pero sin PE, en donde el peso no se modificó a lo largo del período experimental (objetivo II). Creemos que la colocación de la ligadura y el desarrollo de PE se suman a la exposición a HX como factor estresante para el animal, ejerciendo un efecto negativo en su alimentación (Ito K y cols., 2001). El peso de las GSM no se modificó en ninguno de los grupos hipóxicos con respecto al CPE. El hematocrito aumentó significativamente en los animales expuestos a HX como fue previamente observado en las distintas experiencias de este trabajo de tesis, corroborando el efecto de la HX en los animales.

	CPE	HCIPE	HCCPE
Peso corporal (g)	336.16±28.14 ^a	288.50±13.48 ^b	294.66±16.07 ^b
Peso GSM (mg)	195.32±36.74 ^a	192.64±33.60 ^a	205.17±15.81 ^a
Peso GSM/peso corporal (mg/g)	0.58±0.11 ^a	0.65±0.13 ^a	0.67±0.03 ^a
Hematocrito %	46.83±0.98 ^a	59.5±3.26 ^b	62.7±3.03 ^c

Tabla 4.12. Peso corporal, glandular y hematocrito de ratas CPE (control con periodontitis experimental), HCIPE (hipoxia crónica intermitente con periodontitis experimental), HCCPE (hipoxia crónica continua con periodontitis experimental). Letras distintas indican diferencias significativas.

2. Análisis morfométrico macroscópico del hueso alveolar

La pérdida ósea alveolar cortical se evaluó por el método de la distancia, Tanto a nivel vestibular como lingual, la exposición a HX incrementó la pérdida ósea inducida por la PE (Figura 4.23 A). Es probable que al estar el hueso alveolar debilitado por efecto de la PE, la HX agrave la pérdida ósea a nivel vestibular, hecho no observable en los animales sin PE (objetivos I y II). En la figura 4.23 B pueden observarse fotografías seleccionadas al azar de 1 animal de cada grupo.



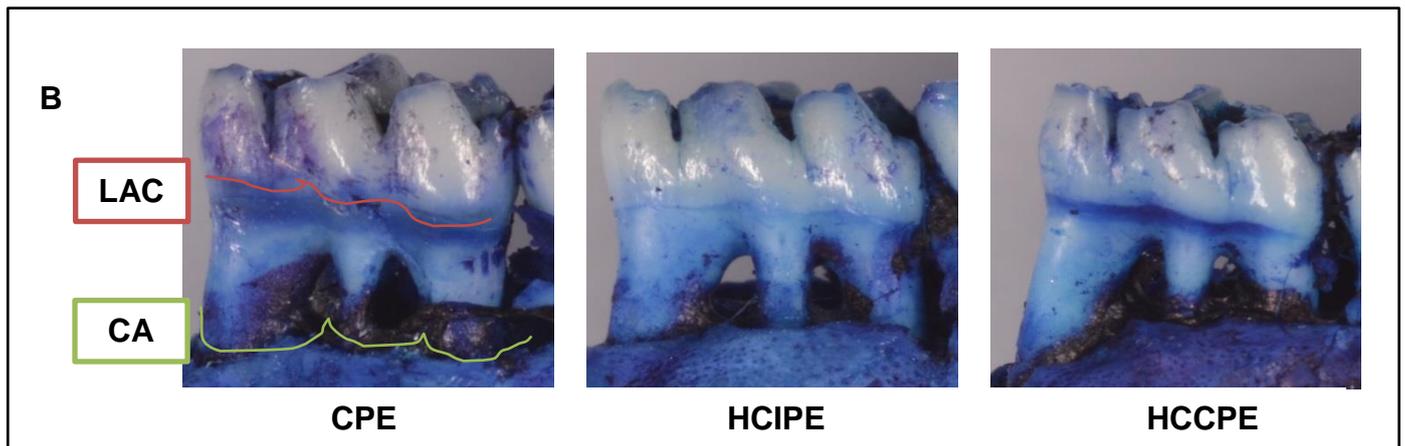


Figura 4.23. A. Pérdida ósea alveolar expresada en mm de la cortical vestibular y lingual del primer molar inferior. Letras distintas indican diferencias significativas. **B.** Fotografías de la cortical lingual del primer molar inferior de un animal seleccionado al azar. CPE: control con periodontitis, HCIPE: hipoxia crónica intermitente con periodontitis, HCCPE: hipoxia crónica continua con periodontitis. LAC: límite amelocementario, CA: cresta alveolar

3. Análisis histomorfométrico del espacio interradicular

Para evaluar el espacio interradicular, sólo se tuvo en cuenta el VO/VT, ya que al existir pérdida ósea por PE, el VO parcial/VT fue imposible de calcular. La exposición a HX no produjo alteraciones óseas adicionales a la resorción inducida por PE. El ligamento periodontal, si bien mostró incrementada su altura debido a la PE, tampoco sufrió alteraciones significativas estadísticamente por efecto de la HX (figura 4.24 A). Estos resultados nos sugieren que los efectos de la HX quedarían “solapados” o enmascarados ante una agresión de la índole de la PE, que causa una gran destrucción ósea a nivel interradicular (figura 4.24 B).

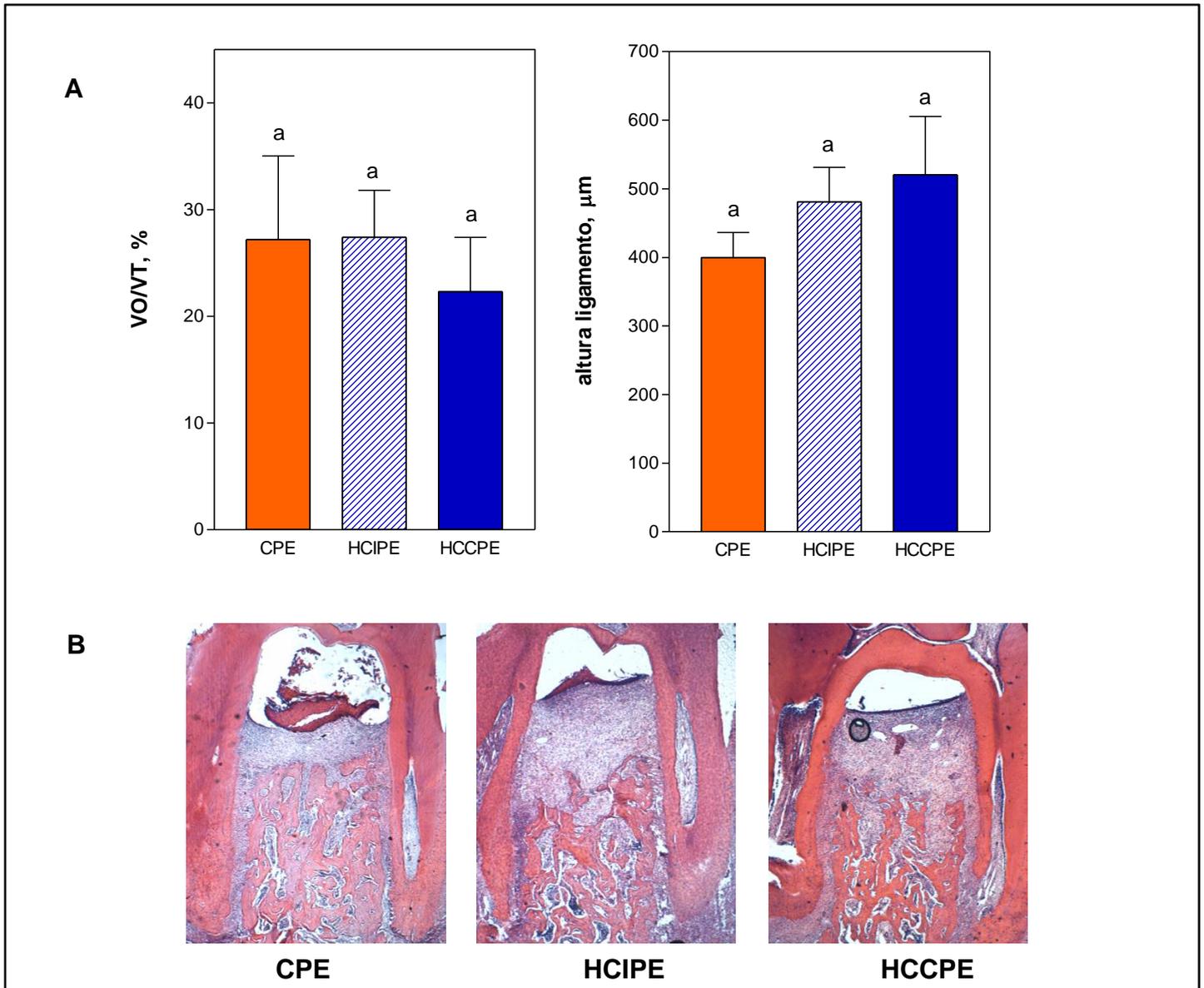


Figura 4.24. A. Pérdida ósea interradicular (expresada como VO/VT) y altura del ligamento periodontal de animales adultos con PE expuestos a HX . **B.** Microfotografías del espacio interradicular del primer molar inferior de un animal seleccionado al azar (10 X). CPE: control con periodontitis, HCIPE: hipoxia crónica intermitente con periodontitis, HCCPE: hipoxia crónica continua con periodontitis.

4. Contenido de PGE₂ y actividad de la iNOS en tejido gingival

Al evaluar el contenido de PGE₂ encontramos valores significativamente mayores en la encía de animales expuestos a HCI y HCC sometidos a PE. Este resultado indica que la exposición a HX ambiental podría exacerbar los niveles de este mediador inflamatorio esencial durante la patogénesis de la enfermedad periodontal. El contenido de PGE₂ fue

mayor en HCC que en HCl. Sin embargo, la actividad de la enzima iNOS en el tejido gingival no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.25 A).

Cabe aclarar que tanto los valores de PGE₂ como de iNOS en encía de animales con PE fueron mayores que en sus correspondientes controles puros, corroborando así la efectividad de la inducción de la P experimental (dato no mostrado).

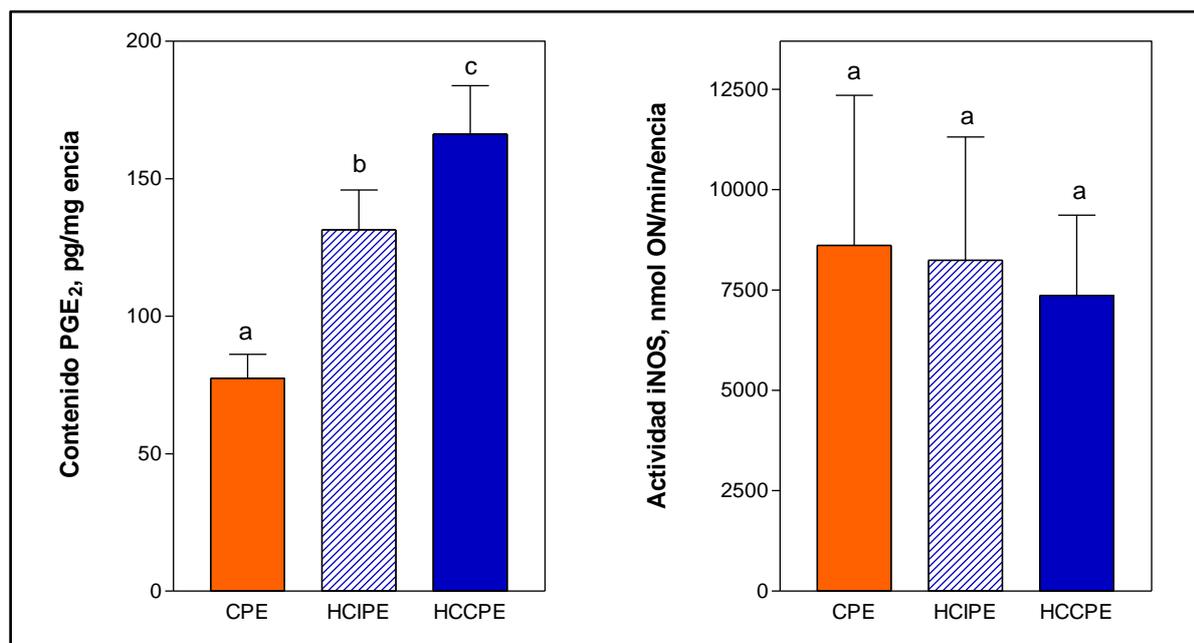


Figura 4.25. Efecto de la HX sobre el contenido de PGE₂ y actividad de la iNOS en encía de animales adultos sometidos a PE. CPE: control con periodontitis, HCIPE: hipoxia crónica intermitente con periodontitis, HCCPE: hipoxia crónica continua con periodontitis. Letras distintas indican diferencias significativas.

5. Secreción salival estimulada

Al igual que para el objetivo II, se evaluó la secreción salival mediante la estimulación con pilocarpina en 3 tiempos experimentales. En el primer intervalo (0-30 minutos) se evidenció una disminución de la secreción salival en ambos grupos hipóxicos con respecto al CPE. El volumen de saliva en HCIPE disminuyó aproximadamente un 15% y el de HCCPE un 40% comparado con CPE ($p < 0,05$ y $0,001$ respectivamente). En el período 30-60 minutos, se mantuvo el mismo patrón de salivación, es decir, menor en los dos grupos expuestos a HX (17% menos de secreción salival en HX intermitente y 40% en continua). Al concluir el período experimental (60-90 minutos), el grupo HCIPE no mostró diferencias

significativas en el volumen salival con respecto al CPE, mientras que el HCCPE presentó una secreción salival menor ($p < 0,05$) (Figura 4.26) Este experimento indica que la exposición a HX afecta la secreción salival en animales sometidos a PE. Además sugiere que la exposición a HCC alteraría más a las GSM que la exposición intermitente en animales sometidos a PE, a diferencia de lo establecido para el objetivo II cuando se estudió la secreción salival estimulada en animales adultos sin PE. Cabe destacar que en todos los experimentos realizados la secreción salival de animales con PE fue menor que los sin PE (dato no mostrado).

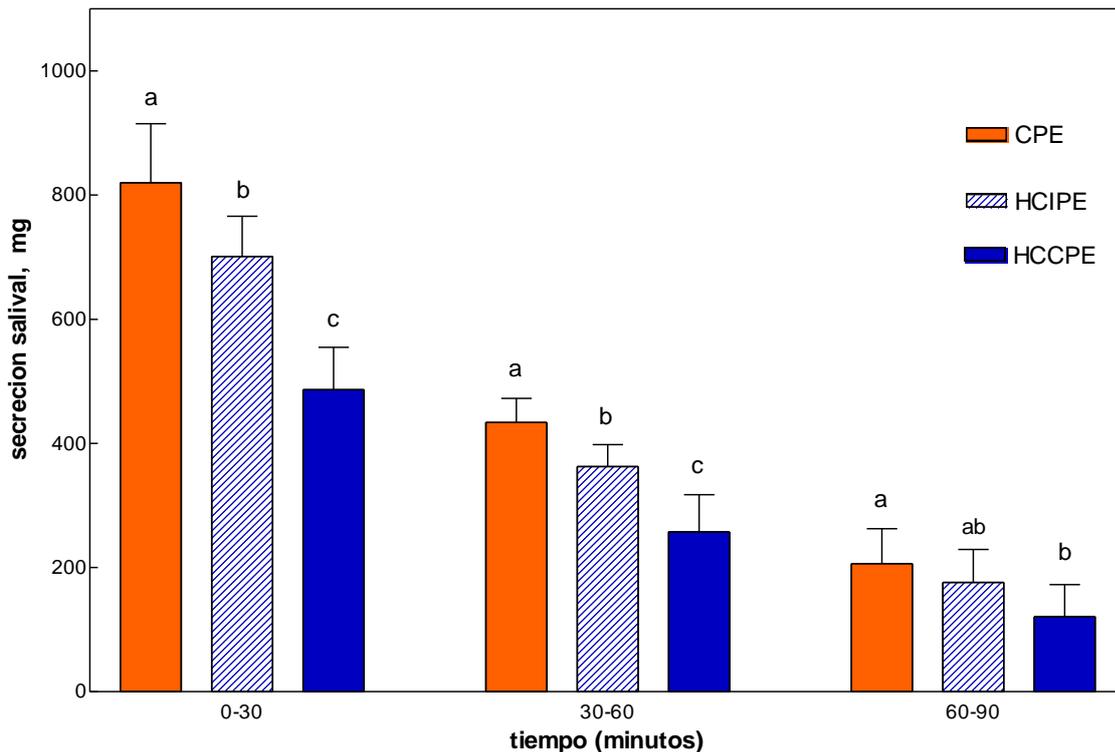


Figura 4.26. Efecto de la HX en la respuesta saliva estimulada por pilocarpina en CPE: control con periodontitis, HCIPE: hipoxia crónica intermitente con periodontitis, HCCPE: hipoxia crónica continua con periodontitis. Letras distintas indican diferencias significativas.

6. Contenido de PGE_2 y actividad de la iNOS en GSM

Al encontrarse alterada la función secretora glandular, se quiso analizar el contenido de PGE_2 y la actividad de la iNOS de igual manera que fuera detallado para el objetivo II, por ser éstos dos indicadores de la funcionalidad de las GSM.

En el primer caso, el contenido de PGE_2 se encontró aumentado significativamente en el grupo HCCPE, sugiriendo este incremento una correlación con el descenso de la actividad secretora mencionado anteriormente (figura 4.27, izquierda).

Con respecto a la actividad de la iNOS, la exposición a HX no modificó la actividad de dicha enzima en la GSM de los animales previamente sometidos a PE (figura 4.27, derecha). Esto sugiere que la disminución de la funcionalidad no se debería a un proceso inflamatorio a nivel glandular.

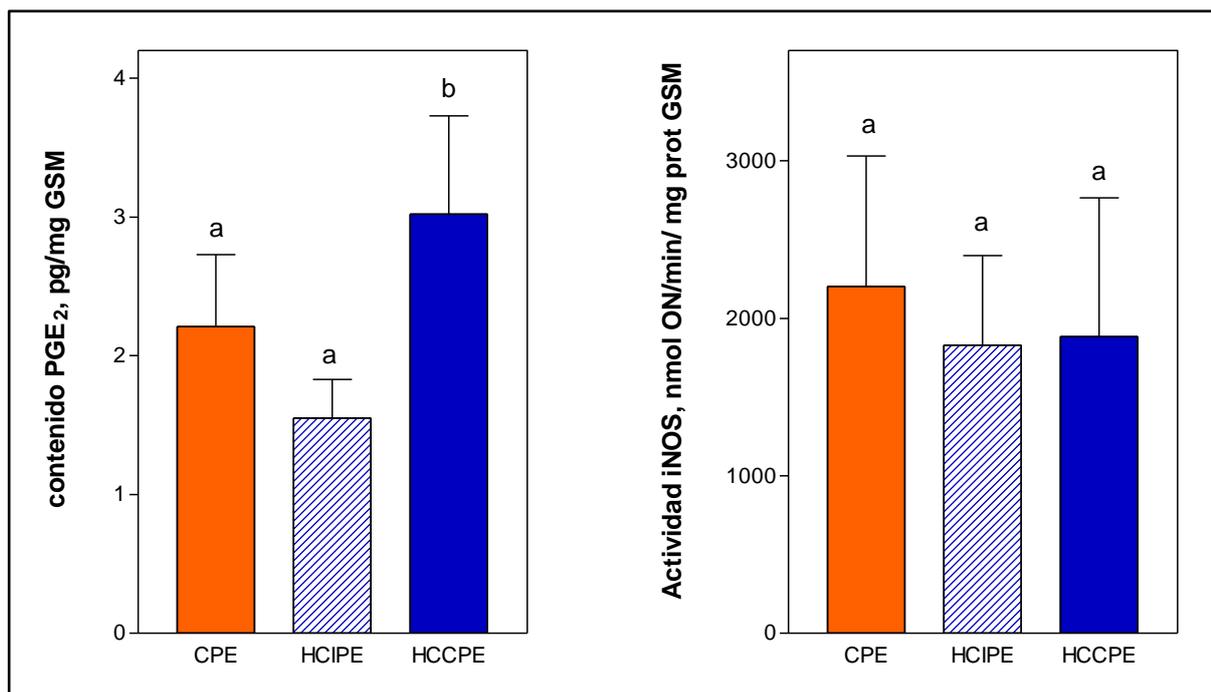


Figura 4.27. Efecto de la HX sobre el contenido de PGE_2 y actividad de la iNOS en GSM de animales adultos sometidos a PE. CPE: control con periodontitis, HCIPE: hipoxia crónica intermitente con periodontitis, HCCPE: hipoxia crónica continua con periodontitis. Letras distintas indican diferencias significativas.

7. Análisis histológico de la GSM

A. Histología de rutina

La figura 4.28 muestra una foto seleccionada al azar de cada grupo experimental. No se observaron alteraciones arquitectónicas en el parénquima ni estroma glandular, en coincidencia con las experiencias de los capítulos anteriores.

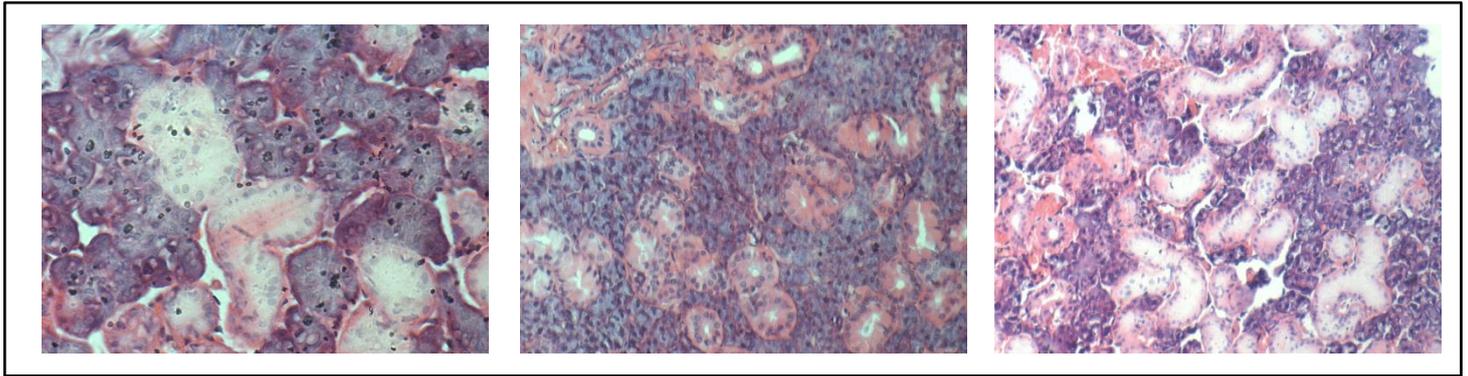
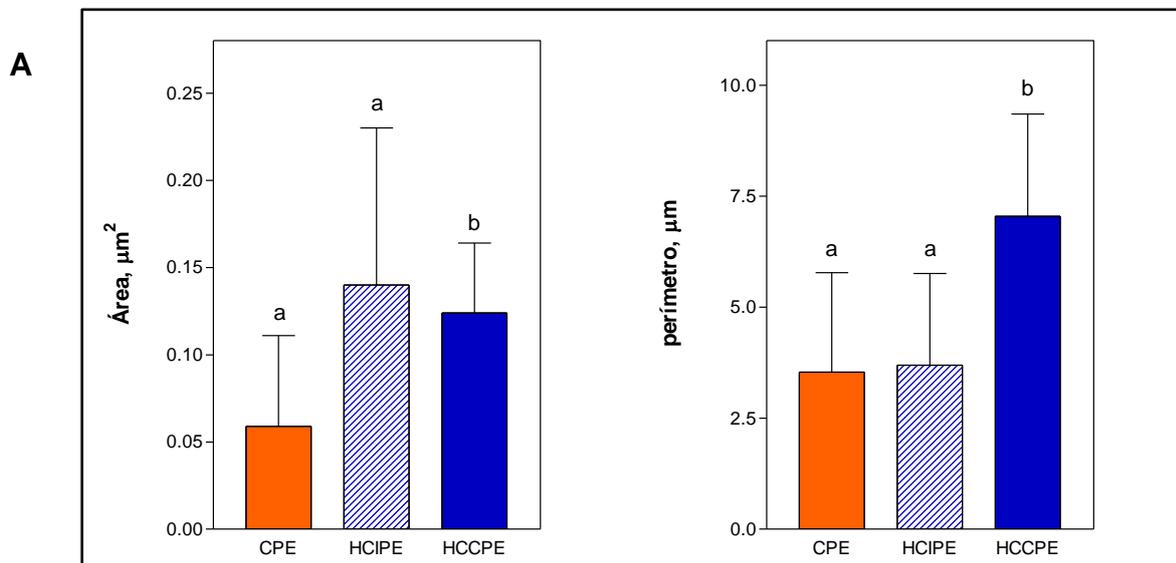


Figura 4.28. Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (40X).

B. Microscopía electrónica de transmisión

Se puede observar una foto seleccionada al azar de las GSM de cada grupo experimental observada mediante el microscopio electrónico de transmisión (figura 4.29). En la misma, se evidencia un aumento del área y perímetro de la unión intercelular, especialmente entre la zona basal del acino y el tejido conectivo circundante (flechas) Estas dilataciones fueron mayores en el grupo HCCPE que HCIPE con respecto a CPE. Cabe aclarar que las mismas no estaban presentes en animales sin PE.



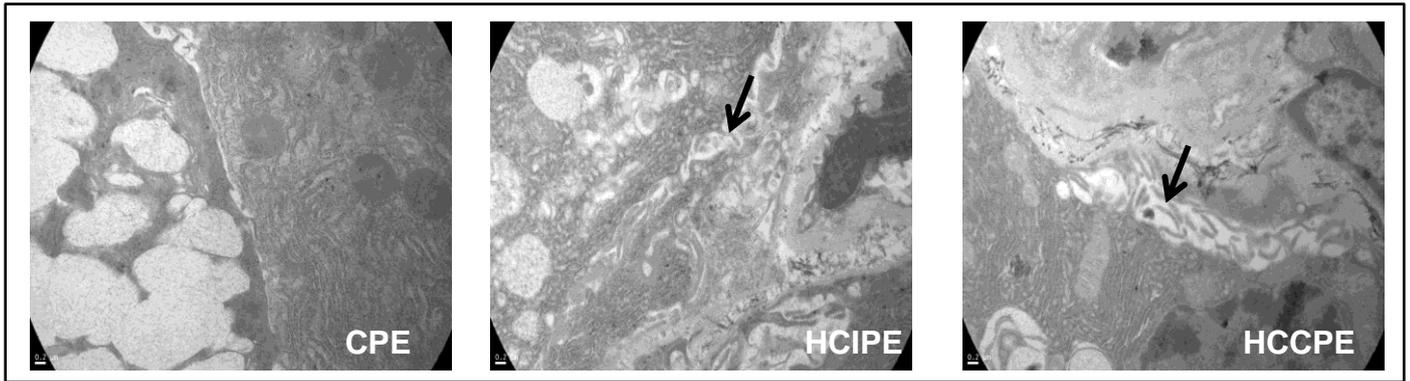


Figura 4.29. A. Efecto de la HX sobre el área y perímetro de la unión intercelular periacinar de GSM de ratas sometidas a PE. **B.** Microfotografías de un preparado de GSM de cada grupo experimental seleccionado al azar (20000X). Se observa una porción acinar rodeada de tejido conectivo. Las flechas muestran espacio intercelular dilatado.

DISCUSION

5. Discusión

En este trabajo de tesis abordamos el estudio del efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario y las GSM de ratas, tanto en crecimiento como adultas. Los resultados obtenidos indican que la exposición a HX produce efectos deletéreos en los tejidos de soporte dentario de ratas hembra, tanto a nivel del hueso mandibular como alveolar. La magnitud de los daños observados depende tanto del tiempo como del tipo de exposición (continua o intermitente), del estadio de vida del animal y de la existencia o no de enfermedad periodontal.

I. Objetivo I Efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario en animales en crecimiento

En primer lugar se discuten los resultados referentes al objetivo I, en el que se trabajó exclusivamente con animales desde el destete con el objetivo de evaluar el efecto de la exposición intermitente o continua a la HX sobre el hueso en crecimiento. El peso corporal y mandibular de los animales se vio negativamente afectado por la exposición a HX, así como también la longitud corporal. Los dos tipos de exposición indujeron disminución de los parámetros analizados, sugiriendo que no existirían diferencias entre la exposición a HCl y a HCC en cuanto al crecimiento longitudinal. Varios autores han publicado resultados en donde se establece el rol perjudicial de la HX sobre el crecimiento corporal y el desarrollo psicomotor, tanto en humanos como en animales (Pawson 1976; Bozzini CE y cols., 2005). Esto se debería a múltiples factores, tales como la menor ingesta de alimento durante el tiempo de duración de la exposición a HX (Bozzini CE y cols., 2005), la alteración de la osificación endocondral de los huesos largos (Conti MI y cols., 2012) y a una menor masa ósea como respuesta adaptativa para un menor consumo de O₂ corporal (Lezón CE y cols., 2016).

Con respecto al hematocrito, ambos grupos hipóxicos mostraron un aumento de este valor en comparación con el grupo C. Este resultado era esperable, ya que durante la exposición a hipoxia, la médula ósea aumenta el número de glóbulos rojos para hacer frente a los niveles disminuidos de O₂, con el fin de mantener un adecuado aporte del gas a los tejidos.

Hasta el momento, no existen reportes en la bibliografía que analicen los efectos de la exposición intermitente o continua a una altura simulada de 4000 msnm en forma simultánea sobre la biomecánica mandibular. Ha sido ampliamente estudiado el efecto de la

exposición a HX sobre la biomecánica femoral de la rata en distintas etapas de la vida postnatal. Estudios previos de otros autores han demostrado que la exposición continua a 5400 metros de altura simulada daña significativamente la biomecánica femoral de ratas en crecimiento, con disminución del contenido de calcio óseo (Bozzini CE y cols., 2005, Bozzini C y cols., 2009). Además, la exposición intermitente a dicha altura también induce cambios negativos a nivel femoral en ratas en crecimiento, disminuyendo significativamente la capacidad del hueso de soportar cargas (Conti MI y cols., 2012). También se han reportado efectos deletéreos de la HX sobre el crecimiento y la biomecánica mandibular (Martínez MP y cols., 2011, Conti MI y cols., 2012a, Hosomichi J y cols., 2017), pero los estudios publicados evaluaron dichas propiedades en huesos de animales sometidos a más de 5000 msnm, altura superior a la que se encuentran las poblaciones humanas con mayor número de habitantes que habitan en la altura (Environmental Archives, 2013). En este trabajo de tesis, evaluamos las propiedades biomecánicas de la mandíbula de ratas al destete en condiciones de hipoxia intermitente y continua. En primer lugar, al analizar las propiedades estructurales del hueso entero, evidenciamos que la exposición a HX afectó negativamente las propiedades estructurales, conduciendo a una menor capacidad del hueso mandibular a soportar cargas. Dichas propiedades se vieron más afectadas en HCI que en HCC, probablemente por una mayor dificultad para el hueso mandibular expuesto intermitentemente para lograr la aclimatación al medio hipóxico. Para entender el porqué de la disminución de las propiedades estructurales hay que tener en cuenta las características del material óseo (propiedades materiales) y su distribución en el espacio (propiedades geométricas). Los valores inferiores del módulo de Young (E) en HCI y del estrés elástico en el punto de cesión en ambos grupos hipóxicos sugieren alteraciones a nivel del tejido, independientes de la forma del hueso, que serían mejor compensados cuando el animal es expuesto continuamente a HX. Al analizar las propiedades geométricas, hay que tener en cuenta que el hueso intenta acomodar su geometría para adaptarse a las condiciones biomecánicas desfavorables. Es sabido que el fémur sufre una periferilización de su cortical para aumentar la resistencia a la fractura durante la exposición a HX (Wainwright SA y cols., 1980, Ferretti JL y cols., 1997). En nuestros estudios, la menor área cortical y el menor Iz de los grupos hipóxicos con respecto al C indicarían un intento del hueso mandibular para acomodar su geometría en afán de resistir de mejor manera las fuerzas masticatorias, pero sin lograrlo eficazmente. Según lo antedicho, la disminución de las propiedades biomecánicas mandibulares parecería ser mayor durante la exposición intermitente a HX. Dado que las demandas biomecánicas del hueso en ambos grupos son similares (entre otras, las fuerzas masticatorias del animal y el acto de roer) podría descartarse al estímulo biomecánico como causante del diseño óseo diferencial entre los grupos HCI y HCC. Tampoco se debería a que el hueso en HCI es de un menor tamaño que en HCC, ya que el

peso de la hemimandíbula de ambos grupos no mostró diferencias significativas. Sabiendo que el hueso responde a necesidades endócrino-metabólicas para mantener el metabolismo mineral, es esperable que en el animal en crecimiento sometido al ambiente hipóxico, el tejido óseo deba responder a dichas demandas sistémicas y pueda ver alterado su diseño. El hecho de que se observen mayores alteraciones en las propiedades biomecánicas del hueso mandibular bajo condiciones de hipoxia intermitente podría responder a que en el caso de la exposición continua, el organismo (y por lo tanto el tejido óseo) tendría la posibilidad de adaptarse al entorno hipóxico, mediante mecanismos que intenten corregir las alteraciones materiales del mismo.

Con respecto al hueso alveolar, es sabido que a lo largo de la vida de la rata, especialmente durante los primeros 100 días, tienen lugar procesos de remodelación que afectan la relación entre los molares y el margen alveolar (Hoffman MM & Schour I, 1940, García MF y cols., 2009). En las experiencias con animales en crecimiento, la exposición a HX incrementó la pérdida ósea cortical lingual medida como distancia entre LAC-CA, sin tener efectos a nivel vestibular. Esto podría deberse a la delgadez de la cortical lingual que se ve más afectada por el trauma masticatorio y por la tendencia a la resorción centrífuga en el sector posterior de la mandíbula (Weijjs WA, 1975). Además, la inclinación lingual de las piezas dentarias determina que las fuerzas de la mordida repercutan mayormente sobre el ápice de las piezas y la tabla lingual más que en la vestibular. Esta pérdida ósea no estaría asociada a microorganismos de la placa bacteriana o sustancias derivadas de ellos, ya que la pérdida de hueso alveolar se observa también en ratones libres de gérmenes (Baer PN y Newton WL, 1959). De hecho, en condiciones normales la rata es resistente a las enfermedades periodontales a diferencia de los seres humanos, aunque se puede inducir como establecimos para el objetivo III. Cabe mencionar además, que en los roedores existe una correlación entre el avance de la edad y la pérdida ósea, atribuyéndose la misma a un desbalance entre los mecanismos de reabsorción y neoformación óseos (Misawa y cols, 2007). Además, la tasa de erupción es mayor que la tasa de aposición ósea en la cresta alveolar, por lo que la distancia LAC-CA aumenta en función del tiempo (Belting y cols 1953). Si bien al envejecer los animales aumenta la pérdida ósea, la comparación entre el C y los grupos hipóxicos indica una mayor pérdida ósea debida a la exposición a HX. A nivel histológico, el hueso trabecular interradicular también sufrió alteraciones durante la exposición a HX. En ambos casos, se produjo una disminución significativa del volumen óseo trabecular (VO/VT) y del volumen óseo parcial (VO parcial/VT), sin evidencia del desarrollo de un proceso inflamatorio. En HCC se observó además, un incremento en la altura del ligamento periodontal, lo cual podría deberse a una remodelación del espacio periodontal por efecto del trauma masticatorio. Dada la ausencia de signos compatibles con

una respuesta inflamatoria, consideramos que la resorción ósea observada en este modelo experimental podría deberse a una expansión de la médula ósea en un intento de los animales de aclimatarse al ambiente hipóxico. Es sabido que en el hueso mandibular, aunque es de un origen embrionario diferente a los hueso largos, se encuentran células hematopoyéticas que podrían dar origen a los glóbulos rojos en caso de necesidad fisiológica (Jiang N y cols., 2016). Además, el hecho de que la exposición crónica a HX aumente la actividad osteoclástica de osteoclastos maduros mediante activación de HIF-1 α (Knowles HJ, 2015), sugeriría que la HX per se estimularía la resorción, sin necesidad de evocar una respuesta inflamatoria.

Para establecer el vínculo entre la pérdida ósea observada y la exposición a HX, se analizaron diversos mediadores inflamatorios involucrados en la resorción ósea que se produce durante el desarrollo de la periodontitis (P). En primer lugar, se evaluó el contenido de PGE₂ y la actividad de la iNOS en encía del primer molar inferior, ya que existe evidencia experimental que relaciona a la PGE₂ y al ON como mediadores de la resorción ósea (Kats y cols., 2013, Herrera BS y cols., 2011, Brennan PA y cols., 2013). En nuestro modelo experimental de ratas en crecimiento, los niveles de PGE₂ en el tejido gingival no se modificaron durante la exposición a HX. Algunos autores han reportado menores niveles de PGE₂ durante exposiciones a HX de larga duración (Zaho L y cols., 2012), lo que podría explicar en parte este resultado. Además, existen reportes en la bibliografía que establecen un efecto inhibitorio del ON sobre la COX-2, enzima responsable de la regulación de la cascada biosintética de las prostaglandinas (Diaz-Cazorla y cols., 1999; Mollace V, y cols., 2005). Se podría suponer, que en el tejido gingival existe un aumento del ON, dado que se evidenció una mayor actividad de la iNOS en dicho tejido. Esta enzima es inducida principalmente durante la inflamación, pero es sabido que la exposición crónica a HX también incrementa su actividad (Jung F y cols., 2000). Por lo tanto, como no se ve un componente inflamatorio en el ligamento periodontal ni en el espacio interradicular, el aumento de la actividad de la iNOS podría considerarse parte de un evento de aclimatación de los tejidos orales a la HX.

Al evaluar estos mediadores en GSM, se observó el mismo patrón que en el tejido gingival. Dado que en la glándula no se evidenciaron signos de respuesta inflamatoria durante la inspección microscópica, puede descartarse la mayor actividad de la enzima como parte de la inducción de la respuesta inmune innata. Creemos que la exposición a HX fue la desencadenante de la mayor actividad de esta enzima para contrarrestar los bajos niveles de O₂ mediante una mayor producción de ON.

II. Objetivo II Efecto de la hipoxia crónica ambiental sobre los tejidos de soporte dentario y la GSM de ratas adultas

En una segunda etapa de experimentos, se evaluó el efecto de la exposición a HX en animales adultos, con el fin de independizarse de la variable “crecimiento”. Además, el hecho de utilizar animales adultos permite extrapolar los resultados obtenidos a los individuos que se trasladan a zonas de gran altitud para trabajar, quienes constituyen una población adulta. En este grupo de experiencias se utilizaron dos tiempos experimentales: 1 mes y 3 meses, con el objetivo de identificar el tiempo óptimo de exposición para notar cambios a nivel óseo.

En primer lugar, al analizar el peso corporal y glandular de los animales tanto a 1 mes como a 3 meses, se evidenció que la exposición a hipoxia no modificó significativamente ninguno de los dos parámetros mencionados. Este resultado coincide con otro publicado por Costa LE y cols., 1979, en el cual se reportó que la exposición a HX no modificó el crecimiento ni el peso de ratas hembras adultas expuestas a 4700 msnm, pero sí el de los machos. Esta mayor resistencia a la HX en hembras se atribuyó a la presencia de estrógenos, por lo que consideramos que esta puede ser una de las causas por la que no encontramos diferencia en peso y talla. Además, las ratas adultas no modificaron sus hábitos alimentarios cuando fueron expuestas a HX, de modo que el consumo de alimento no se vio alterado (media de $6,26 \pm 1.11$ g/100 g de rata por grupo experimental), descartando de este modo la influencia de la HX en la alimentación.

Luego de 1 mes de exposición a HX, sólo el grupo HCC vio aumentado su hematocrito, siendo este tiempo experimental insuficiente para inducir policitemia en HCI. A los 3 meses, el hematocrito aumentó significativamente en ambos grupos hipóxicos, indicando un aumento en la eritropoyesis, mayor en HCC que en HCI. Este resultado era esperable, ya que los animales del grupo HCI pasan más tiempo en normoxia, no siendo necesario un aumento de la volemia globular de la misma magnitud de aquellos que están continuamente en HX.

Al analizar las propiedades biomecánicas mandibulares en los animales adultos, no se encontraron diferencias significativas en las propiedades estructurales ni geométricas en ninguno de los grupos experimentales, ni a 1 ni a 3 meses de exposición a HX. Es probable que los animales adultos, al haber completado su crecimiento, no sufran los mismos efectos de la hipoxia que se observaron en animales en crecimiento y que fueron descritos en el

objetivo I. Estos resultados están en concordancia con los publicados por Bozzini C y cols., 2013, quienes sometieron a ratas en crecimiento a distintas alturas experimentales y sólo obtuvieron cambios en las propiedades biomecánicas femorales cuando la talla de los animales difería, ya que los mismos presentaban una menor masa ósea. Sólo se encontró disminuido el E en HCI y HCC al cabo de 3 meses, sugiriendo que la rigidez del material óseo se encuentra alterada. De todas maneras, la alteración de sólo este factor no fue determinante para provocar un aumento del riesgo de fractura mandibular.

Durante la evaluación macroscópica del hueso alveolar cortical mediante el método de la distancia, se encontró que la tabla lingual de los animales expuestos durante 3 meses a HX sufrió resorción ósea, siendo mayor en HCI que en HCC. La tabla vestibular no sufrió alteraciones, como fuera explicado durante el desarrollo del objetivo I. Con respecto a la pérdida ósea interradicular, se encontró un VO/VT disminuido solamente en el grupo HCI expuesto durante 3 meses. Este resultado sugiere que 1 mes de exposición a HX no es suficiente para generar cambios a nivel óseo interradicular y que luego de 3 meses, los animales sometidos a exposición continua parecerían lograr mecanismos adaptativos que les permiten hacer frente al ambiente hipóxico. Al igual que en los animales en crecimiento, la pérdida ósea observada parecería deberse a un aumento de la cavidad medular. Este hallazgo sugiere que la HX induce una respuesta de la médula ósea en la mandíbula, ya sea para aumentar el número de glóbulos rojos o para hacer frente a la resorción ósea. Dado el diferente origen embriológico, y la función de cada tipo de hueso, la mandíbula presenta respuestas discretas frente a estímulos mecánicos, de desarrollo y homeostáticos, en comparación con la tibia o el fémur (Sodek J & McKee MD, 2000). Un ejemplo de esto es la mayor capacidad osteogénica mandibular comparada con la de huesos largos (Aghaloo TL y cols., 2010). La HX es una condición que induce la movilización de células madre hematopoyéticas y mesenquimales de la médula ósea en huesos largos (Takubo K y cols., 2010), pero podemos suponer que también lo hace en la mandíbula cuando la intensidad o duración de la exposición así lo exigen. En relación a la mayor pérdida ósea interradicular del grupo HCI con respecto a HCC, ésta podría ser explicada debido a la mayor tasa de resorción/neoformación en HCI durante los periodos normóxicos a los que están sometidas las ratas de dicho grupo, los cuales impedirían la osteogénesis mandibular (Inagake Y y cols., 2017). En el grupo HCC esto no ocurría, dado el rol osteogénico del HIF-1 α mediante la inducción de citoquinas pro-angiogénicas, tales como el VEGF, mejorando de esta manera el balance entre neoformación/resorción ósea (Knowles HJ, 2015). Si bien no hemos analizado la expresión de este factor de transcripción en las células de la médula ósea mandibular, es muy probable que exista una mayor expresión de HIF-1 α en respuesta a HCC, tal como se observó en la GSM. El aumento de CTXI en suero de animales

expuestos a HCl en comparación con C y HCC también nos conduce a pensar que existe una resorción ósea a nivel general, no solo mandibular, que podría deberse a la incapacidad del organismo de adaptarse eficazmente a HCl. Además, es necesario relacionar la mayor pérdida ósea observada en HCl con la hiposalivación presente en este grupo. Si bien HCC también vio afectada negativamente su tasa de secreción, la disminución fue de alrededor del 50%, comparada con el 95% en HCl. Los menores niveles de saliva llevarían a una menor efectividad en el proceso masticatorio, dificultando la masticación, lubricación y deglución del alimento en el animal. De este modo, se generaría un incremento de las cargas aplicadas sobre los molares de la rata con mayor atrición, abrasión y/o erosión (Addy M & Shellis RP, 2006) que modificarían los parámetros morfológicos del área alveolar.

La PGE₂ es uno de los eicosanoides más vinculados con la inflamación periodontal, ya que estimula la resorción ósea llevando a la pérdida de inserción dental (Ossola CA y cols., 2012). Al cabo de un mes de exposición a HX, los niveles de PGE₂ en encía no sufrieron modificaciones en ninguno de los grupos experimentales estudiados con respecto al control. Al cabo de 3 meses, la exposición intermitente a HX elevó los niveles de este mediador inflamatorio, no viéndose este efecto en animales expuestos continuamente a HX. Si bien la PGE₂ se asocia con inflamación periodontal, no se evidenció infiltración linfocitaria en la encía de ninguno de los grupos utilizados para este trabajo. Es por eso que creemos que, si bien existe un aumento del contenido de PGE₂ en la encía de los animales expuestos a HCl, el mismo no sería consecuencia de una respuesta inflamatoria en dicho grupo. En este trabajo se analizó además la actividad de la iNOS, enzima que cataliza la conversión de arginina en ON, molécula ampliamente distribuida en el organismo con diversos efectos que dependen del tejido en el que se encuentre. En el periodonto, si bien la presencia de ON puede relacionarse con mecanismos de defensa innata, su exceso ha sido vinculado a destrucción periodontal y numerosos artículos de la literatura han reportado su aumento en casos de periodontitis (UgarCankal D & Ozmeric N, 2006). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima en tejido gingival de HCl, grupo en el que se evidenció pérdida ósea, pero si en HCC, donde incrementó su actividad. Al no observar infiltrado inflamatorio en los tejidos gingival y periodontal, se puede suponer que la iNOS no está siendo inducida como producto de la respuesta inflamatoria en estos animales y podría deberse a una activación como producto de la exposición a HX. Además, el aumento del contenido de PGE₂ en encía del grupo HCl podría estar ejerciendo un efecto inhibitor sobre la actividad de la iNOS en este grupo. Dado que el balance resorción/neoformación depende de una gran cantidad de mediadores, sería necesaria la evaluación de un mayor número de moléculas clave para dicho proceso, con el fin de llegar

a una conclusión sobre qué factores están implicados en la resorción ósea alveolar en nuestro modelo experimental.

En este trabajo de tesis se ha demostrado que la exposición a una altura simulada de 4200 metros sobre el nivel del mar disminuye la secreción salival total, especialmente cuando la exposición a HX se da en forma intermitente. Otros autores han reportado un menor flujo salival en animales o humanos sometidos a HX (Pilardeau P y cols., 1990; Elverdin JC y cols., 1995), pero ninguno de ellos fue desarrollado en alturas en donde habitualmente se desarrolla la vida humana. Para entender los mecanismos asociados a la disminución del flujo salival, muchos factores deben ser analizados. En primer lugar, hay que descartar diferencias anatómicas entre las GSM de los animales para eliminar la influencia nutricional en los resultados. En los animales adultos elegidos para estudiar la secreción salival como parámetro de función glandular, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal ni glandular entre ninguno de los grupos analizados. Esto se relaciona con el hecho de que los animales adultos de nuestro modelo experimental no disminuyeron su ingesta alimentaria durante la exposición a HX, permitiendo un similar crecimiento y desarrollo en los distintos grupos. Este hecho no sucede en animales al destete, donde se observa un efecto anorexígeno de la HX, con la consecuente alteración del crecimiento corporal y por lo tanto, glandular (Norese MF y cols., 2002). Cuando se analizaron las características histoarquitectónicas del tejido glandular, no se encontraron alteraciones en el parénquima de las GSM en ninguna de las experiencias llevadas a cabo en el presente trabajo de tesis. Tanto los acinos como los conductos mostraron una estructura histológica normal cuando se los analizó mediante H&E. A nivel del estroma, se observó un aumento en el número de vasos sanguíneos en ambos grupos hipóxicos, con evidente vasodilatación en HCC. Este hecho fue previamente reportado por Scott J & Gradwell E, 1985 quienes asociaron este cambio histológico con un mecanismo adaptativo de la glándula para hacer frente a las bajas concentraciones de O₂. Otros autores han analizado a las GSM bajo el microscopio óptico en diferentes modelos animales donde la secreción salival se encontraba disminuida, pero ninguno de ellos encontró alteraciones parenquimatosas en dicho órgano (Ossola CA y cols., 2016; Prestifilippo JP y cols., 2016) Sin embargo, puede esperarse la presencia de alteraciones ultraestructurales que no pueden ser visualizadas mediante técnicas histológicas de rutina, las cuales podrían estar asociadas con la hiposalivación observada en este modelo experimental. Los estudios de microscopía electrónica revelaron la presencia de gránulos secretorios irregulares en acinos y núcleos apoptóticos en acinos y conductos intercalares de GSM del grupo HCl. Este resultado podría estar indicando que la exposición continua a HX sería más beneficiosa para la célula en términos de adaptación a bajos niveles de O₂, pero no es suficiente para

explicar completamente la disminución de la secreción en ambos grupos hipóxicos. Un menor número de gránulos secretorios se traduciría en una saliva de peor calidad, pero no necesariamente en un flujo salival menor. Por lo tanto, se decidió analizar la localización de AQP-5, una molécula crucial para el mecanismo de secreción salival (Delporte C y cols., 2016). En condiciones de reposo, las glándulas mantienen una secreción basal, mientras que bajo estimulación existe un aumento de la misma debido a la inervación autonómica. El SNA parasimpático induce translocación de la AQP-5 desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical, donde le permite cumplir su función como canal de agua (Ishikawa Y y cols., 2006). El grado de expresión de la AQP-5 o bien su localización celular, pueden encontrarse alteradas en numerosas condiciones fisiopatológicas, tales como síndrome de Sjögren, terapia radiante, diabetes y senescencia (Delporte C y cols., 2016), todas éstas, asociadas con una menor secreción salival. Además, se ha reportado que en condiciones de HX, las AQPs pueden encontrarse en mayor número en diversos órganos, lo que incrementa el flujo de agua (Sugimoto N y cols., 2013). En este trabajo no encontramos diferencias significativas en cuanto a la localización o inmunorreactividad de la AQP-5 en ninguno de los grupos analizados mediante IHQ. Sin embargo, sí encontramos disminuidos los niveles de ARNm de AQP-5 en GSM de animales hipóxicos, sugiriendo que podría existir una menor expresión de esta molécula en dicho órgano, lo que explicaría, al menos en parte el menor volumen de saliva en estos grupos experimentales. Durante la exposición a HX, el SNA simpático es el responsable de coordinar las respuestas del organismo debido al estrés que representa esta condición ambiental (Hainsworth R y cols., 2007). La expresión de AQP-5, como se estableció anteriormente, sucede bajo estímulos colinérgicos parasimpáticos, por lo que una activación simpática exacerbada en respuesta a la HX podría explicar la disminución de expresión de dicha molécula.

Otras alteraciones moleculares deben ser tenidas en cuenta a la hora de analizar la disminución de la secreción salival. De hecho, una mayor concentración de PGE_2 ha sido asociada con menores volúmenes de saliva (Ossola CA y cols., 2016; Amer MA y cols., 2011). En este trabajo, hemos encontrado un aumento significativo del contenido de PGE_2 en la GSM de animales expuestos a HCl. Ya que el aumento de este eicosanoide actúa como un estímulo inhibitorio para la secreción salival, es posible que su aumento en el grupo expuesto intermitentemente a HX explique, al menos en parte, la disminución de la salivación observada. Las diferencias en la concentración de PGE_2 podrían deberse a una expresión diferencial de la COX-2. Si bien la HX aumenta la expresión de dicha enzima, es sabido que periodos más prolongados de exposición a HX disminuyen su concentración (Li RC y cols., 2003). Es por eso que la exposición cíclica a HX que se da en HCl mantendría la expresión de COX-2 más estable en el tiempo, llevando a una mayor concentración de PGE_2

en la GSM. Otra molécula imprescindible para el correcto funcionamiento glandular es el ON. Las GSM contienen los 3 tipos de NOS (endotelial, neural e inducible), las cuales sintetizan esta molécula relacionada con el control del flujo sanguíneo glandular, entre otras funciones (Soinilia J y cols., 2006). A partir del análisis de la actividad de la iNOS en GSM no se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima con respecto al control, al cabo de 3 meses de exposición a HX. La presencia de iNOS está usualmente relacionada con el desarrollo de la respuesta inmune en los tejidos, hecho que no fue observado en la GSM de animales expuestos a hipoxia en ninguna de las experiencias de este trabajo de tesis. Además, numerosos estudios reportados en la literatura relatan cambios en la actividad de esta enzima ante agresiones directas a las GSM (Correia P y cols., 2010), que no es el caso del presente modelo experimental. Otras isoformas de esta enzima podrían estar incrementadas, especialmente la eNOS (origen endotelial), debido a la mayor angiogénesis que experimentan los tejidos bajo condiciones de hipoxia ambiental.

Para continuar el análisis de la hiposalivación observada durante la exposición a HX, se evaluó la localización del HIF-1 α en GSM mediante IHQ. Este factor de transcripción juega un rol fundamental en la adaptación celular a baja concentración de O₂ ambiental, siendo esencial durante las respuestas inmunológicas, vascularización y metabolismo anaerobio (Ziello JE y cols., 2007). Una mayor inmunorreactividad de esta molécula se observó en las GSM de los animales expuestos a HCC. Dado que la aclimatación a HX es tiempo-dependiente (Hota SK y cols., 2007), los periodos de NX a los que está expuesto el grupo HCl inducirían una mayor degradación de HIF-1 α comparado con los animales sometidos continuamente a HX. El mayor catabolismo de este factor de transcripción en HCl significaría menor transcripción de genes necesarios para el proceso de aclimatación, lo cual resultaría en una peor respuesta celular que asegure una correcta función glandular.

Como ha sido establecido en la Introducción, las mitocondrias son consideradas las centrales energéticas celulares, ya que proveen el ATP necesario para realizar sus funciones. Si estas organelas se encontraran dañadas o disfuncionales, tanto los acinos como los conductos de las GSM no contarían con la energía química necesaria para llevar a cabo sus funciones. Por lo tanto, en primer lugar se analizó el tamaño y las características ultraestructurales de las mitocondrias mediante microscopía electrónica. El estudio reveló daños estructurales en las mitocondrias ductales de ambos grupos hipóxicos, con alteraciones en las crestas mitocondriales y aspecto redondeado. El conducto intercalar está localizado entre los acinos y el conducto estriado y recolecta la saliva primaria directamente desde la luz del acino. El epitelio ductal está conformado por células cuboideas, el cual está

parcialmente rodeado por células mioepiteliales (Amano O y cols., 2012). Su función principal es la modificación de la saliva primaria mediante la secreción de bicarbonato de sodio y la absorción de Cl^- (Rosero-Salazar D & Moreno Gómez F, 2014). Estos ductos no son los responsables primarios del contenido de agua en la saliva definitiva, por lo tanto, la alteración mitocondrial observada en los mismos no explicaría el descenso en la tasa de secreción salival, pero nos indica la presencia de alteraciones en una de las organelas más importantes de la economía celular. El estudio se continuó analizando la bioenergética mitocondrial. Por tal motivo, es importante recordar la función de dicha organela como sensor de O_2 celular, que es utilizado como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Las mitocondrias consumen entre el 80-90% del O_2 celular para realizar la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, sintetizar ATP. Por lo tanto, los menores niveles de O_2 existentes durante la exposición a HX comprometen la disponibilidad de ATP, lo cual puede llevar a disfunción e incluso muerte celular (Solaini G y cols., 2010). La evaluación del consumo de O_2 en mitocondrias aisladas es el estudio clásico para caracterizar la función mitocondrial. Nuestros resultados indican que la exposición a HX aumenta el consumo de O_2 , tanto en respiración pasiva (estado 4) como activa (estado 3). Además, el control respiratorio fue mayor en ambos grupos hipóxicos, indicando que las mitocondrias de dichos animales estarían mejor acopladas y serían más eficientes durante la fosforilación oxidativa. Teniendo en cuenta estos resultados, las mitocondrias necesitarían aumentar el consumo de O_2 para compensar los bajos niveles del gas en el ambiente, y este paso sería fundamental en el proceso de aclimatación para evitar estrés o daño celular. El consumo de O_2 aumentó más al usar malato-glutamato como sustratos del complejo I, lo cual sugiere una participación de dicho complejo en el mecanismo adaptativo. A partir de este resultado, se optó por medir la actividad de los complejos mitocondriales I, II y IV. La actividad del complejo NADH-citocromo c reductasa, que representa la actividad integrada de los complejos I-III, aumentó un 45% en los animales del grupo HCC comparado con C y HCl ($p < 0,05$). La actividad del complejo succinato-citocromo c reductasa (complejos II-III) y citocromo oxidasa (IV) no sufrió cambios significativos durante la exposición a HX. Resultados similares fueron publicados por otros autores en mitocondrias cardíacas de ratas expuestas a HX durante 87 días comparadas con ratas normóxicas, estableciendo que la mayor actividad del complejo I resultó necesaria para la adaptación a HX de los cardiomiocitos (Zaobornyj T y cols., 2009). De nuestros resultados se deduce que las mitocondrias de las GSM del grupo HCC serían más eficientes para el consumo de O_2 debido a un aumento en la actividad del complejo I, permitiendo una mejor y/o más veloz aclimatación.

La exposición a HX ambiental se considera un estímulo estresante que induce una amplia variedad de respuestas fisiológicas y/o patológicas, entre las cuales el aumento en los niveles de estrés oxidativo cumple un papel preponderante, con el consiguiente daño de proteínas y lípidos (Maiti P y cols., 2006). La organela celular involucrada en la producción y regulación de radicales libres es la mitocondria, ya que la cadena respiratoria se considera uno de los principales sitios celulares de producción de ROS (Cadenas E & Davies KJA, 2000). En los experimentos realizados en mitocondrias intactas no se encontraron diferencias significativas en la velocidad de producción de H_2O_2 luego de exposición a HX. En baja concentración, esta molécula participa como una señal intracelular, pero en mayor concentración actúa como un agente deletéreo celular (Fukai T & Ushio-Fukai M, 2011). Las mitocondrias producen H_2O_2 en condiciones fisiológicas durante la respiración celular, siendo esta producción mayor durante el estado 4 debido a la reducción de los complejos mitocondriales (Boveris A & Chance B, 1973). Dado que la cadena de transporte de electrones parece estar conservada durante la exposición a HX, la cadena respiratoria no sería considerada una fuente de ROS en este modelo experimental. Adicionalmente, la actividad de la SOD fue tomada en cuenta para analizar los valores de H_2O_2 , dada su función para catalizar la conversión de O_2^- en H_2O_2 y O_2 . Existen dos isoformas de esta enzima: la MN-SOD de localización mitocondrial y fácilmente inducible, y la Cu,Zn-SOD, de ubicación citosólica. Como otras enzimas antioxidantes, la expresión de la SOD está disminuida durante HX (Maiti P y cols., 2006). En las experiencias de este trabajo de tesis, las actividades de la Mn-SOD y la SOD total en las GSM permanecieron sin cambios significativos con respecto al C. Teniendo en cuenta que los valores de H_2O_2 también permanecieron inalterados, la función de esta enzima sería la de mantener una adecuada velocidad de producción de dicha molécula. Además de la producción de H_2O_2 , se analizó otro marcador de estrés oxidativo, las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en GSM íntegras. Los niveles de este marcador se vieron incrementados significativamente tanto en condiciones de HCl como de HCC a los 3 meses, sugiriendo que la exposición a HX provoca aumento de la peroxidación lipídica a nivel glandular. Este resultado podría vincular los menores niveles de saliva secretados por ambos grupos hipóxicos con un daño a nivel de la membrana celular a causa del imbalance del estado REDOX celular. El hecho de haber encontrado los valores de TBARS aumentados y no de H_2O_2 podría deberse a que para el primer ensayo se usó el homogenato total de GSM y para el segundo, sólo la fracción mitocondrial.

En resumen, las diferentes condiciones de HX a las que fueron expuestos los animales adultos activarían diferentes respuestas celulares que intentarían lograr la aclimatación de los diversos tejidos orales a la HX. Los animales expuestos a HCC

muestran una mejor función submandibular y mejor respuesta periodontal a la HX comparados con los expuestos a HCl. Este hecho sugiere que la exposición continua a HX sería más beneficiosa en términos de adaptación celular, los cuales involucran modificaciones en la función mitocondrial, cambios ultraestructurales y activación de diversos mediadores biológicos.

III. Objetivo III Efecto de la hipoxia ambiental crónica sobre los tejidos de soporte dentario de ratas adultas sometidas a periodontitis experimental

La periodontitis es, junto con la caries dental, la patología oral de mayor incidencia en la población mundial, y uno de los motivos más frecuentes de consulta y tratamiento odontológico. Estudios epidemiológicos han revelado que la morbilidad de dicha enfermedad es mayor en aquellas poblaciones expuestas a zonas de gran altitud con respecto a individuos de otras áreas geográficas (Garlet GP y cols., 2006). Si bien existen en la literatura estudios que investigan el efecto de la HX en modelos animales de PE (Zhang G y cols., 2013, Xiao X y cols., 2012), ninguno establece una comparación entre distintos tipos de exposición a HX ni abarca el estudio de las glándulas salivales en tales condiciones. Es por ello que en este capítulo se abordó el estudio del efecto de la exposición crónica a HX sobre el hueso alveolar, encía y GSM de animales sometidos a periodontitis experimental (PE).

El modelo de PE utilizado en esta tesis consiste en la acumulación de placa bacteriana causada por una ligadura de hilo de algodón alrededor del cuello de los primeros molares inferiores durante 2 semanas, la cual adicionalmente genera un efecto traumático que contribuye al daño periodontal. Dado que la acumulación de placa se pierde por efecto de la remodelación de hueso asociada al movimiento del hilo en dirección coronal (Kuhr A y cols., 2004), no se recomienda dejar la ligadura durante un período mayor a dos semanas, o en caso de hacerlo, debe cambiarse el hilo para permitir que la pérdida ósea siga progresando. Este método constituye el modelo de PE más utilizado para el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de la P y sus factores de riesgo. Sin embargo, una de sus limitaciones es que el estudio de los factores de riesgo se ve restringido, ya que requiere periodos de tiempo prolongados para que los efectos deletéreos de la P se vean evidenciados. Sumado al hecho de que la misma es una enfermedad multifactorial, muchos de dichos factores requieren la utilización de otros modelos para ser estudiados (Persson GR, 2006). Existen otros métodos de inducción de PE, como lo es la inyección gingival de

LPS, el cual tiene la ventaja de estimular la respuesta inmune por largos períodos de tiempo (mayor a 30 días, que es el tiempo promedio de duración de la respuesta inflamatoria en el modelo de ligadura, García de Aquino y cols., 2009). Sin embargo, para el presente trabajo, fue imposible la implementación del modelo por inyecciones de LPS dado que los animales hubieran requerido estar en normoxia mucho tiempo hasta lograr la anestesia y la correcta aplicación del LPS, lo cual hubiera interferido con la exposición a HX. En base a lo antedicho, y al hecho de que el modelo de ligadura genera rápidamente una respuesta inflamatoria periodontal en el animal, se utilizó el modelo animal mencionado.

En primer lugar se evaluaron los parámetros morfométricos en los animales adultos sometidos a PE. En este caso, el peso corporal de los animales hipóxicos fue significativamente menor que el de su C al finalizar el período experimental. A partir de este resultado, se hipotetizó que la PE podría inducir alteraciones en el consumo y/o eficiencia del consumo de alimento, en concordancia con trabajos publicados por otros autores (Ito K y cols., 2001, Amer y cols., 2011). Sin embargo, el peso de las GSM fue similar en los tres grupos, al igual que la relación peso GSM/peso corporal. Esto podría deberse a la presencia de edema en la GSM de animales sometidos a PE (Amer MA y cols., 2011), que equipararía los pesos de las GSM de los animales hipóxicos al control. Si bien no hemos visualizado edema durante el análisis histológico de rutina, si evidenciamos un aumento del espacio intercelular periacinar en HCC y HCI mediante el TEM.

Al analizar la pérdida ósea cortical por el método de la distancia, se evidenció que los animales hipóxicos presentaban una mayor distancia LAC-CA que los CPE tanto a nivel lingual como vestibular. Tal como se mencionó previamente, las fuerzas de la mordida inciden más sobre la tabla lingual, haciéndola más propensa a la resorción. Sin embargo, en este caso, la resorción de la tabla vestibular alcanzó la misma proporción que la lingual, probablemente porque la inducción de la PE facilita la resorción ósea que estaría activada durante la exposición a HX. En este sentido, Xiao X y cols., 2012 demostraron que la progresión de la P en ratas hipóxicas (4500 msnm) sometidas a PE se desarrollaba más tardíamente en el tiempo pero con mayor severidad que en ratas normóxicas. Esto se debería a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias en el tejido periodontal estimuladas por la HX (Motohira H y cols., 2007). Con respecto al análisis del volumen óseo interradicular, sólo pudimos analizar el VO/VT, ya que la resorción de la zona coronal inducida por la ligadura no permitió el abordaje del VO parcial. El mismo no presentó diferencias significativas entre los tres grupos analizados, probablemente porque la pérdida ósea que se genera como respuesta a la PE es tan extensa que “enmascara” u oculta los posibles efectos de la HX sobre el tejido interradicular. Además, el hueso alveolar de las

ratas hipóxicas podría estar sufriendo una remodelación debido a un exceso de fuerzas masticatorias por un mayor rozamiento a nivel oral a causa de la menor secreción salival (como ya fue discutido anteriormente). El reordenamiento trabecular y condensación de tejido óseo esponjoso que ocurren para adaptarse a la mayor fuerza a la que son sometidas las piezas dentarias (Yamamoto K y cols., 2011) enmascararía el efecto de la HX per se. El rol del HIF-1 α sobre la homeostasis ósea es aún controversial, ya que existe disparidad de opiniones sobre su rol osteoclastogénico u osteogénico (Wang X y cols., 2017) Por lo tanto, si bien pareciera que la exposición a HX aumenta la pérdida ósea alveolar inducida por PE, no queda claro mediante qué mecanismos.

Se continuó el estudio evaluando los mediadores inflamatorios presentes en el tejido gingival que circunda el primer molar inferior de los animales sometidos a PE. Al igual que en los capítulos previos, se analizó el contenido de PGE₂ y la actividad de la iNOS. La exposición a la HX aumentó significativamente los niveles de PGE₂ en encía, mayormente durante la exposición continua. Sin embargo, es difícil separar las variables (PE e HX) a la hora de efectuar un análisis de los resultados. Esto es debido a la interacción que se produce entre la exposición a HX y la respuesta inmune del huésped. Ha sido discutido en la literatura el rol de la HX en la generación y propagación de la respuesta inflamatoria, obteniéndose resultados contradictorios, dependiendo del tipo, intensidad y duración de la exposición a HX, así también como de las variaciones fenotípicas de los animales utilizados (Siervo M y cols., 2014). En general, se acepta que la HX induce inflamación y que los sitios inflamados se tornan aún más hipóxicos. En este contexto, la HX actúa influenciando al ambiente tisular, regulando la expresión génica de moléculas necesarias para el metabolismo celular (Eltzschig H & Carmeliet P., 2011). Es por esta razón, que al inducir PE y generarse la P, la respuesta del tejido gingival a la HX es diferente a la de animales sin PE. Es sabido que la HX aumenta la vida media de las células de la inmunidad innata por presentar receptores para HIF. De esta manera, ellas pueden aumentar la producción de citoquinas pro-inflamatorias, efectivizando la erradicación de patógenos (Motohira H y cols., 2007; Cramer T y cols., 2003). En el caso de la iNOS, si bien la actividad de esta enzima es mayor en animales con PE que sin PE (dato no mostrado en este trabajo de tesis), la exposición a HX no ejerce un efecto aditivo en dicha actividad. Creemos que la respuesta inflamatoria generada durante la PE constituye un estímulo suficiente para la inducción de la enzima, la cual luego de un tiempo se inactiva en relación proporcional a la cantidad de ON producido (Smith BC y cols., 2012). Se ha descrito que las vías activadas por el HIF-1 α inducido durante la HX modifican la actividad de las células de la inmunidad innata en 3 niveles: el metabolismo energético, la adhesión y llegada de los PMN a los sitios de inflamación y la apoptosis de PMN luego de la fagocitosis (Walmsley SR y cols., 2005), lo

que refleja la intrincada regulación molecular que se dispara durante el desarrollo de una reacción inflamatoria en ambientes con bajos niveles de O₂.

Si bien existen estudios que analizan el efecto de la HX sobre los tejidos periodontales de animales sometidos a PE, los mismos no abarcan el análisis de las GSM. Dado que la GSM actúa como un modulador neuroinmunoendócrino dentro de la cavidad oral y que su función secretora es de vital importancia para mantener la homeostasis oral, se prosiguió con la evaluación de la secreción salival estimulada por pilocarpina en 3 tiempos experimentales. Ya ha sido establecido que la PE provoca hiposalivación en ratas estimuladas con metacolina (agonista muscarínico) en comparación con los controles (Amer MA y cols., 2011). En nuestro estudio, se evaluó el efecto de la HX sobre la secreción salival total de animales sometidos a PE con el fin de evaluar el efecto de ambas condiciones experimentales sobre la función secretora glandular. Se encontró que durante los períodos experimentales de 0-30 y 30-60 minutos, ambas modalidades de exposición a HX disminuyeron la secreción salival con respecto al CPE, siendo mayor esta diferencia en el grupo expuesto continuamente. Al cabo de los 90 minutos, sólo el grupo HCCPE mostró una disminución significativa con respecto a CPE, que no superó el 50% de la secreción total. Esto plantea una diferencia con el estudio de salivación en ratas sin PE, en donde la disminución de la secreción fue mayor en HCl y alcanzó valores del 5% de saliva total en dicho grupo con respecto a C. Correlacionando estos datos con los obtenidos mediante microscopía electrónica, en donde se evidenció un RER muy denso en las células acinares, señal de una alta tasa metabólica celular, es posible que las GSM de los animales sometidos a PE presenten una mayor actividad sintética, que llevaría a mantener (o intentar mantener) los niveles de saliva en la cavidad bucal. Otra posibilidad que explicaría que los niveles de saliva no disminuyan tanto en animales con PE comparados con los grupos sin PE sería la desensibilización de receptores glandulares, ya que los receptores muscarínicos, adrenérgicos y de sustancia P comparten los mismos mecanismos de señalización intracelular (Cook DI y cols., 1994). Dado que durante la PE existe un componente neurogénico con un rol fundamental para los neuropéptidos como la sustancia P en la GSM (Lundy FT y Linden GJ., 2004), en nuestro modelo podría estar generándose una prolongada estimulación adrenérgica y peptidérgica que disminuiría la respuesta glandular a la estimulación con pilocarpina (Proctor GB & Carpenter GH, 2007). El hecho de que se observara una menor secreción en HCC que en HCl podría relacionarse con el mayor contenido de PGE₂ en el grupo HCC, tal como fue observado durante el desarrollo del objetivo II en el grupo HCl. Dado que la actividad secretora de las GSM en la rata es el resultado de una compleja activación de receptores y vías intracelulares asociadas, es esperable que ocurra un acople de señales (Cook DI y cols., 1994; Garret JR y cols., 1987).

Se ha postulado una mayor estimulación simpática durante la inducción de la PE (Busch L y cols., 2008), por lo que esta señal podría sumarse a la estimulación simpática generada durante la HX, y lograr así una menor secreción salival en las ratas hipóxicas. Al igual que lo mencionado para los objetivos I y II con respecto a los estudios histológicos, no se encontraron alteraciones arquitectónicas en las GSM, a diferencia de lo reportado por Amer MA y cols., 2011, donde se evidenció pérdida parcial del contenido granular y edema periacueductal en ratas macho sometidas a PE uni y bilateralmente. En nuestro caso, en el estudio realizado mediante microscopía electrónica, hemos evidenciado un aumento del área y perímetro en la unión entre los acinos y el tejido conectivo circundante, lo que podría deberse a edema periacinar, significativo en HCCPE con respecto a CPE. Este hallazgo se dio solamente en animales sometidos a PE, no visualizándose en los grupos correspondientes al objetivo II. Esto indicaría que la PE influye negativamente sobre la ultraestructura de la GSM y que la exposición a HX agrava los efectos de la PE sobre las GSM.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

En el presente trabajo de tesis hemos demostrado que la hipoxia ambiental crónica induce cambios en la fisiología del tejido periodontal y glandular de ratas en crecimiento y adultas, tanto cuando se las expone a la HX en forma continua como intermitente.

En ratas en crecimiento, la exposición a HX afectó negativamente las propiedades biomecánicas mandibulares, hecho probablemente vinculado a la disminución de la masa ósea de los animales y a la incapacidad de la mandíbula de adaptar su geometría en tales condiciones. La HX también afectó negativamente al hueso alveolar, observándose reabsorción cortical lingual e interradicular, sin evidencia de desarrollo de una respuesta inflamatoria a nivel periodontal. La mencionada pérdida ósea podría ser considerada como un intento de aclimatación para aumentar la masa roja circulante, proceso fundamentalmente a cargo de la médula ósea de los huesos largos. El incremento de la actividad de la iNOS observado en el tejido gingival y en la GSM, da cuenta de la necesidad del organismo de aumentar el aporte de O₂ en ambos sitios, lo que refuerza el concepto de intento de aclimatación a nivel periodontal y glandular.

En ratas adultas, la exposición a HX no indujo cambios biomecánicos mandibulares, probablemente debido a que estos animales ya han completado su formación ósea. Es evidente que la exposición intermitente resultó más perjudicial en términos de aclimatación que la continua. Esto se vio reflejado en la menor secreción salival y en la mayor pérdida ósea interradicular en HCI, así como también en el aumento de la resorción ósea evidenciada por una mayor concentración de CTX-I sérico. Los fenómenos homeostáticos desencadenados en respuesta a HX involucrarían la activación de HIF-1 α y mecanismos adaptativos a nivel bioenergético mitocondrial, que parecen no ser del todo eficaces en HCI. Estos resultados conjuntamente con el análisis microscópico de las GSM sugieren una diferencia fenotípica durante la aclimatación en HCI y HCC, que involucraría cambios a nivel bioquímico, ultraestructural y molecular.

Cuando se evaluó el efecto de la HX sobre ratas adultas sometidas a PE, nuestros resultados sugieren que la exposición a HX agrava las manifestaciones patológicas orales de la periodontitis, tanto a nivel óseo como glandular. Las vías de señalización que se activan a nivel celular durante la exposición a HCI y HCC podrían incrementar las señales

de la cascada inflamatoria inducida por P, aumentando su efecto deletéreo sobre el periodonto y las GSM.

Si bien los estudios realizados para este trabajo de tesis son a nivel experimental, el modelo de HX aplicado en el mismo emula la altitud en la cual se desarrolla la vida animal y humana de varias poblaciones que habitan nuestro planeta, constituyendo de esta forma un antecedente valioso a la hora de evaluar la salud periodontal de individuos que habitan o trabajan en condiciones de HX. Estos resultados ayudan a una mejor comprensión de los procesos que regulan la homeostasis oral durante la aclimatación a la HX y podrían contribuir al desarrollo de estrategias para prevenir la hiposecreción salival y sus consecuencias en poblaciones expuestas a HX.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

Abbredcht PH: Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol* 1972, 32:54

Addy M, Shellis RP. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci* 2006, 20:17-21

Aghaloo TL, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Kang B, Franco R, Dry SM, Atti E, Tetradis S. Osteogenic Potential of Mandibular vs. Long-bone Marrow Stromal Cells *J Dent Res* 2010, 89:1293-1298

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *The cell*. New York Ed. Garland Publishing Inc, 1994

Amer M, Elverdin JC, Fernandez-Solari J, Medina VA, Chiarenza AP, Vacas MI. Reduced methacholine-induced submandibular salivary secretion in rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 421-427.

Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands-Overview of the Japan Salivary Gland Society-Sponsored Workshop. *Acta Histochem Cytochem* 2012, 45:241-250.

Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005, 32:212-218

Arestegui AH, Fuquay R, Sirota J, Swenson ER, Schoene RB, Jefferson JA, Chen W, Yu X, Pando Kelly J, Johnson RJ, Escudero E. High altitude renal syndrome (HARS). *J Am Soc Nephrol* 2011, 22:1963-1968.

Aubin JE, Turksen K, Hersche JNM. Osteoblastic cell lineage. Noda M Ed. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. San Diego Academic Press Inc 1993,1-45

Baer PN, Newton WL. The occurrence of periodontal disease in germfree mice. *J Dent Res* 1959, 38:1238.

Baily DM, Davies B. Acute mountain sickness, prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. *High Altitude Med Biol* 2001, 2:21-29.

Belting CM, Schour I, Weinman JP, Shepro MJ. Age changes in the periodontal tissues of the rat molar. *J Dent Res* 1953, 32:332-353

Biancu S, Ericsson I, Lindhe J. Periodontal ligament tissue reaction to trauma and gingival inflammation. An experimental study in the beagle dog. *J Clin periodontal* 1995, 22:777-779

Boretti G, Bickel M, Geering AH. A review of masticatory hability and efficiency. *J Prosthet Dent* 1995, 74:400-403

Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J Bone Min Res* 1999, 14:330-335

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 1984, 105:429-435.

Boveris DL, Boveris A. Oxygen delivery to the tissues and mitochondrial respiration. *Front Biosci* 2007, 12:1014-1023.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973, 134:707-716

Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. *Methods Enzymol* 1999, 301:188-198.

Boveris DL & Boveris A. Oxygen delivery to the tissues and mitochondrial respiration. *Front Biosci* 2007, 12:1014-1023

Boyer R, Escola R, Bluet-Pajot MT, Arancibia S. Ablation of submandibular salivary gland in rats provokes a decrease in plasma luteinizing hormone levels correlated with morphological changes in Leydig cells. *Arch Oral Biol* 1990, 35:661-666

Bozzini C, Champin GM, Alippi RM, Bozzini CE. Static Biomechanics in Bone from Growing Rats Exposed Chronically to Simulated High Altitude. *High Alt Med Biol* 2013, 14: 367-374

Bozzini C, Olivera MI, Huygens P, Alippi RM, Bozzini CE. Long-term exposure to hypobaric hypoxia in rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Ann Anat* 2009, 191:212-217

Bozzini CE, Lezón CE, Norese MF, Conti MI, Martínez MP, Olivera MI, Alippi RM. Evidence from catch-up growth and hoarding behavior of rats that exposure to hypobaric air lowers the body-mass set point. *Growth Dev Aging* 2005, 69:81-8.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:9030-9033.

Brennan P, Thomas G, Langdon J. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003, 48:93-100

Burger EH, Klein-Nulend J. responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res* 1999,13:93-98

Busch L, Sterin-Borda L, Borda E. Beta-adrenoceptor alterations coupled with secretory response and experimental periodontitis in rat submandibular gland. *Arch Oral Biol* 2008, 53:509-516

Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med* 2000, 29:222-230.

Cardadropoli G, Araujo MG, Lindhe J. Dynamics of Bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs *J Clin Periodontol* 2003, 30:809-818

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian cells. *Phys Rev* 1979, 3: 527-605.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon M, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95:11715-11720.

Choi CH, Spooner R, Deguzman J, Koutouzis T, Ojcius DM, Yilmaz O. *Porphyromonas gingivalis*-nucleoside-diphosphate-kinase inhibits ATP-induced reactive-oxygen-species via P2X(7) receptor/NADPH-oxidase signalling and contributes to persistence. *Cell Microbiol* 2013, 15:961-976.

Conti MI, Terrizzi AR, Lee CM, Mandalunis PM, Bozzini C, Piñeiro AE, Martínez MP. Effects of lead exposure on growth and bone biology in growing rats exposed to simulated high altitude. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012, 88:1033-1037.

Cook DI, Van Lennep EW, Roberts LM, Young JA. Secretion by the major salivary glands. En: Jhonson, LR (ed.). *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1994, 1061-1117

Correia PN, Carpenter GH, Paterson KL, Proctor GB. Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands. *Rheumatology (Oxford)* 2010, 49: 48–56.

Costa LE, Martin IH, Macome JC, Taquini AC. Efecto de la hipoxia hipobárica crónica sobre el crecimiento y la composición corporal en la rata. *Medicina* 1979, 39:604-610

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 113:419

Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodontal Res* 1978,13:316-325.

Czerniczyniec A, La Padula P, Bustamante J, Karadayian AG , Lores-Arnaiz S , Costa LE. Mitochondrial function in rat cerebral cortex and hippocampus after short- and long-term hypobaric hypoxia. *Brain Res* 20156, 1598:66-75.

Delgado Pichel A, Inajeros Montesinos P, Herrero Climent M. *Espacio Biológico. Parte I: La inserción diente-encía. Avances en Periodoncia*, vol.13, nº2. Madrid, 2011

Delporte C, Steinfeld S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1758:1061-1070.

Delporte C, Bryla A, Perret J. Aquaporins in salivary glands: from basic research to clinical applications. *Int J Mol Sci* 2016, 17:166.

De Rezende Barbosa GL, Pimenta LA, Almeida SM. Micro-CT evaluation of the radioprotective effect of resveratrol on the mandibular incisors of irradiated rats. *Braz Oral Res* 2016, 30:1-6

Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, and Lamas S. Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10:943–952.

Diepart C, Verrax J, Calderon PB, Feron O, Jordan BF, Gallez B. Comparison of methods for measuring oxygen consumption in tumor cells in vitro. *Anal Biochem* 2010, 396:250-256.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 2005, 33:223-233.

Dosek A, Ohnob H, Acsa Z, Taylor A, Radak Z. High altitude and oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol* 2007, 158:128-131.

Egέα JC, Hirtz C, Gross R, Lajoix AD, Traskawka E, Ribes G, de Pière DD. Preproinsulin I and II mRNA expression in adult rat submandibular glands. *Eur J Oral Sci* 2000, 108:292-296

Elias JA, Tang W, Horowitz MC. Cytokine and Hormonal stimulation of human osteosarcoma cytokine-11 production. *Endocrinol* 1995, 136:489-498

Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med* 2011, 364: 656–665

Elverdin JC, Chiarenza AP, Frid AB, Giglio MJ. Effects of chronic hypoxia on the secretory responses of rat salivary glands. *Arch Oral Biol* 1995, 40:459-462.

Environmental Archives. "7 Highest Cities in the World". *Julio 2013*

Essop MF. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* 2007, 584: 715-726.

Farias JG, Jimenez D, Osorio J, Zepeda AB., Figueroa CA., Pulgar VM. Acclimatization to chronic intermittent hypoxia in mine workers: a challenge to mountain medicine in Chile. *Biol Res* 2013, 46:59-67.

Ferrer-Viant D, Jorge Fonseca C, García Rodríguez RE, Martínez Anglada PE. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. Instituto Superior de Ciencias Médicas, facultad nº1. 1998, 2:45-53

Ferretti, JL. Biomechanical properties of bone. En: "Bone Densitometry and Osteoporosis". Genant HK, Guglielmi G, Jergas M (eds), pp.143-161. Springer Verlag, Berlin, 1997.

Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Capigliani R, Chiappe MA. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interaction in small animal models. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001, 1:263-274

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011, 15:1583-1606

Garcia MF, Moreno H, Rigalli A, Puche RC. Growth- associated changes in the periodontal bone and molar teeth of male rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009, 48: 475-481

Garcia de Aquino S, Manzolli Leite F, Stach-Machado D, Francisco da Silva J, Spolidorio L, Rossa C J. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sciences* 84:745-754, 2009

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila Campos MJ, da Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus*

Actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006, 21:12-20

Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res* 1987 , 66:387-397.

Gómez de Ferraris ME & Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3º Ed. Ed. Médica Panamericana, 2010

Goya JA, Paez HA, Mandalunis PM. Effect of topical administration of monosodium olpadronate on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2006, 77: 1-6

Grenier D, Chen H, Ben Lagha A, Fournier-Larente J, Morin MP. Dual action of Myricetin on *Porphyromona gingivalis* and the inflammatory response of host cells. A promising therapeutic molecule for periodontal diseases. *Plos One* 2015, e0131758

Gresik EW, Hosoi K, Kurihara K, Maruyama S, Ueha T. The rodent granular convoluted tubule cell- an update. *Eur J Morphol* 1996, 34:221-224

Gutierrez Nova P, Olivares Navarrete R, Leyva Huerta ER. Epidermal growth factor and total protein in saliva of smokers and non-smokers. *Avances en odontoestomatología* 2008; 24:6

Hainsworth R, Drinkhill MJ, Rivera-Chira M. The autonomic nervous system at high altitude. *Clin Auton Res* 2007, 17:13-19.

Hajishengallis G, Lamont RJ, Graves DT. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*. 2015, 6:229-35

Haubek D, Johansson A. Pathogenicity of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its geographical dissemination and role in aggressive periodontitis. *J Oral Microbiol* 2014, vol 6.

Herrera BS, Martin-Porto R, Maia-Dantas A, Campi P, Spolidorio LC, Costa SK, Van Dyke TE, Gyurko R, Muscara MN. iNOS- derived nitric oxide stimulates osteoclast activity and alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2011, 82:1608-1615

Hill AE, Shachar-Hill B. A new approach to epithelial isotonic fluid transport: An osmosensor feedback model. *J Membr. Biol* 2006, 210: 77-90.

Hidalgo VJ, Bronsert P, Orłowska-Volk M, Díaz LB, Stickeler E, Werner M, Schmitt-Graeff A, Kayser G, Malkovsky M, Fisch P. Histological analysis of gdT lymphocytes infiltrating human triple-negative breast carcinomas. *Front Immunol* 2014,10,5:632

Hoffman MM, Schour I. Quantitative studies in the development of the rat molar. Alveolar bone, cementum and eruption. *Am J Orthod* 1940, 26:854-874

Hoppeler, H. and Vogt, M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J. Exp. Biol* 2001, 204, 3133-3139.

Hosoi, K. Physiological role of aquaporin-5 in salivary glands. *Pflugers Arch* 2016, 468:519-539.

Hosomichi J, Kuma YI, Oishi S, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T. Intermittent hypoxia causes mandibular growth retardation and macroglossia in growing rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2017,151:363-371.

Hota SK, Barhwal K, Singh S, Ilavazhagan G. Differential temporal response of hippocampus, cortex and cerebellum to hypobaric hypoxia: a biochemical approach. *Neurochem Int* 2007, 51, 384-390.

Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, Janssen JD. Effect of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 2000, 405:704-706

Inagaki Y, Akahane M, Shimizu T, Inoue K, Egawa T, Kira T, Ogawa M, Kawate K, Tanaka Y. Modifying oxygen tension affects bone marrow stromal cell osteogenesis for regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2017, 26: 98-106

Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Inoue N, Nakae Y. Aquaporin-5 water channel in lipid rafts of rat parotid glands. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1758:1053-1060.

Ito K, Morikawa M, Inenaga K. The effect of food consistency and dehydration on reflex parotid and submandibular salivary secretion in conscious rats. *Arch Oral Biol* 2001;46:353–63.

Jenkins GN. *The physiology and biochemistry of the mouth*. 4th ed., Blackwell Scientific, Oxford, pp. 284-359, 1978

Jian C, Li C, Ren Y, He Y, Li Y, Feng X, Zhang G, Tan Y. Hypoxia Augments Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Expression in Periodontal Ligament Cells. *Inflammation* 2014, 37:1413-1423.

Jiang N, Chen M, Yang G, Xiang L, He L, Hei TK, Chotkowski G, Tamow DP, Finkel M, Ding L, Zhoul Y, Mao JJ. Hematopoietic Stem Cells in Neural-crest Derived Bone Marrow. *Sci Rep* 2016, 6:36411

Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase via Hypoxia Inducible Factor-1 in Cardiac Myocytes. *Circ Res* 2000, 86:319-325.

Jyotheeswaran S, Li P, Chang TM, and Chey WT. Endogenous nitric oxide mediates pancreatic exocrine secretion stimulated by secretin and cholecystokinin in rats. *Pancreas* 2000, 20: 401– 407

Kats A, Bage T, Georgsson P, Jonsson J, Quezada HC, Gustafsson A, Jansson L, Lindberg C, Nasstrom K, Yucel-Lindberg T. Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 by aminothiazoles decreases prostaglandin E₂ synthesis in vitro and ameliorates experimental periodontitis in vivo. *FASEB J* 2013, 27:2328-2341

Kayser B, Marconi C. The metabolic and ventilatory response to exercise in Tibetans born at low altitude. *Resp Physiol* 1994; 98: 15-26

Kim K, Chung SB, Hawng EY, Noh SH, Song KH, Kim HH. Correlation of expression and activity of matrix metalloproteinase-9 and -2 in human gingival cells of periodontitis patients. *J Periodontal Implant Sci* 2013, 43:24-29.

Kingsmill VJ, Boyde A Mineralization density of human mandible bone: quantitative backscattered electron image analysis. *J Anat* 1998, 192:245-256.

Knowles HJ. Hypoxic regulation of osteoclast differentiation and bone resorption activity. *Hypoxia* 2015, 3:73–82

Klausen K. Effects of high altitude on maximal working capacity. *J Appl Physiol* 1966; 21: 1191

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2004, 39:101-106

Lappin D, Kjeldsen M, Sander L, Kinane D. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodon Res* 2000, 35:369-373

Leningher AL, Nelson DL, Cox MM. Leningher Principles of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004

Lezon CE, Bozzini C, Agüero Romero A, Pintos P, Champin G, Alippi RM, Boyer P, Bozzini CE. Effect of chronic undernutrition on body mass and mechanical bone quality under normoxic and altitude hypoxic conditions. *British journal of Nutrition* 2016, 115: 1687-1695

Li RC, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Fan Q, Brittan KR, Guo SZ, Sachleben LR, Gozal D. Cyclooxygenase 2 and Intermittent Hypoxia-induced Spatial Deficits in the Rat. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168: 469–475

Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Plaque induced periodontal disease in Beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodon Res* 1975, 10:243-255

Lindhe J. Periodontología Clínica e Implantología odontológica. 5º Ed. Ed. Médica Panamericana, 2009.

Listgarten MA. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. J Periodontol 1975, 46:677-680

Löe H, Theilade E, Jensen S. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965, 36:177-187

Lomiczi A, Saburo AM, Elverdin JC, Mastronardi CA, Diaz S, Rettori V, McCann SM. Role of nitric oxide in salivary secretion. Neuroimmunomodulation 1998, 5:226-233

Lomiczi A, Mohn CE, Faletti A, Franchi A, McCann SM, Rettori V, elverdin JC. Inhibition of salivary secretion by lipopolysaccharide: possible role of prostaglandins. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001, 281: 405-411

López V, Siques P, Brito J, Vallejos C, Naveas N, Carvallo C, Leon Velarde F, Carvajal N. Upregulation of Arginase Expression and Activity in Hypertensive Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia. High Alt Med Biol. 2009 Winter, 10:373-81

Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. Crit Rev Oral Biol Med 2004, 15:82-98

Magalhaes J, Ascensao A, Soares JM, Neuparth MJ, Ferreira R, Oliveira J, Amado F, Duarte JA. Skeletal muscle ultrastructural and plasma biochemical signs of endothelium dysfunction induced by a high-altitude expedition (Pumori. 7161 m). Bas App. Myol 2005, 91, 185-191.

Magnani N, Marchini T, Vanasco V, Tasat DR, Alvarez S, Evelson P. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase and mitochondrial dysfunction in lung after an acute exposure to Residual Oil Fly Ashes. Toxicology and Applied Pharmacology 2013, 270 31-38

Maiti P, Singh SB, Sharma AK, Muthuraju S, Banerjee PK, Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. Neurochemistry International 2006, 49:709-716.

Manolagas SC. Birth and Death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 2000, 21:115-137

Martínez MP, Bozzini C, Olivera MI, Dmytrenko G, Conti MI (2011) Aluminum bone toxicity in immature rats exposed to simulated high altitude. J Bone Miner Metab 29(5): 526-534

Martinez–Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol* 1989, 13:879-899

Matsuzaki T, Susa T, Shimizu K, Sawai N, Suzuki T Aoki T, Yokoo S, Takata K. Function of the Membrane Water Channel Aquaporin-5 in the Salivary Gland. *Acta Histochem. Cytochem* 2012, 45: 251-259.

Mc Bride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 2006, 16:551-560

Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyperin (hemocuperin). *J Biol Chem* 1969, 244; 6049-6055

Medianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin periodontal* 2005, 32:57-71

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2011, 87:284-292

Merz TM, Pichler Hefti J, Hefti U, Huber A, Jakob SM, Takala J, Djafarzadeh S. Changes in mitochondrial enzymatic activities of monocytes during prolonged hypobaric hypoxia and influence of antioxidants: A randomized controlled study. *Redox Resp* 2015, 20:234-240.

Michiels C. Physiological and Pathological Responses to Hypoxia. *American Journal of Pathology*, vol. 164, No. 6, Junio 2004

Misawa Y, Kageyama T, Moriyama K, Kurihara S, Yagasaki H, Deguchi T, Ozawa H, Sahara N. Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary roots in male rats: A histomorphometric study. *Arch Oral Biol* 2007, 52:44-50

Mitchell P. "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism". *Nature* 1961, 191:144-148.

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. purification of prostaglandin endoperoxidase synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 1976, 251:2629-2636

Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Rettori V. Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. *Stress* 2011, 14:216-226.

Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., Salvemini, D. Modulation of prostaglandin Biosynthesis by Nitric oxide and Nitric Oxide Donors. *Pharmacological Reviews* 2005, 57:217–252.

Moore, DM. Laboratory animal medicine and science series II, rat and mice. *Biology* 2000, V-9041

Motohira H, Hayashi J, Tatsumi J, Tajima M, Sakagami H, Shin K. Hypoxia and reoxygenation augment boneresorbing factor production from human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontology* 2007, 78:1803–9.

Mullender M, El Haj AJ, Yang Y, Van Duin MA, Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput* 2004, 42:14-21

Muthuraju S, Pati S. Effect of hypobaric hypoxia on cognitive functions and potential therapeutic agents. *Malays J Med Sci* 2014, 21:41-45.

Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: A Master Regulator of MicroRNA Biogenesis and Activity. *Medical Free Radic Biol Med* 2013, 64:20-30.

Norese MF, Lezón CE, Alippi RM, Martínez MP, Conti MI, Bozzini CE. Failure of polycythaemia-induced increase in arterial oxygen content to suppress the anorexic effect of simulated high altitude in the adult rat. *High Alt Med Biol* 2002, 3: 49-57

Ossola CA, Surkin PN, Pugnaroni A, Mohn CE, Elverdin JC, Fernandez-Solari J. Long-term treatment with methanandamide attenuates LPS-induced periodontitis in rats. *Inflammation Research* 2012, 61:941-948.

Ossola CA, Surkin PN, Mohn CE, Elverdin JC, Fernández-Solari J. Anti-Inflammatory and Osteoprotective Effects of Cannabinoid-2 Receptor Agonist HU-308 in a Rat Model of Lipopolysaccharide-Induced Periodontitis. *J Periodontol* 2016, 87:725-734

Oxford GE, Jonsson R, Olofsson J, Zelles T, Humphreys-Beher MG. Elevated levels of human salivary epidermal growth factor after oral and juxtaoral surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1999, 57:154-158

Page RC, Schroeder H. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel: karger, 1982

Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett RJ, Moncada S. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Nat. Acad Sci* 2004, 101: 7630-7635.

Pawson IG. Growth and development in high altitude populations: a review of Ethiopian, Peruvian, and Nepalese studies. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1976, 27:83-98.

Pérez-Castillo A, Blazquez E. Synthesis and release of glucagon by human glands. *Diabetol* 1980, 19:123-129

Persson, GR. What has ageing to do with periodontal health and disease? *Int Dent J* 2006, 56:240-249

Pilardeau P, Richalet JP, Bouissou P, Vaysse J, Larmignat P, Boom A. Saliva flow and composition in humans exposed to acute altitude hypoxia. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1990, 59:450-453.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005, 366:1809-1820

Pinna R, Campus G, Cumbo E, Mura I, Milia E. Xerostomia induced by radiotherapy: and overview of the pathophysiology, clinical evidence and management of the oral damage. *Ther Clin Risk Manag* 2015, 11:171-188

Plagmann HC, Lange DE, Denks A. The demonstration of antibacterial substances in the saliva, oral fluid and the gingiva. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 1973, 28:295-299

Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 2012, 92: 967–1003

Pringle S, Van Os R, Coopes RP. Concise review: adult salivary gland stem cells and potential therapy for xerostomia. *Stem Cell* 2013, 31:613-619

Prestifilippo JP, Carabajal E, Croci M, Fernández-Solari J, Rivera ES, Elverdin JC, Medina VA. Histamine modulates salivary secretion and diminishes the progression of periodontal disease in rat experimental periodontitis. *Inflamm Res* 2012, 61:455-64.

Prestifilippo JP, Fernández-Solari J, Martinel Lamas DJ, Rios CE, Mohn C, Perazzo JC, Rivera ES, Elverdin JC, Medina VA. Pharmacological targeting of histamine H4 receptor in periodontal disease. *Oral Dis* 2016, 22:423-429.

Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of the salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci* 2007; 133:3-18

Roberts WE, Turley PK, Breznick N, Fielder PJ. Implants: bone physiology and metabolism. *CDA J* 1987,15:54-61

Rosero Salazar D, Moreno Gomez F. Descripción Histológica de las Glándulas Salivales Mayores. *Revista Gastrohnp* 2014, 1: 23-36.

Sabadini E, Berzi I. The submandibular gland: a key organ in the neuro-immuno-regulatory network?. *Neuroimmunoimodulation* 1995, 6:343-367.

Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005, 32:108-129

Schully C. Drugs effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis* 2003, 9:165-176

Scott J, Gradwell E. A quantitative study of the effects of chronic hypoxia on the histological structure of the rat major salivary glands. *Arch Oral Biol* 1989, 34:315-319.

Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* 2004, 96:1173-7.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012, 148:399-408.

Seo BB, Marella M, Yagi T, Matsuno-Yagi A. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS Lett* 2006, 580:6105-6108

Ship JA. Diagnosing, managing, and preventing salivary gland disorders. *Oral Dis* 2002, 8: 77-89.

Siervo M, Riley HL, Fernandez BO, Leckstrom CA, Martin DS, Mitchell K, Levett DZH, Montgomery HE, Mythen MG, Grocott MPW, Feelisch M. Effects of Prolonged Exposure to Hypobaric Hypoxia on Oxidative Stress, Inflammation and Gluco-Insular Regulation: The Not-So-Sweet Price for Good Regulation *PlosOne*, 2014:vol 9 issue 4

Siques P, Lopez de Pablo AL, Brito J, Arribas SM, Flores K, Arriaza K, Naveas N, Gonzales C, Hoorntje A, Leon-Velarde F, Lopez MR. Nitric Oxide and Superoxide Anion Balance in Rats Exposed to Chronic and Long Term Intermittent Hypoxia. *BioMed Research International* 2014, 610474.

Smith BC, Fernhoff NB, Marletta MA. Mechanism and Kinetics of Inducible Nitric Oxide Synthase Auto-S-Nitrosation and Inactivation. *Biochemistry* 2012, 51: 1028–1040

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000, 24:99-126.

Soinila J, Nuorva K, Soinila S. Nitric oxide synthase in human salivary glands. *Histochem Cell Biol* 2006, 125):717-723.

Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1797:1171-1177.

Storz JF, Scott GR, Cheviron ZA. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol* 2010, 213:4125-4136.

Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Sekine J, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Shido O. Upregulation of aquaporin expression in the salivary glands of heat-acclimated rats. *Sci Rep* 2013, 3:1763.

Surkin PN, Gallino SL, Correa F, Fernandez Solari J, De Laurentiis A. Pharmacological augmentation of endocannabinoid signaling reduces the neuroendocrine response to stress. *Psychoneuroendocrinology* 2018, 87:131-140

Suzuki A, Takai-Igarashi T, Nakaya J, Tanaka H. development of an ontology for periodontitis. *J Biomed Sem* 2015,6:60-96

Syrjala AM, Raatikainen L, Komulainen K, Knuutila M, Ruoppi P, Hartikainen S, Sulkava R, Ylöstalo P. Salivary flow rate and periodontal infection- a study among subjects aged 75 years or older. *Oral diseases* 2001, 17:387-392

Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel protein of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem* 2004, 39:1-83

Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010, 7:391-402.

Tandler B, Phillips CJ. Structure of serous cells in salivary glands. *Microsc Res Technol* 1993, 26:32–48

Terrizzi AR, Fernández-Solari J, Lee CM, Bozzini C, Mandalunis PM., Elverdin JC, Conti MI, Martínez MP. Alveolar bone loss associated to periodontal disease in lead intoxicated rats under environmental hypoxia. *Arch Oral Biol* 2013, 58:1407-1414.

Terrizzi AR, Fernandez-Solari J, Lee CM, Conti MI, Martínez MP. Lead intoxication under environmental hypoxia impairs oral health. *J Toxicol Environ Health A* 2014, 77: 1304 -1310.

Tsukinoki K, Saruta J. Role of stress-related brain derived neurotrophic factor in the rat submandibular gland. *Acta Histochem Cytochem* 2012, 45:261-267

Tsutsumi R, Xie C, Wei X, Zhang X, Flick LM, Schwarz EM, O'keefe RJ. PGE₂ signalling through the EP4 receptor on fibroblast upregulates RANKL and stimulates osteolysis. *J Bone Min Res* 2009, 24:1753-1762

UgarCankal, D & Ozmeric, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clinical Chimica Acta* 2006,366:90-100.

Urita Y, Watanabe T, Maeda T, Sasaki Y, Hike K, Muto H, Sanaka N, Nhimada N, Nakajima H, Sugimoto M. Rebamipide and mosapride enhance pilocarpine- induced salivation. *North America Journal of medical sciences* 2009, 1:121-124

Vacas MI, Amer M, Chiarenza AP, Luchelli MA, Mandalunis PM, Elverdin JC. Influence of submandibulectomy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol* 2008, 79:1075-1080

Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 2008, 79:1601-1608

Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mitochondriaNOS activity. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1757:166-172.

Verkman AS. Novel roles of aquaporins revealed by phenotype analysis of knockout mice. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2005, 155:31-55.

Van Eijden T. Biomechanics of the mandible. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000, 11:123-136

Wainwright SA, Biggs WD, Currey JD, Gosline JM (eds). *Mechanical Design in Organisms*, Edward Arnold, Londres. Blume, Madrid, 1980.

Walmsley SR, Cadwallader KA, Chilvers ER. The role of HIF-1a in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol* 2005, 26:434-439

Wang XX, Chen Y, Leung K. Role of the Hypoxia-Inducible Factor in Periodontal Inflammation. En "Hypoxia and Human Diseases" , capítulo 15, 2017.

- Weijjs WA. Mandibular movements of the albino rat during feeding. *J Morphol* 1975, 145:107-124
- Wright BM. Apparatus for exposing animals to reduced atmospheric pressure for long periods. *Brit J Haemat* 1964, 10: 75
- Xiao X, Li Y, Zhang G, Gao Y, Kong Y, Liu M et al. Detection of bacterial diversity in rat's periodontitis model under imitational altitude hypoxia environment. *Arch Oral Biol* 2012;57(1):23-29.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976,15: 212-216.
- Yamasaki A, Nikai H, Niitani K, Ijuhin N. Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. *J Periodontol* 1979, 50:641-648
- Yamamoto K, Yamamoto T, Ichioka H, Akamatsu Y, Oseko F, Mazda O, Imanishi J, Kanamura N, Kita M. Effects of mechanical stress on cytokine production in mandible-derived osteoblast. *Oral Dis* 2011, 17:712-719
- Yao C, Wei W, li X, Hosoi K. Acute phase protein induction by experimental inflammation in the salivary gland. *J Oral Pathol Med* 2005, 34:364-367
- Yayla EM, Yavuz E, Bilge U, Keskin A, Binen E. Drugs with anticholinergic side-effects in primary care. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 2015, 18:18-21
- Young WG, Ramirez-Yañez GO, Daley TJ, Smid JR, Coshigano KT, Kopchick JJ, Waters MJ. Growth hormone and epidermal growth factor in salivary glands of giant and dwarf transgenic mice. *J Histochem Cytochem* 2004, 52:1191-1197
- Zaobornyj T, Valdez LB, Iglesias DE, Gasco M, Gonzales GF, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME, and L-arginine treatments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, 296:H1741-747
- Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE, Humphreys-Beher MG, Donald IH, Williams HB. Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *J Dent Res* 1995, 74:1826-1832
- Zhang G, Yan Kong, Yu-Qi Gao, Jun Lv, Xi Wu and Ying-Hui Tan. Periodontitis in a High-altitude Hypoxic Environment Through Rat Model Simulation. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 2013, 8: 593-603
- Zhao L, Wu Y, Xu Z, Wang H, Zhao Z, Li Y, Yang P, Wei X. Involvement of COX-2/PGE2 signalling in hypoxia-induced angiogenic response in endothelial cells. *J Cell Mol Med*. 2012,16:1840-1855.

Bibliografía

Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *Yale J Biol Med* 2007, 80:51-60

Dra. María del Pilar Martínez
Directora

Od. Antonela R. Terrizzi
Tesisista

Dr. Javier Fernández Solari
Co-director