



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Efectos de la Terapia Fotodinámica y el Alendronato Sódico sobre la Periodontitis Experimental en Ratas**

**D. Roque Samuel Davia Peña**

**2019**







# AGRADECIMIENTOS

Cuando uno se embarca en un proyecto de esta envergadura, es muy difícil de llevar a cabo en solitario, siendo fundamental el apoyo tanto de las personas relacionadas con el proyecto como de las personas cercanas. Por eso me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a todas esas personas presentes durante este largo tiempo.

En primer lugar, tengo que dar las gracias a Fabio Camacho Alonso mi tutor y uno de mis directores de tesis. Sin lugar a duda ha sido mi guía y mentor en este proyecto. Gracias a su experiencia, conocimientos, predisposición y especialmente a su paciencia conmigo, el proyecto ha podido llegar a su fin felizmente.

También me gustaría agradecer a Carlos Vilaplana Vivo, mi segundo director, figura imprescindible para comenzar la fase experimental del estudio y de gran ayuda en las fases de aplicación del tratamiento. Un apoyo muy importante durante estos años.

Gracias a Yolanda Martínez Beneyto, que a pesar de no ser directora de la tesis me prestó toda la ayuda que necesité durante la fase experimental.

Agradecer también a María del Rosario Tudela Mulero y a José Joaquín Merino Martín por su trabajo de laboratorio.

Pero no solo es importante la gente directamente implicada en el proyecto, el apoyo de todas esas personas que nos acompañan en el día a día es fundamental, y entre todas, se lo debo agradecer especialmente a Marta, mi compañera en la vida y apoyo más importante, el empuje y ayuda que me ha dado ha sido uno de los factores más importantes para poder sacar adelante el proyecto.

No puedo olvidar a mi familia, mi madre, mi padre y mi hermano siempre han sido las figuras de apoyo más importantes en todos los proyectos de mi vida, y en este no ha sido distinto. Muchas gracias familia.

No puedo dejar de agradecer a Marcela, la figura que me ha acompañado en todos los momentos de la escritura de la tesis, estando presente hasta en las madrugadas más largas y cansadas, su presencia y cariño siempre me da más fuerza y alegría.

Y finalmente, pero no menos importante, tengo que darle las gracias a mi amigo y compañero José Lacal. Juntos empezamos nuestros proyectos de tesis doctoral, y juntos lo hemos terminado. Su ayuda, ánimo y empatía han estado presentes todo este tiempo.

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ALA:** ácido 5-aminolevulínico

**ALN:** alendronato

**BF:** bifosfonatos

**CA:** cresta alveolar

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**CRP:** proteína C-reactiva

**CT:** tomografía computarizada

**DMO:** densidad mineral ósea

**EO:** estrés oxidativo

**ERO:** especies reactivas de oxígeno

**EU:** Unión Europea

**FPP:** farnesil pirofosfato sintetasa

**FS:** fotosensibilizador

**GUN:** gingivitis ulcerativa necrosante

**HV:** hiperplasia verrucosa oral

**IL-1:** interleuquina-1

**IL- 6:** interleuquina-6

**IL-8:** interleuquina-8

**IL-11:** interleuquina-11

**LLLT:** terapia con láser de baja potencia

**MMP:** metaloproteinasas de matriz

**MCSF:** factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

**MDA:** malonaldehído

**MPO:** mieloperoxidasa

**MTA:** agregado de Trióxido Mineral

**OPG:** osteoprotegerina

**PGE2:** prostaglandina E<sub>2</sub>

**PBS:** tampón fosfato salino o buffer fosfato salino

**PET:** Tomografía por Emisión de Positrones

**PMN:** Leucocitos polimorfonucleares

**PRR:** papilomatosis respiratoria recurrente

**PUN:** periodontitis ulcerativa necrosante

**RANK:** receptor activador del factor nuclear kappa B.

**RANKL:** ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B.

**RAR:** alisado radicular

**RDI:** regiones de interés

**REGA:** registro general de explotaciones ganaderas

**SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SPECT:** tomografía computarizada de emisión monofotónica

**TFD:** terapia fotodinámica

**TRAP:** fosfatasa ácida tartrato resistente

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**UCE:** unión cemento esmalte

**UH:** unidades Hounsfield

**VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana

**VPH:** virus del papiloma humano

## RESUMEN

**Objetivos:** Se ha demostrado que la terapia fotodinámica (TFD) y los fármacos antirresortivos como el alendronato (ALN) reducen la pérdida ósea alveolar. El objetivo de este estudio era evaluar los posibles efectos sinérgicos de la combinación de TFD y ALN sobre la pérdida ósea alveolar en ratas con periodontitis. **Material y Métodos:** Se indujo la periodontitis mediante ligadura a 60 ratas Wistar y se distribuyeron al azar en: Grupo 1 (control); Grupo 2 (TFD); Grupo 3 (ALN 0,01 mg / kg); Grupo 4 (ALN 0,25 mg / kg); Grupo 5 (TFD + ALN 0,01 mg / kg) y Grupo 6 (TFD + ALN 0,25 mg / kg). Las ratas fueron sacrificadas el día 12 y se procesaron las mandíbulas para: análisis morfométrico macroscópico, micro CT para analizar la densidad mineral ósea (DMO) y análisis histológico. Se tomaron muestras gingivales para evaluar los niveles de mieloperoxidasa (MPO) y malonaldehído (MDA). **Resultados:** El orden de los grupos de mayor a menor según la pérdida ósea y la actividad inflamatoria en el estudio histológico fue: control > ALN 0.01 mg/kg > TFD > ALN 0.25 mg/kg > TFD + ALN 0.01 mg/kg > TFD + ALN 0.25 mg/kg, mientras que el orden de menor a mayor según la DMO fue: control < ALN 0.01 mg/kg < TFD < ALN 0.25 mg/kg < TFD + ALN 0.01 mg/kg < TFD + ALN 0.25 mg/kg. El orden de mayor a menor según la actividad de la MPO y el MDA fue: control > ALN 0.01 mg/kg > TFD > ALN 0.25 mg/kg > TFD + ALN 0.01 mg/kg > TFD + ALN 0.25 mg/kg. Los resultados positivos obtenidos en el grupo tratado con TFD + ALN 0,25 mg / kg, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en comparación con los otros cinco grupos para la DMO, la MPO y el MDA. **Conclusión:** El tratamiento combinado de TFD + ALN 0,25 mg / kg demostró un efecto protector sobre la pérdida ósea alveolar.



## SUMMARY

**Objective:** Photodynamic therapy (PDT) and antiresorptive drugs such as alendronate (ALN) have been shown to reduce alveolar bone loss. The aim of this study was to evaluate the possible synergic effects of combining PDT and ALN on bone loss in periodontitis in rats. **Material and Methods:** Periodontitis was induced by ligature in 60 Wistar rats and were randomized in: Group 1 (control); Group 2 (PDT); Group 3 (ALN 0.01 mg/kg); Group 4 (ALN 0.25 mg/kg); Group 5 (PDT + ALN 0.01 mg/kg) and Group 6 (PDT + ALN 0.25 mg/kg). The rats were sacrificed on day 12 and the mandibles were processed for: macroscopic morphometric analysis, micro CT to analyze bone mineral density (BMD) and histological analysis. Gingival samples were collected to evaluate myeloperoxidase (MPO) and malonaldehyde (MDA) levels. **Results:** Bone loss and inflammatory activity in histological study from the greatest to least was: control > ALN 0.01 mg/kg > PDT > ALN 0.25 mg/kg > PDT + ALN 0.01 mg/kg > PDT + ALN 0.25 mg/kg, while the order from least to greatest BMD was control < ALN 0.01 mg/kg < PDT < ALN 0.25 mg/kg < PDT + ALN 0.01 mg/kg < PDT + ALN 0.25 mg/kg. The order of MPO and MDA activity from greatest to least was control > ALN 0.01 mg/kg > PDT > ALN 0.25 mg/kg > PDT + ALN 0.01 mg/kg > PDT + ALN 0.25 mg/kg. The positive results obtained in the group treated PDT + ALN 0.25 mg/kg, showed statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) compared with the other five groups for the BMD, MPO and MDA. **Conclusion:** Combined approach therapy of PDT + ALN 0.25 mg/kg demonstrated a protective effect on alveolar bone loss.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
1. Introducción	1
1.1. Enfermedad periodontal	1
1.1.1. Historia	1
1.1.2. Anatomía periodontal	2
1.1.3. Fisiología periodontal	4
1.1.4. Clasificación	6
1.1.5. Etiopatogenia	13
1.1.6. Tratamiento	18
1.2. Bifosfonatos	21
1.2.1. Historia	21
1.2.2. Mecanismos de acción	22
1.2.3. Farmacocinética	23
1.2.4. Bifosfonatos más utilizados	23
1.2.5. Aplicaciones clínicas	24
1.2.6. Efectos secundarios	25
1.3. Terapia Fotodinámica	27
1.3.1. Historia	27
1.3.2. Mecanismos de acción	28
1.3.3. Fotosensibilizantes	30
1.3.4. Campos de actuación	33
1.3.5. Contraindicaciones	41
1.3.6. Efectos adversos	41
1.3.7. Limitaciones de uso	42
1.4. Modelos de experimentación animal	42
1.4.1. Animales de experimentación	42

	<b>Página</b>
1.4.2. Modelos de inducción a la enfermedad periodontal	45
2. Justificación y Objetivos	47
2.1. Justificación	47
2.2. Objetivos	50
3. Materiales y Métodos	51
3.1. Material	51
3.2. Métodos	55
4. Resultados	71
4.1. Análisis morfométrico macroscópico	71
4.2. Estudio micro CT	72
4.3. Análisis histológico de la disminución ósea alveolar	73
4.4. Actividad de la mieloperoxidasa	74
4.5. Niveles de malonaldehído	75
5. Discusión	76
6. Conclusiones	80
7. Bibliografía	81
8. Anexos	94

# INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal englobaba varios tipos de patologías de origen infeccioso y naturaleza inflamatoria producida principalmente por la colonización de bacterias, comúnmente de tipo gram negativo y cuyo desarrollo puede ser agudo o crónico. El daño tisular en la enfermedad avanzada producido por la reacción inflamatoria afectará en este caso al área circundante a la lesión, afectando a las estructuras tisulares de sostén, provocando la pérdida de inserción del tejido conectivo y del mismo hueso alveolar, destruyendo así el sistema de sostén que ancla los dientes a la cavidad oral (Highfield, 2009).

La acumulación de placa dental rica en bacterias inducirá al desarrollo de la inflamación al estimular la respuesta inmunitaria. El sistema inmunológico actuará, induciendo la infiltración de leucocitos polimorfonucleares, y provocando edema y dilatación de los vasos. Sin embargo, es la propia respuesta inmunológica uno de los causantes de la pérdida del tejido de sostén junto la acción de las toxinas bacterianas (Reynolds-Campbell y cols., 2017).

Sin embargo, a colonización bacteriana no es el único factor necesario para el desarrollo de la enfermedad, ya que existen un gran número de factores dependientes del paciente que afectarán directamente al desarrollo de la enfermedad (Genco y Borgnakke, 2013).

### 1.1.1. Historia

Los primeros indicios del conocimiento y del tratamiento de la enfermedad periodontal datan de hace más de 5000 años, donde existen indicios del diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en las antiguas civilizaciones chinas y egipcias (Gold, 1985). Existen documentos firmados por Abu I Quiasim donde se describen tratamientos periodontales en el siglo X en España. Algunos escritos más recientes, como el libro El “The Surgeon Dentist” en 1728 de Pierre Fauchard o “A Practical Practise Treatise on the Diseases of the teeth” publicado por John Hunter en el año 1778 describen la enfermedad

y los tratamientos de la época. Sin embargo, no se encontraron evidencias de la existencia de microorganismos hasta el siglo XVII por Von Leewenhoek en el tejido gingival. Sin embargo, no se aceptó una relación directa con la enfermedad hasta los descubrimientos de Adolph Wivel en el siglo XIX. Paralelamente, John Riggs, un periodoncista americano, relacionó factores locales y sistémicos con la enfermedad periodontal. Fue en este siglo cuando comenzaron las primeras clasificaciones de la enfermedad según sus características visibles (Highfield, 2009). Desde entonces se han realizado varias clasificaciones atendiendo a los descubrimientos que se iban consiguiendo, destacando la figura de Armitage por sus aportes al conocimiento de la enfermedad (Armitage, 1996).

Finalmente, ya fue en 1999 cuando la Asociación Americana de Periodoncia estableció la clasificación que se utiliza hoy en día por su complejidad y detalle, siendo la clasificación más completa (Armitage, 1999).

### **1.1.2. Anatomía periodontal**

Para conocer más acerca de la enfermedad periodontal es de vital importancia entender la anatomía. Denominamos periodonto al conjunto de tejidos encargados de llevar a cabo el anclaje de las piezas dentales al resto de estructuras de la cavidad bucal, hecho fundamental para poder llevar a cabo la función masticatoria. Dividiremos en dos grupos las estructuras que forman parte de todo el sistema:

- Tejidos duros
  - **Esmalte.** A pesar de que el esmalte es el componente más externo de la corona de las piezas dentales, tiene una relación directa en el anclaje, ya que las células epiteliales se anclan a este desde la erupción del diente.
  - **Cemento.** Al igual que el esmalte, anatómicamente forma parte de las piezas dentales. Sin embargo, presenta funciones fundamentales en la inserción. El cemento es un tejido muy similar en su composición al hueso (aunque no presenta vascularización interna) que cubre la raíz del diente, y cuya función se debe a que

sirve de inserción para las fibras de Sharpey del ligamento periodontal.

- **Hueso alveolar.** Es el tejido óseo que forma la cresta alveolar donde van insertadas las piezas dentales. Sirve de inserción para la otra cara del ligamento periodontal. Se caracteriza por tener la capacidad de remodelarse según las cargas que recibe, y se reabsorbe gradualmente tras la pérdida de los dientes. Presenta 3 partes distas: *Compacta externa o cortical*, que recubre la zona más externa de la cresta, tanto vestibular como lingualmente; *hueso alveolar*, es la cara que se encuentra prácticamente en contacto con los dientes, en ella se ancla el ligamento periodontal y permite el paso de los paquetes vasculares que nutren los dientes; hueso esponjoso, es un tejido trabeculado que permite amortiguar y distribuir las presiones recibidas por los dientes.
  
- Tejidos blandos
  - Mucosa oral. Es el tejido que tapiza la mayor parte de la extensión de la cavidad bucal, estando presente en la lengua, paladar, mejillas y encía.
  - Encía. Es el tejido que abraza las piezas dentales y la zona más coronal de la cresta alveolar. Presenta una porción libre y otra adherida. La porción libre abarca desde la línea amelocementaria, hasta la zona más coronal (1,5 mm aproximadamente). Las papilas forman parte de esta parte de la encía. La encía adherida continúa desde la encía libre hasta el límite mucogingival donde comienza el resto de mucosa de revestimiento oral. Tiene un color más pálido que la libre y un punteado característico.
  - Ligamento periodontal. Tejido conectivo encargado de mantener unidos los dientes al hueso. Es capaz de recibir los impactos de la masticación para impedir la incrustación de los dientes en el alveolo. Está formado por una gran cantidad de fibras que se

diferencian entre sí por su posición (supracrestales o infracrestales) y por su dirección (horizontales, oblicuas, interdentes, interradiculares, circulares y apicales).

### **1.1.3. Fisiología periodontal**

El periodonto es un tejido que se encuentra en constante agresión debido a sus funciones y a su exposición al medio externo y a patógenos. Es por ello por lo que es un tejido con una gran actividad metabólica y de regeneración. Al igual que la anatomía, es imprescindible entender los procesos inmunitarios y de regeneración que están presentes en el periodonto (Pihlstrom y cols, 2005).

Al igual que en el resto del sistema inmunitario, vamos a encontrar varias líneas de defensa, como son las barreras, la inmunidad innata y la inmunidad adquirida (Pihlstrom y cols, 2005):

- Barreras. Se van a encargar de evitar la intromisión y expansión de los patógenos. En la cavidad bucal contamos con varias barreras:
  - PH oral. La capacidad tampón de la saliva va a conseguir que los niveles de pH bucal se mantengan lo más estables posibles. Esto ralentiza el crecimiento de ciertas colonias de patógenos.
  - Físicas. La presencia del epitelio que recubre las mucosas orales supone una barrera infranqueable para la gran mayoría de patógenos orales.
  - Temperatura. Mantener la temperatura corporal estable impide por sí sola el crecimiento de patógenos.
  - Microbiota normal. La flora estable presente en la cavidad oral va a evitar por pura competición la colonización de organismos exógenos, así como un equilibrio entre las presentes. Un desequilibrio de este microbiota da lugar a la aparición de distintas enfermedades.



- Exudado cervical. La continua eyección de fluido trasudado del surco puede convertirse en un exudado en caso de inflamación que consigue la expulsión de microorganismos en el surco
- Substancias antimicrobianas. El organismo es capaz de generar sustancias capaces de dificultar la expansión bacteriana como las lisozimas, las catepsinas o los agentes quelantes.
- Inmunidad innata. Mecanismo defensivo inespecífico. Dividido en:
  - Mecanismos humorales (CRP, interferones, sistema de complemento).
  - Mecanismos celulares
    - Células Natural Killer
    - PMN eosinófilos
    - Fagocitos
    - Mecanismos dependientes de oxígeno.
    - Mecanismos independientes de oxígeno (enzimas hidrolíticas).
- Inmunidad específica. Mecanismos adquiridos por el sistema inmunitario para combatir amenazas que los sistemas anteriores no pueden eliminar. Se divide en:
  - Mecanismos humorales. Llevado a cabo por anticuerpos y linfocitos B, más eficaz en infecciones posteriores gracias a la memoria inmunológica
  - Mecanismos celulares. Llevado a cabo por los linfocitos T.

Los daños provocados en el tejido se van a reflejar en la aparición de una reacción inflamatoria que será el origen de la pérdida de tejido óseo (Pihlstrom y cols, 2005).

### 1.1.4. Clasificación

A lo largo del tiempo y debido al desarrollo y aumento de conocimientos, la clasificación de las enfermedades periodontales ha cambiado. En la actualidad, la clasificación vigente fue establecida en el año 1999 por la Asociación Americana de Periodoncia (Highfield, 2009).

#### 1.1.4.1. Enfermedad gingival

Dentro de la enfermedad gingival, o gingivitis vamos a encontrar varias patologías que afectan a el tejido gingival y que comparten entre sí varias características (Armitage, 1999):

- Presencia de placa bacteriana.
- Inflamación gingival, con enrojecimiento y sangrado.
- Posible evolución a enfermedad con pérdida de inserción.
- Reversibles si eliminamos las causas

La diferencia es el origen de la enfermedad. Destacamos los siguientes (Armitage, 2000):

- Asociada a placa bacteriana

Causa más común de gingivitis. Se debe al acúmulo de placa bacteriana que provoca una inflamación de tejido gingival con sangrado. No existen pérdida de tejido de inserción, y se trata eliminando la placa bacteriana.

- Asociada a factores sistémicos

Pueden estar asociados al sistema endocrino, como en el caso de la pubertad, el ciclo menstrual, el embarazo o la Diabetes Mellitus.

A parte, pueden estar relacionadas con discrasias sanguíneas. En estos casos destaca la leucemia.

- Asociada a medicamentos

Medicamentos como anticonceptivos, anticonvulsiantes, antihipertensivos o inmunosupresores han demostrado estar relacionados con la presencia de gingivitis en pacientes que los consumen.

- Causadas por malnutrición

La deficiencia de vitamina C se relaciona directamente con la aparición de gingivitis.

Existen casos de gingivitis que no se relacionan con la presencia de placa bacteriana (Pihlstrom y cols., 2005):

- Origen bacteriano

Asociadas a enfermedades bacterianas. Entre ellas la sífilis, la gonorrea o las especies estreptocócicas.

- Origen vírico

Destacan las infecciones herpéticas, como la gingivoestomatitis herpética. Es una enfermedad que provoca la formación de vesículas que forman úlceras dolorosas una vez se rompen.

- Origen fúngico

Las infecciones por *Cándida Albicans* resultan las más comunes dentro de las gingivitis de origen fúngico. Enfermedad que se aprovecha de momentos de bajadas de defensas o desequilibrio de la flora oral para desarrollarse.

- Origen genético

Padecimiento de fibromatosis gingival hereditaria.

- Estado sistémico

Se pueden deber a reacciones alérgicas o a enfermedades mucocutáneas como el lupus eritematoso o el liquen plano oral.

- Lesiones traumáticas:

Traumas que pueden ser ocasionados por el propio individuo como en un cepillado excesivamente agresivo o lesiones iatrogénicas.

- Reacciones a cuerpo extraño:

La presencia de un cuerpo extraño provocará una reacción inflamatoria localizada solo en la zona afectada.

- Lesiones no específicas:

Hemangiomas o leucoplasias.

#### **1.1.4.2. Periodontitis crónica**

La periodontitis crónica se caracteriza por la existencia de la pérdida de inserción de las piezas dentales por reabsorción ósea, con presencia de bolsas periodontales e inflamación gingival. Otros signos típicos son el sangrado y supuración, la movilidad dentaria y recesiones o sobrecrecimientos gingivales con la pérdida de dientes en última instancia. Se denomina periodontitis localizada cuando la afectación es inferior al 30% del periodonto, siendo generalizada cuando la extensión es mayor. Podemos clasificarlas según su gravedad (Bascones-Martínez y Figuero, 2005):

- Periodontitis leve: pérdida de inserción inferior a 2 mm.
- Periodontitis moderada: pérdidas de inserción entre 3 y 4 mm.
- Periodontitis severa: pérdidas mayores o iguales a 5 mm.

La placa bacteriana y su virulencia en conjunto con los mecanismos defensivos son los factores más asociados a la aparición de las periodontitis crónicas (Bascones-Martínez y Figuro, 2005).

#### **1.1.4.3. Periodontitis agresiva**

La periodontitis agresiva es una enfermedad que provoca una pérdida muy rápida de los tejidos de inserción. Esta destrucción severa del tejido no se corresponde con los depósitos microbianos, pero aparece gran concentración de bacterias del complejo rojo. En caso de afectar a dos dientes o menos se considera localizada. La periodontitis agresiva generalizada es común en paciente de menos de 30 años y afecta a más de 3 dientes (Bascones-Martínez y Figuro, 2005).

#### **1.1.4.4. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas**

Casi todas las enfermedades sistémicas asociadas a la periodontitis tienen una base genética. Se pueden clasificar según su asociación en (Bascones-Martínez y Figuro, 2005).:

- Enfermedades de alteraciones hematológicas.

Algunos ejemplos son la neutropenia cuantitativa, la leucemia o la alteración de otras células sanguíneas como los hematocitos o las plaquetas.

- Enfermedades de alteraciones genéticas.

Es el grupo que más enfermedades recoge. Podemos resaltar el Síndrome de Down, la Neutropenia familiar, Síndrome de Chediak-Higashi, Síndrome de Histiocitosis, Síndrome de Cohen o la hipofosfatasa.

- Otras enfermedades sistémicas.

Entre las que se encuentran la Diabetes Mellitus, enfermedades asociadas a factores ambientales (tales como el estrés y tabaco), alteraciones hormonales como la osteoporosis postmenopáusica o el embarazo, SIDA, asociado a consumo de medicamentos y presencia de pénfigos y penfigoides gingivales.

#### **1.1.4.5. Enfermedad periodontal necrotizante**

La gingivitis ulcerativa necrosante (GUN) es una enfermedad periodontal que presenta necrosis de las papilas interdentes. Cursa con dolor sangrado y úlceras en el tejido gingival. Otros síntomas característicos son la halitosis, fiebre e incluso malestar general. Los factores asociados son el consumo de tabaco, malnutrición, inmunosupresión, estrés, traumatismos o gingivitis previa. La enfermedad se resuelve tras recibir tratamiento periodontal adecuado, así como antibiótico sistémico (Bascones-Martínez y Figuero, 2005).

La periodontitis ulcerativa necrosante (PUN) presenta las mismas características que la GUN, pero añadiendo la necrosis del hueso alveolar y del ligamento periodontal.

#### **1.1.4.6. Abscesos del periodonto**

Existen varios casos de abscesos que afectan al tejido periodontal:

- Absceso periodontal

Acúmulo de pus que comunica con la cavidad oral por el surco gingival. Se trata de una patología muy destructiva con el tejido periodontal, por lo que la pieza afectada sufre a menudo movilidad y extrusión, con presencia de dolor agudo e imposibilidad de masticar. En infecciones mayores puede presentar hipertermia sistémica. El tratamiento se basa en el drenaje del material purulento para aliviar el malestar y la

presión, y pautar antibiótico adecuado (Bascones-Martínez y Figuero, 2005).

- Absceso gingival

También denominado síndrome del septo. El origen de esta infección no es bacteriano. Se debe a la impactación de un cuerpo extraño dentro de la encía, lo que provoca una reacción inflamatoria localizada con dolor, sangrado y deformación de la papila. La patología se resuelve al eliminar el cuerpo extraño incrustado en el tejido. (Bascones-Martínez A y Figuero, 2005).

- Absceso pericoronario

Infección provocada por la erupción de piezas dentales, siendo las probable su aparición en la erupción de los terceros molares. El tratamiento se basa en el uso de antisépticos orales como la clorhexidina. En caso de infecciones mayores será necesario pautar antibiótico sistémico. En caso de urgencia se puede recurrir al drenaje. (Bascones-Martínez y Figuero, 2005).

#### **1.1.4.7. Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas**

Lesiones que afectan tanto a la pulpa dental como al sistema periodontal. Esto se debe a que existe una relación dinámica entre ambos sistemas. Una afectación pulpar, puede conllevar la producción de una lesión infecciosa que acabe afectando al espacio periodontal contiguo. Las lesiones endoperiodontales siempre van a cursar con una vitalidad pulpar negativa y la presencia de una bolsa periodontal que llega hasta el ápice o a algún conducto lateral. El tratamiento consistirá en llevar a cabo la endodoncia de la pieza afectada. Si el tratamiento tiene éxito, el daño periodontal se recupera. En caso de que haya afectación del cemento radicular, puede necesitar de tratamientos periodontal (Sanz-Sánchez y Bascones-Martínez, 2008).

#### 1.1.4.8. Deformidades y condiciones adquiridas

Desatacaremos 3 patologías de interés dentro de este grupo (Sanz-Sánchez y Bascones-Martínez, 2008):

- Reabsorción Radicular

Patología asociada a tratamientos ortodóncicos, traumatismos, presencia de infecciones o tratamientos de blanqueamientos. Pueden ocurrir espontáneamente. Se clasifican según el tercio radicular afectado (Sanz-Sánchez y Bascones-Martínez, 2008).

- Perforación radicular

Origen iatrogénico. Puede ocurrir durante un tratamiento endodóntico o conservador, al perforar las estructuras dentarias provocando comunicaciones con los espacios exteriores circundantes, ya sea con limas fresas o pernos. Este tipo de lesiones conllevará a una reacción inflamatoria con difícil solución. Se han descrito técnicas de sellado, con materiales como el MTA, pero todos los tratamientos posibles tienen una predictibilidad baja (Sanz-Sánchez y Bascones-Martínez, 2008).

- Fractura radicular

Lesiones caracterizadas por el difícil diagnóstico. Producidas normalmente por traumas. El tratamiento es la exodoncia de la pieza afectada, aunque en caso de piezas multirradiculares, si la lesión afecta a una sola raíz, se puede plantear la amputación de la misma, siempre con las consecuencias que ese tipo de tratamientos conlleva ciertos riesgos que el paciente debe asumir (Sanz-Sánchez y Bascones-Martínez, 2008).



### **1.1.5. Etiopatogenia**

Como ya se ha mencionado, la enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio de origen bacteriano que está influenciado por un gran número de factores, la cual puede tener un curso agudo o crónico.

El principal agente causal de la enfermedad periodontal son las bacterias. La presencia de bacterias provoca una respuesta inmunitaria, que, al mantenerse extendida en el tiempo, provocará daños en los tejidos de sostén de las piezas dentarias. Las bacterias tienen la capacidad de asociarse para formar la placa dental, un depósito blando que se adhieren a los tejidos duros dentarios. El acumulo de esta biofilm, resultado de una mala higiene, será el responsable de la aparición de la gingivitis, la cual podrá evolucionar a periodontitis dependiendo del resto de factores que se extenderán más adelante (Offenbacher, 1996).

#### **1.1.5.1. Placa dental**

La placa se va a caracterizar según su potencial patogénico (si es cariogénica o periodontopatógena), según su adherencia y según su localización. La placa supragingival es como se denomina a la placa expuesta cuya composición es principalmente de bacterias Gram positivo sacarolíticas y tiene un potencial patogénico cariogénico. La placa que se desarrolla al fondo del surco gingival, o placa subgingival, se compone de bacterias gramnegativas y periodontopatógenas por su capacidad proteolítica (Marsh, 2004).

El desarrollo de la placa gingival se divide en varias fases

- Formación de la película adherida.

Formada por proteínas y glucoproteínas con capacidad de adherirse al esmalte dental.

- Colonización de microorganismos

En esta fase, las bacterias entrarán en contacto con la película y se adherirán a esta por medio de las adhesinas, unas proteínas con propiedades adherentes.

- Coagregación

Fase en la cual la placa madura, y nuevas colonias bacterianas se van acumulando en la superficie por medio de las lectinas. En esta fase, la placa comienza a ser patogénica.

- Formación de matriz

Fase fina donde se crea una matriz estable donde las colonias de las distintas bacterias interactúan entre sí.

Debido a la interacción presente en la matriz celular de la placa, muchas bacterias patogénicas con el periodonto consiguen desarrollarse y crecer, algo imposible si no existiera esta sinergia (Rosan y Lamont, 2000).

### **1.1.5.2. Microorganismos implicados**

Como hemos hablado, la placa bacteriana causante del inicio de la enfermedad periodontal se compone de una gran variedad de distintas bacterias. Por ello, es importante conocer cuál de estas son las causantes del desarrollo de la enfermedad. Resaltamos que, aunque algunas bacterias no se implican directamente, si son necesarias para la progresión de las verdaderamente patológicas (Holt y Ebersole, 2005).

- Bacterias implicadas indirectamente
  - Haemmophilus aphrophilus
  - Haemmophilus actinomytemcomitans
  - Capnocitophaga gingivalis
  - Eikenella corrodens
  - Provatella intermedia

- Bacterias implicadas directamente. Es el denominado complejo rojo por Socransky en 1998. En éste se encuentran las bacterias que muestran una gran relación con la enfermedad periodontal.
  - Porphyromona gingivalis
  - Tanarella Forshyha
  - Aggregatibacter actinomytemcomitans

### **1.1.5.3. Factores locales**

Los factores locales se relacionan directamente con la localización de los tejidos afectados por la enfermedad periodontal, afectando en el mismo individuo con mayor o menor gravedad en distintas localizaciones. Las alteraciones que provocan estas diferencias pueden darse tanto en los tejidos blandos como los duros, tanto individualmente como en conjunto. En ocasiones observamos como la enfermedad afecta de distintas maneras (Kornman y Löe, 1993).

- Tejidos blandos. Alteraciones de los tejidos que cubren la cavidad oral, y tejidos circundantes a las piezas dentales. Encontramos varias alteraciones (Kornman y Löe, 1993).
  - Técnica de cepillado. La ausencia de una higiene oral correcta conllevará al acúmulo excesivo de placa bacteriana. Los cepillados excesivamente agresivos pueden provocar un daño directo sobre el tejido gingival desencadenando reacciones inflamatorias y la enfermedad periodontal.
  - Biotipo gingival. Los biotipos gruesos acumulan más sarro apareciendo bolsas periodontales con menos dificultad, mientras los más finos presentan una mayor facilidad para sufrir recesiones
  - Existencia de recesiones. Asociado directamente a la pérdida de hueso posterior.
  - Parafunciones. El bruxismo afectará a la inserción por trauma oclusal.

- Respiración oral. Relacionado con la falta de humedad de la cavidad oral, tanto por la disminución de la humedad, como por la disminución de los factores protectores de la saliva.
- Tejidos duros. Puede afectar al esmalte dental, a la raíz o al hueso alveolar (Kornman y Løe, 1993).
  - Esmalte dental. Factores como anomalías anatómicas, o malformaciones que afectan a la estructura del esmalte como la amelogénesis imperfecta.
  - Raíz. Los factores que afectan a la raíz pueden ser por un fallo en el desarrollo embriológico, o daños posteriores de origen traumático. El factor posterior más importante es el daño por traumatismo, que suele provocar fracturas o fisuras radiculares. Estos daños suelen provocar la pérdida de la pieza, pero incluso en los casos en los que se puede mantener el diente, la pérdida de soporte óseo lo hace más susceptible a sufrir daños periodontales. Los factores más importantes causados por anomalías en el desarrollo son:
    - Surcos radiculares. Unos surcos anormales facilitarán la penetración de microorganismos patógenos en el tejido subgingival.
    - Raíces supernumerarias. Provocan una mayor dificultad a la hora de higienizar y eliminar la placa.
    - Taurodontismo y dilaceraciones radiculares
    - Perlas de esmalte. Estos acúmulos anormales de esmalte en la raíz del diente que sirve como depósito para los patógenos.
    - Dentinogénesis imperfecta. La malformación de la dentina conlleva una formación anormal del cemento circundante que puede facilitar la aparición de la enfermedad periodontal.

- Hueso alveolar
  - Enfermedades con afectación ósea sistémica como osteoporosis, osteopenia, osteomalacia o enfermedad de Paget
  - Anomalías estructurales como las dehiscencias o las fenestraciones, ya sean provocadas por infecciones, traumáticas, iatrogénicas o en el desarrollo del hueso.
  - Tratamiento con bifosfonatos que afectan a la actividad de los osteoclastos.
  - Tratamiento con radioterapia.

#### **1.1.5.4. Factores Generales**

Existen muchos factores generales que pueden afectar al desarrollo de la enfermedad periodontal (Kirkevang y cols., 2007).

- Inmunidad. La existencia de alguna merma en las capacidades de inmunidad de la persona puede provocar el desarrollo de la enfermedad, ya afecte a la inmunidad específica, a la inespecífica o sea por una enfermedad autoinmune.
- Vascularización. Los factores que afectan a la vascularización del tejido gingival se relacionan directamente no la aparición de la enfermedad periodontal, como la hipofunción masticatoria.
- Otros factores. Otros factores que pueden afectar son:
  - Edad
  - Herencia genética
  - Hábitos de higiene
  - Tabaquismo
  - Estrés
  - Enfermedades metabólicas como la diabetes.

### **1.1.6. Tratamiento de la enfermedad periodontal**

El tratamiento de este tipo de patologías se basa principalmente en la remoción del cálculo tanto subgingival como supragingival, eliminando de esta manera el foco infeccioso y en teoría la causa de la patología. Es por eso por lo que un buen diagnóstico es importante para hacer una buena planificación del tratamiento. Contamos con varios tratamientos a la hora de tratar la enfermedad periodontal (Caffesse y cols., 1986).

#### **1.1.6.1. Tartrectomía**

La acumulación de cálculo supragingival favorecerá la instauración de la placa bacteriana. En este punto se desarrollará la gingivitis. Esta primera fase de la enfermedad periodontal se tratará básicamente con la remoción del cálculo supragingival. Para ello se realizará una tartrectomía, que permitirá eliminar la suciedad, ya sea mediante instrumentos ultrasónicos elección preferente en la actualidad, rotatorios (fresas de diamante para contraángulo) o con instrumentos manuales, los cuales se encuentran en desuso. Existen otros medios menos utilizados como los instrumentos sónicos (White, 1997).

#### **1.1.6.2. Raspado y alisado radicular (RAR)**

Tratamiento preferente para tratar la periodontitis. Consiste en la remoción del cálculo subgingival que provoca el desarrollo de la pérdida del tejido de inserción. Se llevará a cabo cuando existan bolsas periodontales de más de 3 mm de profundidad. El objetivo del RAR será devolver la salud del tejido periodontal, eliminando el origen del problema y creando una superficie apta para la reinserción de los tejidos blandos en los dientes (Loesche y Grossman, 2001).

- **Procedimiento**

El procedimiento de elección es el RAR con instrumentos manuales, siendo las curetas las más utilizadas. En este caso se introduce el instrumento enfocando con la parte activa hacia la bolsa periodontal, se activa mediante la posición y se extraen los cálculos (raspado).

Posteriormente se alisará la zona tratada para dejar la raíz en buenas condiciones para la reinsertión, aunque el resultado no siempre es el mejor, por lo que contamos con otros sistemas. Destacan los sistemas sónicos, ultrasónicos y rotatorios, para conseguir un alisado más efectivo (Pérez y Fenoll, 1996).

- **Limitaciones**

A pesar de los buenos resultados que se obtienen, no se consigue una eliminación total de todo el cálculo y es debido a las limitaciones que presenta:

- Profundidad de las bolsas periodontales

Cuando la profundidad de la bolsa periodontal es mayor a 6 mm, los resultados son mucho peores que en bolsas menos profundas

- Anatomía radicular anormal.

La presencia de bifurcaciones, perlas de esmalte y otras anomalías de la raíz aumentará la dificultad del raspado, disminuyendo por tanto el resultado final.

- Posición de los dientes

La existencia de apiñamientos, y los dientes posteriores por su peor accesibilidad dificultan llevar a cabo el RAR.

- **Efectos secundarios**

Los efectos secundarios son poco frecuentes, pero es importante tenerlos en cuenta. El efecto secundario más frecuente es la aparición de recesiones, fruto de la desinflamación del tejido cuando ya ha existido una pérdida del soporte óseo. El dolor leve y el sangrado en los días próximos al tratamiento son frecuentes, mientras que la aparición de abscesos periodontales es muy poco frecuente (Caffesse y cols., 1986).

### **1.1.6.3. Cirugía periodontal**

En casos donde el RAR no presente un buen resultado, a pesar de haber sido repetido, o en caso de existencia de bolsas periodontales mayores a 6 mm será necesario llevar a cabo cirugía periodontal. (Caffesse y cols., 1986). La cirugía consistirá en la apertura de un colgajo con el objetivo de visualizar perfectamente y tener el mejor acceso posible a las bolsas periodontales más profundas. Presenta más molestias post operatorias, por lo que es un tratamiento reservado para pacientes que no responden al RAR y con bolsas de más de 6 mm. (Caffesse y cols., 1986).

### **1.1.6.4. Tratamientos sistémicos**

El uso de antibióticos sistémicos muestra cierta eficacia, pero la capacidad adaptativa y la generación de resistencias de las bacterias productoras de periodontitis, impide el uso indiscriminado de este tipo de tratamientos, por lo que su uso se reserva para llevar a cabo profilaxis en pacientes especiales y para tratamientos de urgencia como abscesos o necrosis. (Loesche y Grossman, 2001)

### **1.1.6.5. Tratamientos alternativos**

- **Antisépticos orales**

El antiséptico por excelencia para el tratamiento de la enfermedad periodontal es la clorhexidina en concentraciones de 0,12%. A pesar de que su uso no eliminará la causa principal de la enfermedad periodontal, será capaz de disminuir la carga de organismos patológicos intraorales, por lo que es un tratamiento de elección en conjunto con los tratamientos de desbridamientos clásicos (Greenstein y cols., 1986).



- **Bifosfonatos en gel**

Los bifosfonatos nitrogenados como el alendronato han mostrado la capacidad de reducir la actividad inflamatoria ya que promueve la inactivación de algunas metaloproteinasas de matriz mediante la exposición de los sitios críticos de degradación de la plasmina (Shinoda y cols., 2007). El alendronato en gel al 1% de concentración ha mostrado la disminución de los síntomas producidos por la enfermedad periodontal, consiguiendo una reducción de la pérdida de hueso provocada (Sharma, 2012).

- **Terapia fotodinámica**

La terapia fotodinámica ha demostrado tener grandes propiedades bactericida en combinación con los fotosensibilizantes. Por ello, barrios estudios han determinado el efecto positivo de la TFD en el tratamiento de la enfermedad periodontal (Carvalho y cols., 2011), tal y como se desarrollará en apartados posteriores.

## **1.2. Bifosfonatos**

Los bifosfonatos son un grupo de fármacos altamente parecidos a los pirofosfatos producidos en el metabolismo humano, causante de la creación de los cristales de hidroxiapatita (Shinoda y cols., 2008), pero en vez de tener un átomo de oxígeno en su estructura química, poseen un átomo de carbono. Los bifosfonatos se caracterizan por su alta estabilidad y resistencia a la hidrólisis enzimática, gracias al átomo de carbono de su composición. Este hecho hace que sean inhibidores de la resorción ósea (Arboleya y cols., 2011).

### **1.2.1. Historia**

Los primeros bifosfonatos fueron sintetizados en el siglo XIX, sin embargo, su uso no estaba relacionado con la medicina, si no que era utilizado en diferentes tipos de industria (textil, aceites industriales o fertilizantes) por sus capacidades descalcificantes al

ser capaces de retener derivados del calcio, como las polifosfatos. Actualmente se siguen utilizando como descalcificantes de agua domésticos (Russell, 2011).

Fue a partir de la década de los 60 cuando se comenzó a estudiar su posible uso en medicina, aunque el etidronato, el primer bifosfonato utilizado en humanos, fue desarrollado a principios del siglo XX. En 1961, Herbert Fleisch y Bill Neuman descubrieron, que muchos fluidos corporales, contenían inhibidores de la calcificación, y que el proceso se relacionaba con la presencia del colágeno. Estudiaron las polifosfatos, bajo la teoría de que un compuesto parecido, debía ser segregados naturalmente por el cuerpo, y que este sería el regulador de los procesos calcificación (Fleisch y Neuman, 1961).

Ya en 1965, Fleisch trabajó junto a la química Sylvia Bisacz y descubrieron que el inhibidor presente en la orina era un pirofosfato inorgánico, y que la disminución de su presencia o excesiva excreción se relacionaba con la aparición de enfermedades relacionadas con la densidad ósea, como la hipofosfatasa (Fleisch y cols., 1966). A partir de este momento, se desarrollaron los bifosfonatos, unos fármacos análogos a los pirofosfatos con la capacidad de reducir la actividad osteoclástica (Shinoda y cols., 2008). Las primeras publicaciones con evidencias científicas sobre su funcionalidad son de 1969, año en el que se hicieron las primeras pruebas sobre humanos para tratar la fibrodisplasia osificante aguda mediante etidronato (Russel, 2011).

### **1.2.2. Mecanismos de acción**

El principal efecto de los bifosfonatos es la de reducir el recambio óseo. El bifosfonato queda almacenado en el hueso, pero cuando este comienza a reabsorberse, es liberado y captado por los osteoclastos, provocando la ineficacia de las funciones de estos. Podemos dividir en dos grupos los bifosfonatos (Vidal y cols., 2001):

- Bifosfonatos no nitrogenados. Estos bifosfonatos son los primero que se descubrieron, y presentan una eficacia menor en la reducción de la reabsorción ósea. Son capaces de introducirse directamente en el interior d ellos osteoclastos, provocan la pérdida de la capacidad de las células de adherirse al hueso y desencadenando la apoptosis (Rogers, 2004).

- Bifosfonatos nitrogenados. Los bifosfonatos más modernos contienen nitrógeno en su composición, lo que provoca un aumento de la potencia del tratamiento. Los bifosfonatos nitrogenados son capaces de suprimir la actividad osteoclástica inhibiendo la enzima la farnesil pirofostato sintetasa. Esta enzima se relaciona directamente con la síntesis del colesterol. Su acción provoca la incapacidad de sintetizar ciertas proteínas relacionadas con la acción de los osteoclastos (Kavanagh y cols., 2006).

### **1.2.3. Farmacocinética**

Los bifosfonatos se caracterizan por tener una baja absorción a nivel digestivo, lo que conlleva a que su consumo sea recomendado en ayunas y con agua para mejorar la absorción, o utilizar vías de administración alternativas como la intravenosa en pacientes con problemas digestivos o de movilidad. Los bifosfonatos se mantienen en sangre un máximo de dos horas, y aproximadamente el 50% es absorbido por el tejido óseo, mientras el resto se excreta. Una vez en el hueso pueden persistir hasta 10 años (Vidal y cols., 2001).

### **1.2.4. Bifosfonatos más utilizados**

#### **1.2.4.1. Alendronato**

Bifosfonato nitrogenado. Es el fármaco más extendido en el tratamiento y prevención de osteoporosis. Su administración es por vía oral con dosis semanales habitualmente (Arbolea y cols., 2000).

#### **1.2.4.2. Risendronato**

Presenta una gran potencia. También es un bifosfonato nitrogenado. Su uso está recomendado para el tratamiento de la osteoporosis, así como la enfermedad de Paget. Parece provocar menos daños a nivel digestivo que el alendronato. Se toma mensualmente (Mitchell y cols., 1999).

### **1.2.4.3. Ibandronato**

Bifosfonato nitrogenado oral de dosis mensuales. También existe por vía intravenosa. Utilizado para el tratamiento de osteoporosis en pacientes postmenopáusicas y con riesgo de fractura (Keating, 2016).

### **1.2.4.4. Pamidronato**

Bifosfonato de vía intravenosa. Frecuentemente utilizado para tratar enfermedad de Paget, enfermedades oncológicas con implicaciones óseas y metástasis óseas. También puede ser utilizada en osteoporosis. Relacionado con la osteonecrosis maxilar (Coukell y Markham, 1998).

### **1.2.4.5. Zoledronato**

Este bifosfonato se administra por vía intravenosa. Utilizado en las mismas indicaciones que el Pamidronato. Presenta más eficacia en hipercalcemias oncológicas. Relacionado con las necrosis maxilares (Major y cols., 2001).

## **1.2.5. Aplicaciones clínicas**

Los bifosfonatos tienen efecto directamente en los mecanismos de resorción ósea, por lo que la mayor parte de sus aplicaciones están enfocadas para tratar enfermedades óseas.

- Osteoporosis (tratamiento y prevención).
- Enfermedad de Paget
- Cáncer con metástasis óseas
- Hipercalcemias oncológicas
- Osteogénesis imperfecta.
- Periodontitis

### 1.2.6. Efectos secundarios

A pesar de que, al principio, no se asociaron efectos secundarios nocivos con el uso de bifosfonatos, con el paso de los años se han descubierto una amplia variedad de posibles efectos adversos, algunos potencialmente graves (Arbolea y cols., 2011). Los efectos podemos clasificarlos según si afecta al hueso, o fuera de el:

#### 1.2.6.1. Efectos extraóseos

- Gastroesofágicos

Las náuseas, vómitos o la dispepsia son algunos de los primeros efectos que se observaron. Además, su consumo se relacionó con la aparición de erosiones esofágicas, así como esofagitis. Esto provocó que se tomaran algunas precauciones al tomar el medicamento, como tomarlo con mucha cantidad de agua y evitando acostarse en la primera media hora tras tomarlo por vía oral (De Groen y cols., 1996).

- Oculares

Los casos de los efectos oculares tienen una incidencia muy baja, pero se han registrado casos de conjuntivitis asociada al consumo de bifosfonatos, siendo mayor si el paciente tiene alguna enfermedad asociada. Otras patologías asociadas menos frecuentes son la uveítis, desprendimiento de retina o edema preorbital (Aurich-Barrera y cols., 2006).

- Renales

Los efectos renales como la necrosis tubular son muy infrecuentes, pero se encuentran relacionados con los bifosfonatos intravenosos y con pacientes con enfermedades renales previas (Perazella y Markowitz, 2008).

- Hipocalcemia

La disminución de calcio a nivel sistémico es un efecto relativamente frecuente en pacientes que toman altas dosis por vía intravenosa, así como en pacientes que sufren de insuficiencia renal o deficiencia de vitamina D (Zuradelli y cols., 2009).

- Respuesta de fase aguda

Cuadro médico que se caracteriza por la aparición de mialgias y fiebre que cura y remite con paracetamol. Es más frecuente en los primeros tratamientos con intravenosos (Olson y Van Poznak, 2007).

#### 1.2.6.2. Efectos óseos

- Dolor musculoesquelético

A partir del año 2008 se le dio gran importancia a este efecto adverso, debido a que, en ocasiones, este dolor es incapacitante y puede perdurar durante años. Puede aparecer en cualquier momento del tratamiento, y generalmente se alivia retirando el bifosfonato. Se encuentra más asociado a las tomas semanales y relacionado con el risendronato y el alendronato (Caplan y cols., 2010).

- Fracturas atípicas

Este efecto presenta una incidencia inferior a 8 de cada 100.000 pacientes tratados mayores de 60 años (Black y cols., 2010). La fractura aparece en zonas donde los estudios histológicos encontraron marcadores de recambio óseo muy reducidos con respecto a la normalidad (Odvina y cols., 2005).

- Osteonecrosis maxilar

La osteonecrosis es uno de los efectos adversos que más ha trascendido tras su descubrimiento. Cursa con la presencia de exposición

ósea en la cavidad oral que no cura tras el transcurso de 8 semanas (Arbolea y cols. 2011). El mayor riesgo aparece en la mandíbula, así como en pacientes con tratamientos de bifosfonatos por vía intravenosa. Estos casos son frecuentes tras un tratamiento de cirugía oral, como puede ser una exodoncia o la colocación de un implante dental (Kalmar y cols., 2006). Sin embargo, no se conocen exactamente que factores aumentan la incidencia, aunque parece ser mayor en pacientes con mala higiene, enfermedad periodontal o con historial de traumas orales (Khosla y cols., 2007).

### **1.3.Terapia Fotodinámica (TFD)**

La TFD aparece como un nuevo tipo de terapia con un gran potencial para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades. Se basa en la aplicación de un determinado haz de luz combinado con un fotosensibilizante que se habrá aplicado previamente en el área a tratar. La reacción de este fotosensibilizante provocará las reacciones fisicoquímicas con el efecto terapéutico deseado (Sharman y cols., 1999).

#### **1.3.1. Historia**

El comienzo de la terapia fotodinámica se remonta a principios del siglo XX, cuando un estudiante de medicina, Oscar Raab, descubrió que la tinción naranja de acridina (hidrocloruro de acridina) combinado con la aplicación de un haz de luz producía efectos tóxicos sobre células de un tipo de paramecios (*paramecium caudatum*). Observó que, tanto si aplicaba la tinción por sí sola, como si aplicaba la luz sin la tinción mencionada, no existía ningún efecto tóxico en las muestras, por lo que la combinación de ambas era necesaria (Pagonis y cols., 2010).

Más adelante, en 1903, un profesor de Oscar Raab, Von Tappeiner, en colaboración con Jesionek, un dermatólogo, comenzaron las primeras pruebas clínicas en el tratamiento de algunas patologías dermatológicas. Para ello utilizaron eosina como fotosensibilizante combinado con un haz de luz. Algunas de las enfermedades con las que comenzaron las primeras pruebas fueron lupus vulgar, psoriasis, condiloma, sífilis, e

incluso en cáncer de piel no melanocítico. Fue entonces cuando nominaron este nuevo tratamiento como Terapia Fotodinámica (Wan y cols., 2014).

A pesar de los hallazgos, este tipo de tratamiento no tuvo un gran impacto en la época, y no sería hasta la década de los 70, cuando su uso volvió a popularizarse, utilizando nuevos tipos de luz con distintos fotosensibilizantes (Wan y cols., 2014).

### **1.3.2. Mecanismos de acción**

Para que el efecto de la terapia fotodinámica sea posible, es necesaria la presencia de 3 elementos imprescindibles (Dolmans y cols., 2003):

- **Fotosensibilizante:** Es una sustancia que es capaz de adherirse a las células y tejidos diana. El efecto de la terapia se llevará a cabo cuando el fotosensibilizante se vea activado al ser expuesto a una luz de una determinada longitud de onda, pasando de estado fundamental a estado excitado y viceversa. Este cambio de estado provocará la emisión energética que producirá el efecto tóxico sobre el tejido diana
- **Oxígeno:** Fundamental para conseguir las reacciones necesarias para conseguir la efectividad de la terapia, ya que la excitación del oxígeno provocará la muerte celular que se trata de conseguir en las células diana.
- **Fuente de luz.** El haz de luz es un elemento imprescindible, permite la interacción con el fotosensibilizante para producir el efecto de excitación electrónica deseado. Podemos encontrar gran cantidad de fuentes lumínicas para la terapia fotodinámica (luz azul, verde, roja, fuentes monocromáticas o policromáticas).

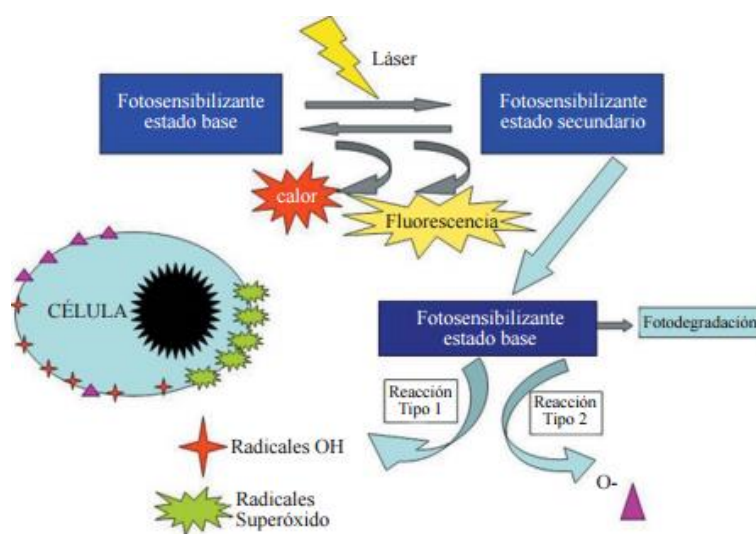
Para conseguir el efecto deseado, el espectro de luz se debe corresponder con el necesario por el fotosensibilizante para conseguir la liberación energética y el estado de excitación posterior que conllevará el efecto terapéutico.

El mecanismo de acción de la TFD se debe a la capacidad del fotosensibilizante para excitarse al estar expuesto a la energía lumínica. El cambio

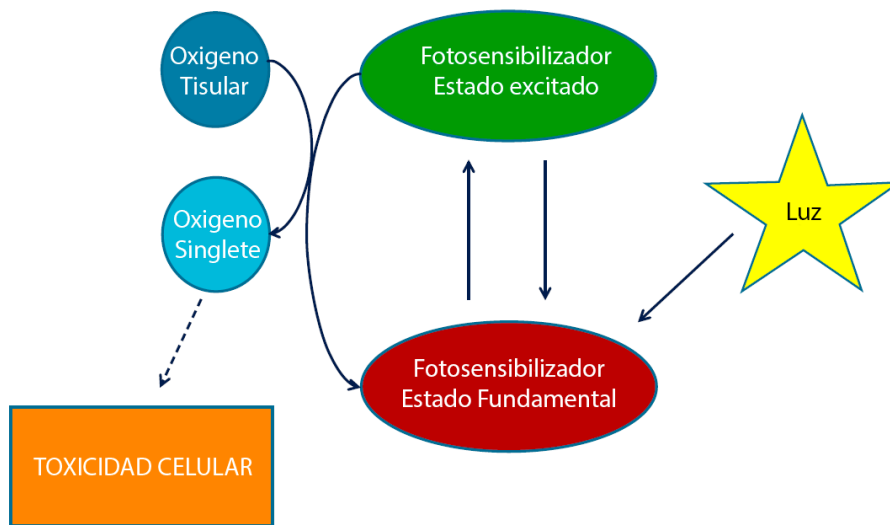


del estado base a estado excitado que sufre, provoca la liberación de electrones los cuales activarán dos vías posibles de acción, las cuales actúan paralelamente (Wan y cols., 2014) (Figura 1).

- Vía 1: Liberación de radicales libres. La liberación de energía por la exposición del haz de luz provocará una transferencia de electrones con las células que componen los tejidos más cercanos, provocando la liberación de estos radicales libres. La presencia de los radicales libres en el medio, provocará la interacción con las moléculas de oxígeno presentes en el interior de las células, lo que formará derivados del oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno, hidroxilos o superóxidos, que reaccionarán y provocarán la muerte celular selectiva. Este mecanismo, será capaz de destruir las membranas al provocar daños irreparables en ésta (Dolmans y cols., 2003).
- Vía 2: Oxígeno singlete. La energía liberada por la exposición del fotosensibilizante producirá un estado de excitación al oxígeno presente en el medio. Estas moléculas de oxígeno reactivas son denominadas oxígeno singlete. Los átomos excitados son capaces de reaccionar con una gran variedad de elementos biológicos, desencadenando la muerte celular selectiva por medio de daños oxidativos irreversibles en las membranas (Hamblin y Hasan, 2004) (Figura 2).



**Figura 1.** Mecanismos de acción foto-oxidativas.



**Figura 2.** Mecanismo de acción Tipo 2 de la terapia fotodinámica

Entre los dos mecanismos de acción que hemos visto, la segunda vía es la responsable del mayor daño tisular provocado durante la exposición a la TFD. Sin embargo, tanto el tiempo como el radio de acción son muy reducidos: <0,4ms y 0,02 micrómetros respectivamente. Este hecho nos permite limitar la zona de tratamiento únicamente a los tejidos y células sensibles a los fotosensibilizantes. Para evitar el daño al tejido sano circundante, se tendrá en cuenta la selectividad del fotosensibilizante con el tejido diana, la duración, la intensidad y la capacidad de penetración del tipo de la luz utilizado (Josefsen y cols., 2008).

Como hemos observado, los daños celulares provocados por la TFD, tiene como objetivo principal las membranas de las células diana, por lo que el daño provocado en el ADN celular es mínimo, teniendo bajas posibilidades de provocar mutaciones o efectos carcinógenos (Mroz y cols., 2011).

### 1.3.3. Fotosensibilizantes

Como se ha mencionado con anterioridad, la selección del fotosensibilizantes es fundamental para llevar a cabo un tratamiento con TFD eficaz, ya que nos permitirá acotar los tejidos a tratar (Josefsen y cols., 2008)

Los componentes fotosensibilizantes son ideales para eliminar microorganismos tales como bacterias, hongos o virus. Esto se debe a la capacidad que tienen para ser absorbidos y teñidos sintéticamente por los fotosensibilizantes debido a su carga positiva, que les permite penetrar en las membranas de microorganismos cuya carga es negativa (Soukos y cols., 1998). Existen diversas bacterias capaces de producir fotosensibilizantes endógenos, por lo que pueden ser eliminados sin la necesidad de ser teñidos, aplicando el haz de luz adecuado (Mazariegos, 2008).

Algunas de las características que los fotosensibilizantes deben poseer son las siguientes:

- Tinción selectiva en el tejido o células a tratar.
- Homogeneidad en la aplicación en el tejido o célula diana.
- Alta Lipofilia alta para favorecer la penetración en las membranas y barreras biológicas.
- Espacio de tiempo lo más breve posible entre la administración y la acumulación máxima en la diana a tratar.
- Máxima implantación en el tejido a tratar.
- Reactividad al aplicarse longitudes de onda de luz concretas.
- Rendimiento alto en la producción de oxígeno singlete y de otras especies reactivas de oxígeno.
- Vida media más larga en tejidos enfermos que en tejidos sanos.
- Facilidad de eliminación en tejidos no enfermos.
- Toxicidad nula en un ambiente oscuro.

Los primeros fotosensibilizantes utilizados para llevar a cabo tratamientos de TFD eran derivados de la hematoporfirina, los cuales eran administrados por vía intravenosa. Este tipo de FS presentaba una desventaja importante, el tiempo de excreción era lento, por lo que los pacientes tenían posibilidad de presentar reacciones adversas, como

fotosensibilidad, durante las 6 a 10 semanas tras la inoculación del tratamiento. Por ello debían evitar la exposición a luz solar o a luces artificiales potentes.

Posteriormente, se creó una segunda generación de fotosensibilizantes. Para aumentar la selectividad de estos, aumentar la velocidad de eliminación y la penetración tisular desarrollaron compuestos que poseyeran una absorción lumínica de más de los 630 nm, que era lo habitual en los FT de primera generación. Este cambio consiguió que se pudieran realizar tratamientos fotodinámicos a más profundidad (Moreno y cols., 2007).

Existe una gran cantidad de fotosensibilizantes, aunque podemos destacar como los más usados los siguientes:

- Azul de metileno.

Su uso en medicina se extiende a más de 100 años. Como fotosensibilizante ha demostrado tener un gran poder bactericida, afectando tanto a bacterias gram negativas como positivas, y mostrando resultados positivos en tratamiento de enfermedades periodontales (Shams y cols., 2011). También se ha utilizado a nivel sistémico por vía intravenosa para el tratamiento de encefalopatías, envenenamiento por cianuro, urolitiasis y metahemoglobinemia (Hou y cols., 2012)

- Azul de toluidina.

Este fotosensibilizante es otro de los más utilizados. Presenta gran eficacia en la eliminación de patógenos como las bacterias, los virus o las levaduras. Al igual que el azul de metileno, muestra un gran poder bactericida tanto con bacterias gram positivas como negativas, siendo útil el tratamiento de la enfermedad periodontal (Vaziri y cols., 2012).

- ALA (ácido 5-aminolevulínico)

Fotosensibilizante de segunda generación y gran potencia por tener una mayor capacidad de crear el oxígeno singlete (Rajesh y cols., 2011).

- Verde malaquita (diaminotriifenilmetano N-metilado)

Tinte catiónico con una gran capacidad anti patógena. Es útil como antibacteriano, antifúngico y antiparasitario. Capaz de interactuar con las membranas celulares de los patógenos diana. Es utilizado como tinte industrial y como tratamiento preventivo en acuicultura (Chen y cols., 2014).

- Violeta de genciana.

Este fotosensibilizante ha mostrado buenos resultados en tratamientos antifúngicos, se caracteriza por su estructura química de triifenilmetano (Mazariegos, 2008).

En la actualidad, las fuentes de luz más utilizadas no son necesariamente las más potente, ya que con láseres de baja intensidad es posible alcanzar el efecto bactericida esperado. Algunos de los laser más utilizados son: láser de argón ( $\lambda$  488-514 nm, color azul turquesa), láser helio-neón ( $\lambda$  663 nm, color rojo), láser de diodo de galio-arsénico-aluminio (Sahm y cols., 2011).

#### **1.3.4. Campos de actuación**

##### **1.3.4.1. Medicina**

En relación con el tratamiento de infecciones, el uso de la TFD ha estado enfocado mayoritariamente a las lesiones virales. Destacando, entre éstos, el tratamiento del herpes simple en los años 70. Para ello, se empleaban colorantes neutros y de diversos colores que se aplicaban en herpes tanto orales como genitales, administrando, a continuación, un tratamiento de fotoactivación con luz blanca. No obstante, estudios posteriores entre los que destaca el de Myers y colaboradores (Hamblin y Hasan, 2004) expuso en sus resultados que dicho tratamiento no mostraba efectos terapéuticos para el tratamiento del herpes simple, pero si podría manifestar posibles efectos negativos en lesiones orolabiales, lo que provocó una disminución de esta práctica.

La terapia fotodinámica es en la actualidad de gran utilidad en el campo de la dermatología, especialmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas, así como lesiones premalignas y malignas. De la misma manera, comienza a abrirse paso en el tratamiento de dermatosis tales como el acné. El microorganismo vinculado al acné que presenta mayor prevalencia en la piel, así como en los folículos de las áreas ricas en glándulas sebáceas es el denominado *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), anteriormente conocido como *Propionobacterium acnes* (*P. acnes*) (Dréno y cols., 2018). El proceso de tratamiento para este tipo de afecciones se lleva a cabo a través de la fotoactivación de las porfirinas bacterianas de este microorganismo, lo que produce una formación de oxígeno citotóxico que conlleva a la eliminación del *C. acnes*. De esta manera, la exposición a la luz de 415 nm provoca una absorción de los fotones y excitación fotodinámica de las porfirinas, lo que desencadena en la pared celular bacteriana una irrupción de su función normal y la posterior muerte del *Cutibacterium acnes*. En consecuencia, este procedimiento se muestra beneficioso para el tratamiento del acné vulgar, obteniendo unos resultados adecuados (Moreno y cols., 2007).

De la misma manera, se ha hecho uso de la TFD a través las vías sistémica y tópica para el tratamiento de la papilomatosis respiratoria recurrente (PRR) y el condiloma acuminado, ambas provocadas por el virus del papiloma humano (VPH).

La eficacia de la terapia fotodinámica también ha sido probada en enfermedades parasitarias tales como la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) o la malaria (*Plasmodium falciparum*) (Hamblin y Hasan., 2004).

Otro de los beneficios asociados a la TFD es su efectividad y elección como tratamiento en carcinomas recurrentes o tumores secundarios en laringe, faringe y esófago (Mohanty y cols., 2013). Destacando un notable resultado tanto terapéutico como cosmético en el tratamiento de los carcinomas basocelulares y nodulares. Lo que se refleja en unas tasas de curación (91%) similares a aquellas alcanzadas mediante cirugía (98%). Pese a todo, será el grosor o profundidad del tumor lo que determine la probabilidad de conseguir un control local de los carcinomas basocelulares a través de la terapia fotodinámica. Asimismo, diversos estudios (Moreno y cols., 2007) ponen de manifiesto que, debido a la dificultad de poder penetrar a planos más profundos del agente fotosensibilizante, la TFD no sería una opción adecuada para los carcinomas

basocelulares agresivos entre los que se encuentran el infiltrante y morfeiforme, los nodulares grandes y las recidivas.

Estudios pioneros sobre terapia fotodinámica en el campo de la neurocirugía pusieron de manifiesto la eficacia en el tratamiento de determinados tumores cerebrales de la TFD con un fotosensibilizante (ALA) por vía oral (20 mg/kg/ peso). En este tipo de casos, cuando ya se ha extirpado el tumor quirúrgicamente, la TFD puede ser auxiliar a la cirugía a través de la administración del tratamiento en la cavidad resultante tras la intervención. Los resultados obtenidos, con relación al uso conjunto de ambos tratamientos pone de manifiesto un aumento significativo en la tasa de supervivencia de estos pacientes. Por otro lado, en aquellos casos en los que se pretende definir los límites periféricos de los gliomas infiltrantes, así como la resección de dichas regiones el uso de la TFD ha resultado ser igualmente beneficioso. De la misma manera, diversos estudios muestran un incremento en la tasa de supervivencia por encima de los 36 meses en 63 y 25%, respectivamente de aquellos pacientes con astrocitomas anaplásicos y glioblastoma multiforme tras el tratamiento con terapia fotodinámica (Moreno y cols., 2007).

En el área de neumología, la terapia fotodinámica destaca por su aplicación como tratamiento paliativo en los casos de carcinoma broncogénico. Especialmente en aquellas situaciones en las que el tamaño del tumor es tan reducido que no es posible su extracción y se precisa controlar el sangrado y evitar la obstrucción de las vías aéreas. Asimismo, la TFD ha mostrado ser una técnica beneficiosa en el tratamiento de tumores que no son posibles de intervenir mediante tratamientos convencionales debido a que presentan un volumen insuficiente. Hasta la fecha, la TFD ha sido empleada como tratamiento de elección en lesiones iniciales y desobstrucción de los bronquios en tumores en fases avanzadas. Actualmente, estudios clínicos recientes se encuentran en fase III (Moreno y cols., 2007).

Por otro lado, con relación al campo de la oftalmología, se ha aplicado la TFD en aquellos casos de degeneración macular senil en los que se origina una neoformación vascular en la retina, la cual provoca pérdida de visión debido a la aparición de cicatrices. Para ello, se ha empleado la TFD con verdeporfina y luz roja de 689 nm y su objetivo ha sido que el agente fotosensibilizante, al colocarse selectivamente en el tejido vascular

neoformado, interrumpa en el progreso de la degeneración preservando, de esta manera, la visión del paciente (Moreno y cols., 2007).

La terapia fotodinámica ha sido empleada en urología para el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga refractario mostrando unos resultados positivos en relación con su eficacia, a través de la administración intravenosa de photoprin para TFD con irradiación transuretral e intravesical. Asimismo, se ha hecho uso de la TFD para casos de cáncer de próstata y se ha propuesto para la hiperplasia prostática benigna la TFD transuretral (Moreno y cols., 2007).

La terapia fotodinámica, gracias a sus agentes fotosensibilizantes capaces de adherirse a las células del sarcoma de Kaposi, ha mostrado su efectividad en casos de pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Moreno y cols., 2007).

De la misma manera, diversa literatura especializada pone de manifiesto la eficacia de la TFD, tanto como terapia alternativa como asociada al tratamiento médico en relación con el tratamiento de la sinusitis crónica. Haciéndose, para ello, uso del azul de metileno (cloruro de metiltionina) como agente fotosensibilizante (Biel y cols., 2011).

#### **1.3.4.2. Odontología**

Actualmente, el uso de la terapia fotodinámica en el ámbito de la odontología está en constante expansión, especialmente en la intervención de las infecciones orales. Cabe destacar el empleo de esta técnica en desinfección (Kharkwal y cols., 2011).

- **Enfermedad periodontal:** Las denominadas enfermedades periodontales provocadas por placa se han dividido a lo largo de la historia, principalmente, en tres categorías generales, estas son, salud, -o ausencia de enfermedad-, gingivitis o periodontitis (Armitage, 2005). Por gingivitis entendemos la presencia de inflamación gingival que no conlleva pérdida de inserción del tejido conectivo (Armitage, 1995). Por otro lado, la periodontitis inducida por placa se caracteriza por la aparición de inflamación gingival en aquellos lugares donde se ha generado una migración de la inserción epitelial a las superficies radiculares, lo que supone, además, una pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar (Armitage, 1995).



En estos casos, el tratamiento de TFD se basa en introducir un fotosensibilizante en la zona del alveolo dental y añadir, a continuación, luz a través de una fibra óptica. Los resultados obtenidos se muestran semejantes a aquellos conseguidos mediante el tratamiento periodontal de raspado y alisado (Kharkwal y cols., 2011). Asimismo, se obtienen mayores resultados al emplear de forma conjunta ambos tratamientos (Arweiler y cols., 2013).

La terapia fotodinámica se muestra beneficiosa en aquellos casos en los que se pretende reducir el riesgo de bacteriemia, así como una disminución del tiempo operatorio. De igual manera, la TFD es accesible a aquellas áreas que son de difícil acceso.

Estudios recientes ponen de manifiesto la total eliminación de bacterias anaerobias tales como *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromona gingivalis* a través del tratamiento de TFD acompañado, posteriormente, de una disminución de la actividad de algunos factores de virulencia como las proteasas y los lipopolisacáridos.

De igual forma, Balata y colaboradores ponen de manifiesto en su estudio una disminución de patógenos periodontales y pérdida de hueso tras el uso de la TFD (Balata y cols., 2013).

- **Caries:** respecto a las caries dentales, gracias a la descontaminación producida por la TFD, ésta resulta de gran utilidad en la inactivación de microorganismos cariogénicos presentes en la dentina cariada o en el biofilm. Ofreciendo, por ende, unas buenas perspectivas en sus resultados al poderse llevar a cabo a través de tratamientos conservadores. De igual forma, otro de los beneficios de la TFD es que ninguno de sus componentes (fotosensibilizador y haz de luz) presentan propiedades bactericidas al utilizarse de forma aislada. Por tanto, podemos considerar la terapia fotodinámica como selectiva puesto que obtiene su propiedad antimicrobiana al combinar simultáneamente la luz y el colorante, inalterado la flora de tejidos distantes. Del mismo modo, la TFD puede emplearse exitosamente en casos de pacientes ubicados en odontología

dentro del denominado grupo de “pacientes especiales”, así como en niños al considerarse un tratamiento atraumático (Ricatto y cols., 2014).

- **Hongos:** En el ámbito de la odontología podemos encontrar un número infinito de bacterias y organismos saprófitos en la cavidad oral de pacientes sanos, entre los que se hallan diversas especies de *Cándida*. Todos estos microorganismos se presentan naturalmente en la boca de los pacientes sin manifestar ninguna alteración patológica. Este fenómeno de alteración de la flora de la mucosa bucal sucede cuando se presentan factores que alteran la función de ese equilibrio y promueven la proliferación micótica patógena (Santana, 2000).

La principal especie que se presenta como agente etiológico de infección en los cambios patológicos es la denominada *Cándida Albicans* (*C. Albicans*) (Llop y cols., 2001).

Recientemente se observa, en países desarrollados, un aumento creciente de la aparición de infecciones fúngicas. Con relación a su etiología, numerosos autores señalan que se trata de un aspecto multifactorial (Bastiaan, 1976; Bergendal, 1982); destacando, entre sus causas, el uso generalizado de prótesis dentales, hábitos de higiene, xerostomía, incremento de la supervivencia en pacientes que presentan casos de deficiencias inmunitarias, así como una mayor resistencia a tratamientos antifúngicos. Este hecho ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, entre las que se encuentran el tratamiento tópico mediante terapia fotodinámica, la cual arroja resultados positivos en torno a su efectividad en esta área (Chabrier-Roselló y cols., 2005; Camacho-Alonso y cols., 2016).

- Los cambios en el tejido oral que presentan un elevado riesgo de malignización tales como la eritroplasia oral y la hiperplasia verrucosa oral (HV) son aceptadas por la mayoría de los autores como dos de las lesiones precancerosas por excelencia (López Jornet y cols., 1999). Ambas lesiones previamente mencionadas presentan aproximadamente, según diversos

estudios, una mejoría clínica significativa del 66 - 95% al ser tratadas con terapia fotodinámica. No obstante, la TFD no ha mostrado resultados concluyentes en el tratamiento de leucoplasias orales (Marotti y cols., 2013).

- **Implantes:** La implantología se ha servido especialmente de la TFD para las dos mayores causas de fracaso en el tratamiento de los implantes dentales, estas son, la contaminación de la superficie del implante y la periimplantitis. En el primer caso, encontramos que son muchos los estudios que correlacionan la presencia de una elevada cantidad de Alúmina en la fabricación de los implantes con el proceso de osteointegración, lo cual genera una alteración ósea a nivel fisiológico que destruye el hueso adyacente y, consecuentemente, el rechazo del implante (Díaz, 2017).

Por otro lado, entendemos por periimplantitis aquel proceso inflamatorio que puede conllevar una supuración, bolsas periodontales y pérdida de hueso marginal que afecta a los tejidos anexos al material implantado. Concretamente, para este último caso, la terapia fotodinámica ha mostrado resultados prometedores, lo cual se presenta como posible alternativa de tratamiento a aquellos más convencionales. No obstante, se precisa un mayor número de estudios que contemplen entre otras variables, la complejidad patogénica y etiológica de la periimplantitis (Shoab y cols., 2013).

- **Endodoncia:** La terapia fotodinámica se ha empleado en el ámbito de la endodoncia en aras a reducir aquellos microorganismos hallados en el conducto radicular. Los resultados obtenidos in vivo e in vitro en esta área ponen de manifiesto que la TFD supone una alternativa práctica y efectiva para la limpieza y desinfección del conducto radicular (Fimple y cols., 2008). Especialmente en aquellos casos de pacientes que manifiestan lesiones periapicales y necrosis pulpar (Fimple y cols., 2008).

En relación con la sensibilidad a la terapia, la TFD se muestra menos provechosa frente a bacterias Gram negativas que a Gram positivas. Estas

diferencias son debidas a causa de las estructuras que conforman la membrana de ambos grupos de bacterias. Ya que las bacterias Gram negativas se componen de una membrana citoplasmática interna y otra externa, las cuales se encuentran separadas por peptidoglicanos que forman una barrera que impide el paso del fotosensibilizador (Kharkwal y cols., 2011). No obstante, y de manera contraria, la terapia fotodinámica se presenta más efectiva en el caso de microorganismos Gram positivos, tales como el *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Vaziri y cols., 2012). En comparación con el tratamiento tradicional de instrumentación e irrigación endodóntica, se observa que la terapia fotodinámica disminuye de manera significativa los recuentos de *E. faecalis* en conductos radiculares infectados (Biel y cols., 2011). De igual forma, en su estudio, Garcez y colaboradores mostraron en sus resultados un aumento de la tasa de éxito del 98,37% en la reducción bacteriana frente a un 82,5% al comparar la eficacia de la TFD con el método convencional (Garcez y cols., 2008).

Este hecho se debe a que en las bacterias Gram positivas la membrana citoplasmática se encuentra rodeada de una porosa capa de peptidoglicanos y ácido lipoteicoico, lo que facilita la penetración del fotosensibilizador al interior.

De este modo, la TFD puede utilizarse en conjunto con el desbridamiento mecánico habitual y productos químicos antimicrobianos como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el hipoclorito sódico ( $NaClO$ ) en el tratamiento de endodoncia.

- **Traumatismos:** las lesiones dentales producidas por traumatismos se valoran como problemas graves al implicar la afectación de la pulpa. Estos traumatismos tienen una alta prevalencia, fundamentalmente aquellos que se producen en el grupo de los dientes anteriores. En consecuencia, la TFD presenta resultados prometedores para desinfectar las paredes dentinarias del conducto, actuando, de este modo, como agente antibacteriano (De Sant'Anna, 2014).

### **1.3.5. Contraindicaciones.**

Las contraindicaciones más importantes aparecen con pacientes que presentan alergias a alguno de los componentes que conforman los FS. Así mismo no está indicado para pacientes fotosensibles, pacientes que sufran cardiopatías no estabilizadas o con enfermedades hepáticas graves (Moreno y cols., 2007). No es recomendable el uso de TFD en pacientes con antecedentes de porfiria, lupus eritematoso o tumores que no hayan respondido a la TFD (Wan y cols., 2014).

### **1.3.6. Efectos adversos**

A pesar de que los tratamientos con TFD son normalmente poco dañinos por su selectividad en las áreas de efecto, si es posible la aparición de efectos adversos tras el tratamiento. Esto es debido a la posibilidad de que los FS afecten a los tejidos sanos circundantes donde la tinción es capaz de penetrar, y no resulta eliminada antes de llevar a cabo el tratamiento.

Los efectos adversos más comunes al aplicar terapia fotodinámica son el picor, escozor y dolor tanto durante el tratamiento, como posterior a este (Clark y cols., 2003; Benov, 2014). El dolor se puede controlar con analgésicos comunes u opiáceos en el peor de los casos, aunque lo habitual es que desaparezca al dejar de aplicarse el tratamiento (Nyst y cols., 2009). Los eritemas, edemas resultan relativamente comunes durante el tratamiento (Hong y cols., 2013). Otro efecto común es la aparición de tofos cutáneos debido a la acumulación y no eliminación del FS, los cuales pueden persistir hasta seis semanas tras el tratamiento.

Otros efectos adversos menos comunes son la hiperpigmentación o la hipopigmentación de la zona tratada (desaparece al poco tiempo); fotosensibilidad cutánea (de 4 semanas hasta 6 meses); reacciones alérgicas a los fotosensibilizantes con presencia de urticaria; necrosis, úlceras o ampollas en caso de aplicar la luz un tiempo excesivo; y vómitos, náusea o alteraciones hepáticas (Balata y cols., 2013).

### **1.3.7. Limitaciones de uso**

La terapia fotodinámica presenta limitaciones de uso importantes a la hora de tratar tejidos enfermos profundos, ya que luz visible solo tiene la capacidad de penetrar entre 5 y 10 mm en el mejor de los casos, reduciendo el campo de actuación a patologías cuya área de afección se encuentre dentro de este rango con respecto a la superficie. En el caso del tratamiento de grandes masas patológicas, como tumores grandes, tampoco ha demostrado tener gran efectividad en el tratamiento (Benov, 2014).

## **1.4. Modelos de experimentación animal.**

A la hora de investigar la efectividad de un tratamiento, es indudable que ponerlo a prueba en un ser vivo biológicamente similar al ser humano va a permitir que los resultados obtenidos sean más fiables. En el caso de la inducción de periodontitis, los modelos de animales experimentales son más fiables al llevarlos a cabo en animales como perros o cerdos, por tener una mayor similitud biológica (Oz y Puleo, 2011). Por otro lado, los roedores son una buena elección, siguen siendo similares a los humanos en sus funciones biológicas, el menor coste, así como la menor implicación moral hace que sea un animal de elección en una gran parte de los estudios sobre animales (de Oliveira y cols., 2016).

La zona de los molares de las ratas presenta muchas similitudes con el humano, es por ello por lo que existen varios modelos de experimentación animal de la periodontitis sobre ratas (Bentzen y cols., 2005).

### **1.4.1. Animales de experimentación**

La selección del animal es un factor importante al hacer cualquier tipo de experimentación animal. La similitud que cada animal presenta con el ser humano, así como el número de muestra va a permitir que los resultados obtenidos sean más fiables. A pesar de que los animales mayores presentan mayores similitudes con los humanos, no siempre serán la mejor elección para determinados estudios (Oz y Puleo, 2011).

#### **1.4.1.1. Roedores**

Los roedores son animales muy utilizados en investigación animal. A pesar de que su anatomía oral difiere de la de los humanos, la estructura periodontal de los molares es similar, por lo que las investigaciones en el campo de la periodoncia son viables. Su bajo coste (con un mayor número de muestras), así como una implicación ética y moral inferior a la de los animales más grandes, hace que sea un animal de elección en este tipo de investigaciones. Las mayores desventajas son el menor número de tejido obtenido por animal para analizar, así como una mayor resistencia a la aparición de la periodontitis (siempre es necesario inducirla) (Oz y Puleo, 2011).

Los dos roedores más utilizados son los ratones y las ratas. En el caso de los ratones, las desventajas mencionadas se aumentan con respecto a las ratas, y la enfermedad periodontal solo se puede provocar mediante la inyección de inductores (Baker y cols., 1994). En el caso de las ratas, su mayor tamaño facilitará la obtención de muestras, y su anatomía permitirá utilizar modelos de inducción por ligadura (Oz y Puleo, 2011). Las ratas han sido elegidas para este estudio, concretamente ratas Wistar.

#### **1.4.1.2. Perros**

Los perros son utilizados en muchas investigaciones animales. En caso de periodoncia, presenta estructuras periodontales ligeramente similares a los humanos, pero la flora bacteriana es muy parecida, por lo que la enfermedad periodontal es similar a los humanos (Pavlica y cols., 2004). Tienen un coste alto y gran implicación ética y moral, pero es más estudiado que los ejemplos posteriores (Oz y Puleo, 2011).

#### **1.4.1.3. Cerdos**

Los cerdos presentan estructuras periodontales muy similares a los humanos, siendo posible que lo sufran de manera natural, sin embargo, las floras

bacterianas orales son algo diferentes, por lo que para provocar la enfermedad se combina la ligadura con la introducción de patógenos humanos en los tejidos. Su uso en enfermedad periodontal no está muy extendido en investigaciones de periodontitis, por lo que no suele utilizarse al no poder hacer comparaciones. Su alto coste como la implicación ética y moral influyen también en este hecho (Wang y cols., 2007).

#### **1.4.1.4. Primates (no humanos)**

Los primates son los animales que presentan la mayores similitudes biológicas y fisiológicas con respecto a los seres humanos, por lo que esto ocurre también, en las estructuras periodontales. La flora bacteriana oral también es la más parecida a la humana, y pueden presentar la enfermedad periodontal de manera natural, aunque para acelerar el proceso, es recomendable llevar un modelo mediante ligaduras. Sin embargo, la fuerte implicación ética y moral, así como el alto coste provoca que no sea un animal muy utilizado en experimentación, sobre todo en odontología (Schou y cols., 1993).

#### **1.4.1.5. Otros animales**

Existen otros animales sobre los que se ha estudiado la enfermedad periodontal, pero su utilización no está extendida ya que no muestran ningún beneficio con respecto a los animales descritos previamente (Oz y Puleo, 2011). Algunos de estos animales son:

- Caballo
- Conejo
- Hurón
- Hámster



## 1.4.2. Modelos de inducción a la enfermedad periodontal.

### 1.4.2.1. Inyección de inductores a la enfermedad

La inducción a la enfermedad a la enfermedad periodontal mediante la inyección de distintas sustancias es posible, ya que son capaces de provocar reacciones inflamatorias similares a las producidas por la periodontitis. Es el modelo más recomendado para animales pequeños, donde el modelo de ligadura es difícil de llevar a cabo por el tamaño de las estructuras orales. Existen varias sustancias utilizadas en la inducción a la periodontitis (Oz y Puleo, 2011).

- **Inyección de endotoxinas**

La inyección de lipopolisacáridos (LPS) producidas por bacterias es un método muy recurrido para producir periodontitis en animales. Frecuentemente se utiliza la endotoxina producida por la *Escherichia coli*, (Llavaneras y cols., 2001), aunque pueden usarse otras como la *Salmonella typhimurium*. Los efectos de las endotoxinas provocan la reacción inflamatoria, con el aumento de marcadores de la inflamación y la destrucción del tejido gingival y óseo, reacción similar a la producida por la periodontitis (Ramamurthy y cols., 2002).

Este modelo se basa en la inyección de endotoxinas disueltas en suelo salino en el tejido gingival que se quiere infectar, siendo necesarias tantas inyecciones como áreas a estudiar. En el caso de la periodontitis la inyección se introduce en la papila interdental, tanto en palatino, como en lingual del área donde se busca provocar la enfermedad todos los días durante 6 días (Bentzen y cols., 2002).

- **Inyección de cloruro de amonio**

La inyección de cloruro de amonio al 0,04% en una dosis de 400mg/kg ha demostrado provocar una reacción inflamatoria similar a la periodontitis. Sin embargo, esta similitud se ha encontrado al observar una diferencia estadísticamente significativa en el examen visual de la inflamación producida,

mediante un análisis de varianza (ANOVA) y puntuando del 0 al 4 según el aspecto de la inflamación (Kordiyak y Masna, 2014).

#### **1.4.2.2. Inducción por ligadura**

Otro de los métodos más recurridos para la inducción de la enfermedad es la inducción por el posicionamiento de una ligadura alrededor de las piezas dentales que se pretenden enfermar (Björnsson y cols., 2003). La introducción de la ligadura se hará bajo sedación y anestesia de los animales de experimentación, colocando la ligadura bien anudada para disminuir la probabilidad de que se pierda. La ligadura puede ser de varios materiales, como nylon o acero, siempre que no dañe el tejido gingival por el roce (Araujo y cols., 2013). El posicionamiento de la ligadura provocará un acúmulo excesivo de placa que inducirá la aparición de la enfermedad (Oz y Puleo, 2011). Este tipo de protocolo ha sido el seleccionado para llevar a cabo nuestra investigación.

#### **1.4.2.3. Introducción de patógenos humanos**

La introducción de patógenos humanos no sirve para inducir por si sola la enfermedad periodontal, pero su uso en combinación con alguno de los modelos anteriores va a conseguir que los resultados obtenidos sean más fiables. Esto se debe a que las floras bacterianas de los animales, no coincide con la de humanos, por lo que su uso en animales mayores como primates o cerdos es frecuente, ya que el costo de estas investigaciones solo se justifica si los resultados son muy fiables (Kinane y cols., 2009).

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## 2. Justificación y Objetivos

### 2.1. Justificación

La periodontitis es una enfermedad de origen multifactorial, que provoca la destrucción de los tejidos de soporte dental, incluyendo el tejido conectivo gingival y el hueso alveolar. Un gran número de mediadores inflamatorios están implicados en la destrucción del tejido periodontal, incluyendo una amplia variedad de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, TNF y PGE2), eicosanoides, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y otros factores inflamatorios, todos ellos provocan pérdida de hueso alveolar (Teng, 2003; Salvi y Lang, 2005).

La presencia de citocinas inflamatorias y quimiocinas hace que los osteoblastos segreguen la citosina factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); esta se une a los receptores M-CSF que extraen precursores osteoclasticos. La activación de este receptor activa una vía de señalización que provoca la diferenciación de los osteoclastos u osteoclastogénesis. El osteoblasto también segrega una citocina perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), conocida como ligando del Factor Nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL), que se une al receptor RANK. Este hecho provoca la generación de precursores de osteoclastos y osteoclastos diferenciados. La unión RANKL-RANK induce a la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos, que favorecen la pérdida ósea alveolar (Wara-Acswapati y cols., 2007).

Al mismo tiempo, esta reacción inflamatoria da lugar a un aumento en el número y en la actividad de los leucocitos polimorfonucleares. Esta proliferación provoca un aumento de los radicales libres, que posteriormente generan daño oxidativo al tejido gingival, al ligamento periodontal y al hueso alveolar. De hecho, actualmente se cree que la generación de estrés oxidativo (EO) sistémico puede ser un mecanismo por el cual la periodontitis manifiesta sus efectos sistémicos (D'Aiuto y cols., 2010). La formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) puede actuar con otras macromoléculas tales como ADN, lípidos y proteínas. En la enfermedad periodontal, las especies radicales lipídicas como el peróxido de hidrógeno inducen la peroxidación lipídica, lo que provoca vasodilatación y por consiguiente mayor pérdida de hueso alveolar (Borjes y cols., 2007).

En los últimos años, se han desarrollado diversos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la periodontitis, incluyendo el uso de terapia fotodinámica (TFD). La inactivación fotodinámica de microorganismos se basa en la administración tópica o sistémica de un fotosensibilizador (FS) seguido de una dosis determinada de irradiación con luz visible a una longitud de onda apropiada, por lo que el FS pasa de su estado fundamental a un estado excitado. En presencia de oxígeno ambiental en las células, el FS activado puede reaccionar con moléculas cercanas por transferencia de electrones o transferencia de hidrógeno, lo que da lugar a la producción de radicales libres (mecanismo de Tipo I) o por transferencia de energía u oxígeno (mecanismo de Tipo II) lo que da lugar a la producción del oxígeno singlete (Hamblin y Hasan, 2004). Los efectos de la TFD sobre los tejidos de soporte periodontal (inflamación, hipoxia y estrés oxidativo (EO) activarán los factores de transcripción y citocinas que resultan en la secreción de factores de crecimiento, metaloproteinasas de matriz y prostanoïdes que contribuyen a la resorción ósea alveolar (Carvalho y cols., 2011; Giannopoulou y cols., 2012).

Los bifosfonatos (BFs) son análogos compuestos de pirofosfato químicamente estables con afinidad por la hidroxiapatita. Su uso se encuentra generalizado para tratar enfermedades que aumentan la resorción ósea tales como la enfermedad de Paget, la hipercalcemia, la osteólisis asociada al cáncer y la osteoporosis posmenopáusicas (Apro y cols., 2008). La acción del BF sobre el hueso parece estar relacionada con su capacidad para inhibir la resorción ósea en lugar de su posible capacidad para estimular la formación ósea (Shinoda y cols., 2008)). El alendronato (ALN) es un bifosfonato nitrogenado de tercera generación con una poderosa acción antirresorptiva, debido a que favorece la apoptosis de los osteoclastos e inhibe la diferenciación osteoclástica durante el proceso de maduración (Chacon y cols., 2006). La acción apoptótica del ALN sobre los osteoclastos se produce por su inhibición de la farnesil pirofosfato sintetasa (FPP) y otras enzimas de la ruta biosintética mevalonato/ colesterol, lo que da lugar a modificaciones estructurales en la membrana de los osteoclastos, interrumpiendo la isoprenilación de proteínas (Zhang y cols., 1995). Además, es conocido que el ALN puede reducir la actividad inflamatoria ya que promueve la inactivación de algunas metaloproteinasas de matriz mediante la exposición de los sitios críticos de degradación de la plasmina (Farina y cols., 2012). Debido a estas propiedades, el ALN se ha utilizado para tratar la periodontitis tanto en experimentos con animales (Goes y cols., 2014; De Almeida y cols., 2015; Oktay y cols., 2015; Storrer y cols., 2016) como en humanos (Sharma y Pradeep,

2012; Kanoriya y cols., 2016). Pero se desconoce todavía el posible efecto sinérgico del uso combinado de TFD + ALN para tratar la periodontitis.

El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto de la TFD y el alendronato sódico, tanto independiente como su efecto sinérgico sobre la pérdida ósea en la periodontitis inducida por ligadura en ratas.

## 2.2. Objetivos

El **objetivo general** de la investigación fue estudiar los efectos de la terapia fotodinámica y el alendronato sódico sobre la periodontitis experimental en ratas.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que nos van a permitir responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio:

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Determinar el efecto del tratamiento de la terapia fotodinámica y el alendronato sódico, tanto independientemente como combinados, en la reabsorción ósea provocada por la enfermedad periodontal.
2. Estudiar el efecto de los tratamientos aplicados, tanto independientemente como combinados, en la densidad ósea del hueso circundante a la zona afectada por la enfermedad periodontal.
3. Analizar la actividad inflamatoria en el tejido tras aplicar el tratamiento de la terapia fotodinámica y el alendronato sódico, tanto independientemente como combinados.
4. Cuantificar los neutrófilos presentes en las muestras de lesiones periodontales tras aplicar los tratamientos tanto independientemente como combinados.
5. Valorar el estrés oxidativo mediante la cuantificación de la peroxidación lipídica midiendo la producción de malonaldehído (MDA) tras aplicar los tratamientos, tanto independientemente como combinados.

**MATERIALES Y  
MÉTODOS**



## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Animales de experimentación

Los animales utilizados en este estudio se obtuvieron del Centro de Experimentación Animal (REGA ES300305440012) (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia. El protocolo del estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia (Anexo 1) y la autoridad competente (A1320140708) (Anexo 2), y siguió las directrices de la Unión Europea para la experimentación con animales (EU / 63/2010).

Un total de 60 ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*), con un peso de entre 210 g y 270 g (peso medio 250 g) (Figura 1) se incluyeron en este estudio prospectivo aleatorizado, que tuvo lugar entre abril de 2016 y octubre de 2016. Se alojó a los animales de forma individual en jaulas de plásticos en condiciones supervisadas (21° C y ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas). Las ratas se aclimataron durante una semana antes del comienzo del estudio, y tuvieron libre acceso a agua potable y a una dieta estándar de comida de bolitas para ratón de laboratorio.



**Figura 3.** Rata Wistar macho

### 3.1.2. Anestesia

Se anestesió a los animales con una mezcla compuesta por un 50% de ketamina (Ketamidor® 100 mg/ml [Richter Farma Ag. Wells. Austria]) y 50% de xilacina (Xilagesic® 2% [Laboratorios Calier SA. Les Franqueses del Valles. España]) administrada por inyección intraperitoneal en dosis de 0,1 ml / 100 g de peso corporal. En caso de que los animales estuvieran más estresados de lo normal, llevábam a cabo una sedación previa por medio de la inyección de buprenorfina (Bupaq® 0.3mg/ml [Laboratorios Karizoo S.A. Caldes de Montbuyl. España]).



**Figura 4.** De izquierda a derecha Xilacina, Buprenorfina y ketamina

### 3.1.3. Inducción de periodontitis.

La enfermedad periodontal necesaria para llevar a cabo la investigación se indujo colocando una ligadura de alambre de ortodoncia con un grosor de 0,06 mm (Dentaurum GmbH & Co. KG, Ispringen. Alemania) alrededor de la zona cervical del primer molar inferior derecho. La ligadura se anudó en la cara vestibular. El tiempo de progresión de la periodontitis fue de 7 días antes de iniciar los diversos tratamientos (Pereira y cols., 2013; Theodoro y cols., 2015).

### 3.1.4. Tratamiento con TFD

Para llevar a cabo el tratamiento de TFD utilizamos un kit de Terapia Fotodinámica (HELBO®; Photodynamic Systems GmbH, Wels, Austria) compuesto por:

- Tinte fotosensible de clorhidrato de fenotiazina (HELBO® Blue Photosensitizer; Photodynamic Systems GmbH, Wels, Austria) (Figuras 5 y 6).



**Figura 5.** Envase tinte fotosensible



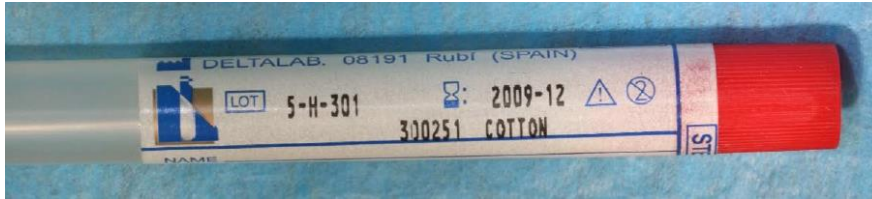
**Figura 6.** Jeringa con tinte

- Láser diodo de mano (HELBO® TheraLite Láser, HELBO® 3D Pocket Probe, Photodynamic Systems GmbH, Wels, Austria)



**Figura 7.** Láser diodo de mano con punta aplicadora

- Hisopo de algodón con mango de aluminio (DeltaLab CA, Rubí, España).

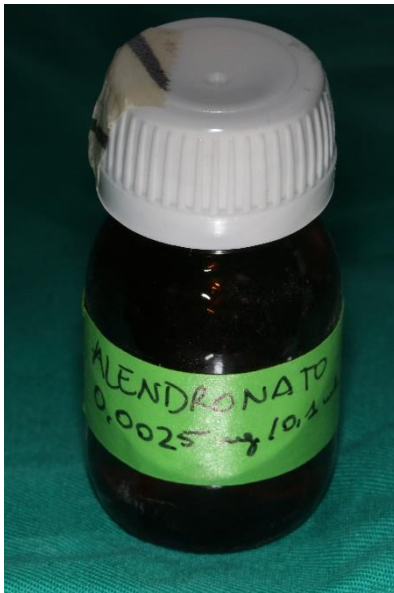


**Figura 8.** Hisopo de algodón

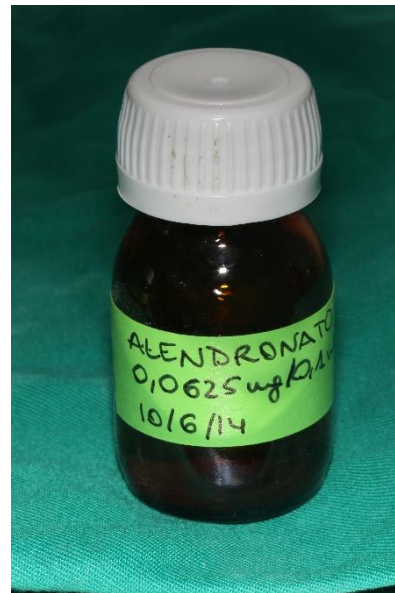
### 3.1.5. Tratamiento con alendronato sódico.

El bifosfonato seleccionado para llevar a cabo el estudio fue alendronato sódico. El alendronato se utilizó en dos concentraciones distinta:

- Alendronato Sódico 0,01 mg/kg (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España) (Figura 9).
- Alendronato Sódico 0,25 mg/kg (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España) (Figura 10).



**Figura 8.** Alendronato sódico 0,01 mg/kg.  
Concentración de 0,0025 en disolución salina

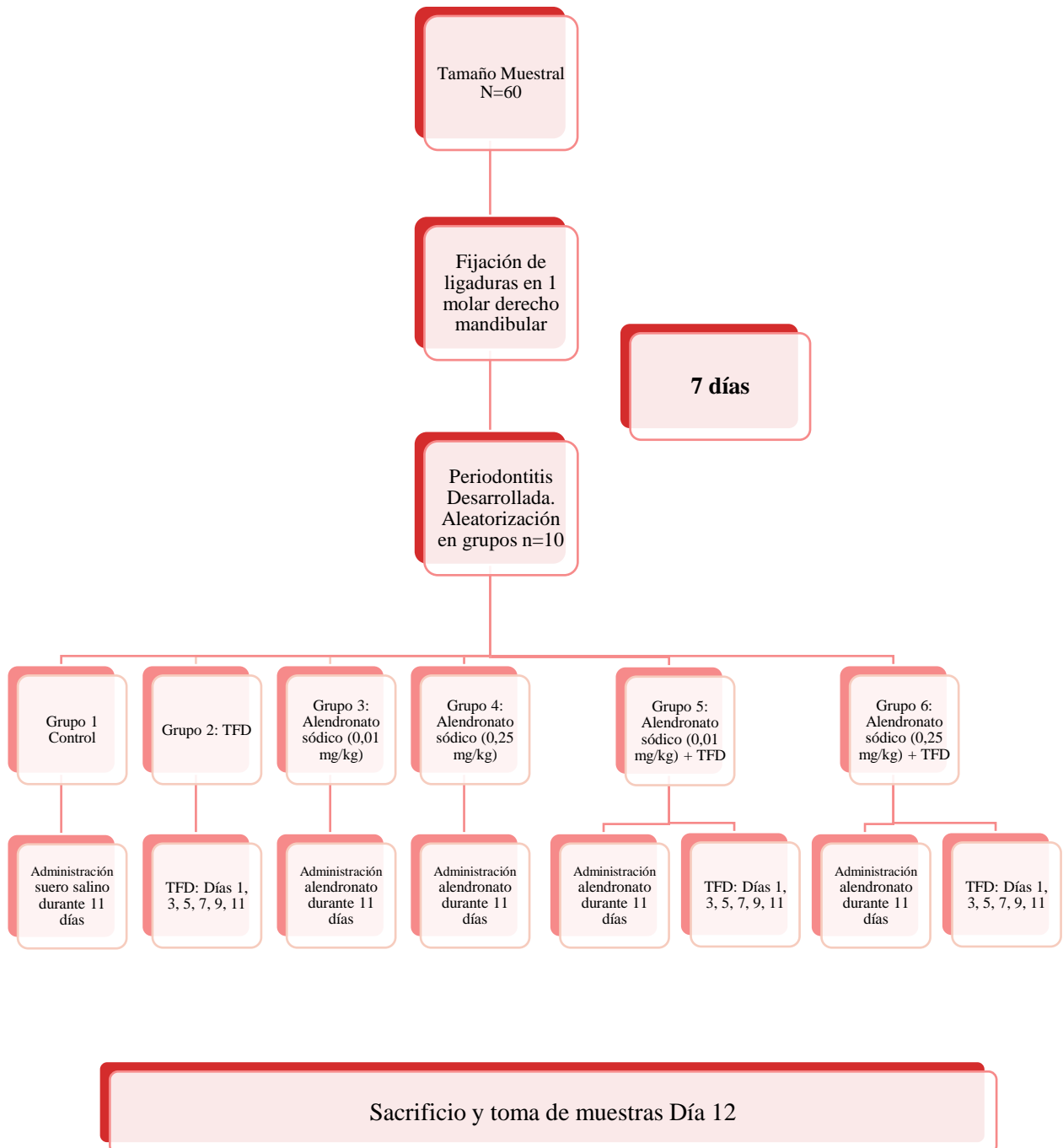


**Figura 9.** Alendronato sódico 0,25 mg/kg  
Concentración de 0,0625 en disolución salina

A las ratas no tratadas con bifosfonato se les inyectó suero salino (B. Braun Medical SA, Barcelona, España).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Diagrama resumen





### 3.2.2. Periodontitis experimental mediante ligadura

La colocación de las ligaduras induce a la periodontitis en los animales de experimentación por colonización bacteriana, inflamación gingival y pérdida de hueso (Goes y cols., 2014). El tiempo de progresión de la periodontitis hasta comenzar a aplicar los diferentes tratamientos fue de 7 días (Pereira y cols., 2013; Theodoro y cols., 2015).

Para inducir la periodontitis, utilizamos anestesia general en los animales de experimentación. Para ello administramos una mezcla de ketamina (10 g/100 ml) (Ketamidor® 100 mg/ml [Richter Farma Ag. Wells. Austria]) y xilacina (2%) (Xilagesic® 2% [Laboratorios Calier SA. Les Franqueses del Valles. España al 50% (0,1 ml/100 g de peso) por vía intraperitoneal. Finalmente conseguimos un estado de anestesia completa (Figura 14).



**Figura 10.** Rata Wistar anestesiada

Una vez lograda la anestesia usamos el modelo de periodontitis experimental previamente descrito (Lima y cols., 2000) insertando alambre de separación de ortodoncia alrededor del cuello de la corona del primer molar inferior derecho. Con la ayuda de dos personas era posible mantener en una posición estable la cabeza del animal. Seguidamente, conseguíamos la apertura bucal simultáneamente al apartar la mejilla y

lateralizar la lengua en el lado opuesto, facilitando así la maniobra de inserción del alambre evitando posibles daños en la cavidad bucal (Figura 11).

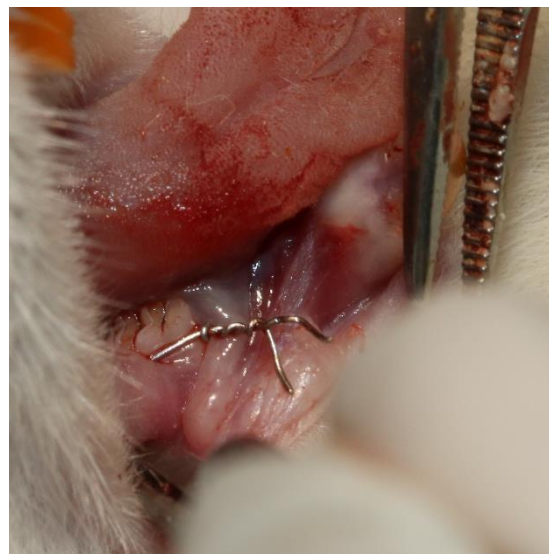


**Figura 11.** Alambre insertado.

Seguidamente, los dos cabos del alambre se aproximan en la zona mesial del diente, donde era más fácil ligar los extremos (Figura 12). De esta manera fue posible la manipulación del alambre hasta conseguir la ligadura (Figura 13).



**Figura 12.** Aproximación mesial.



**Figura 13.** Ligadura realizada.

Finalmente, se reposicionó la ligadura por vestibular. La parte lingual de la ligadura fue ajustada subgingival como marcan los protocolos. Esta posición para el alambre permitió evitar cualquier daño sobre mucosa o lengua de las ratas Wistar, además de evitar posibles interacciones que propiciarán la pérdida de la ligadura (Figura 14).



**Figura 14.** Reposición vestibular del alambre.

El primer molar mandibular izquierdo no se ligó para ser utilizado como control en la obtención de las variables.

Para comprobar tanto la progresión de la periodontitis como la presencia correcta de la ligadura, se realizó una exploración intraoral el día 3 después de colocar las ligaduras.

### **3.2.3. Grupos experimentales**

Una vez transcurridos los 7 días de progresión de la periodontitis, los animales fueron clasificados aleatoriamente en 6 grupos de estudio. Para ello se utilizó un software de aleatorización en línea ([www.randomization.com](http://www.randomization.com)). Se distribuyó al azar a los animales en seis grupos (n=10 por grupo):



- **Grupo 1 (Control):** a las ratas sometidas al modelo periodontal de disminución de masa ósea alveolar se les administró por vía intraperitoneal 2 ml/kg (0,5 ml/ 250 g) de solución salina estéril al 0,9 % al día durante 11 días.
- **Grupo 2 (TFD, n=10):** se llevó a cabo el tratamiento de TFD con un kit de TFD (HELBO®; Photodynamic Systems GmbH, Wels, Austria), mediante un láser diodo de mano (HELBO® TheraLite Láser, HELBO® 3D Pocket Probe, Photodynamic Systems GmbH, Wels, Austria) con una longitud de onda de 660 nm y un potencial de 100 mW.

El tinte fotosensible de clorhidrato de fenotiazina (HELBO® Blue Photosensitizer; Photodynamic Systems GMBH, Wells, Austria) será aplicado en la submucosa de las bolsas periodontales durante 3 minutos y posteriormente se limpiará con peróxido de hidrógeno al 3%. Además, se les administraba por vía subcutánea 2 ml/kg (0,5 ml/ 250 g) de solución salina estéril al 0,9 % al día durante 11 días, tal como ocurrió con el grupo 1 (Camacho y cols., 2016).

- **Grupo 3 (Alendronato sódico 0,01 mg/kg, n=10):** administración intraperitoneal de Alendronato Sódico Trihidrato (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) que fue diluido en solución salina estéril al 0,9 % y se administró en dosis de 0,01 mg/kg diluidos en 1 ml/kg de solución salina estéril al día durante 11 días. Reproduciendo la dosis de prevención de osteoporosis en humanos (Menezes y cols., 2005; Goes y cols., 2014).
- **Grupo 4 (Alendronato 0,25 mg/kg, n=10):** administración intraperitoneal de Alendronato Sódico Trihidrato (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) que fue diluido en solución salina estéril al 0,9 % y se administró en dosis de 0,25 mg/kg diluidos en 1 ml/kg de solución salina estéril al día durante 11 días. Reproduciendo la dosis de tratamiento de osteoporosis en humanos (Menezes y cols., 2005; Goes y cols., 2014).

- **Grupo 5 (TFD + Alendronato 0,01 mg/kg, n=10).** En este grupo se combinó el tratamiento de TFD con la administración de la dosis de prevención de osteoporosis en humanos.
- **Grupo 6 (TFD + Alendronato 0,25 mg/kg, n=10).** En este grupo se combinó el tratamiento de TFD con la administración de la dosis de tratamiento de osteoporosis en humanos.

### 3.2.4. Tratamientos

#### 3.2.4.1. Alendronato

La preparación de alendronato iba disuelta en solución salina estéril al 0,9% en 1 ml/kg. El alendronato sódico fue administrado por vía intraperitoneal durante los 11 días de tratamiento.

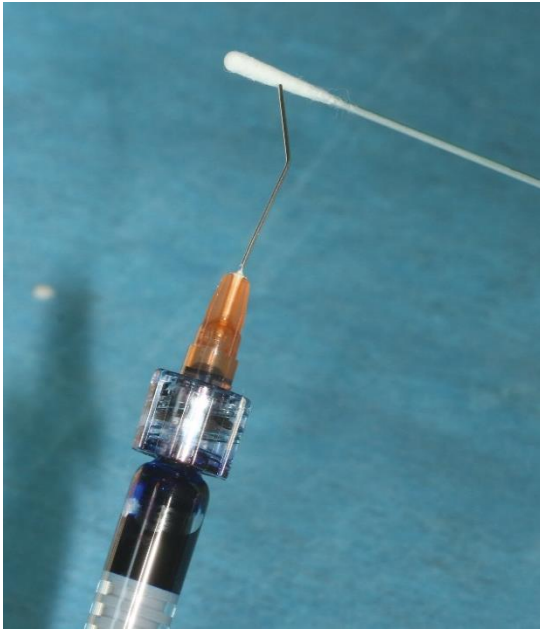
Los grupos 3 y 5 corresponden con la dosis de alendronato de 0,01 mg/kg, mientras que los grupos 4 y 6 corresponden con la dosis de 0,25 mg/ml.

A las ratas de los grupos no tratados con alendronato sódico, se les inyectaba la solución salina descrita previamente (Menezes y cols., 2005; Goes y cols., 2014).

#### 3.2.4.2. TFD

La TFD fue aplicada en los grupos 2, 5 y 6, durante los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Para llevar a cabo el tratamiento de TFD fue completamente necesario volver a realizar el protocolo de anestesia. Sin embargo, esta vez no fue necesario el uso de la buprenorfina en ningún caso, ya que el estado de anestesia total podía evitarse, pero manteniendo el resto de protocolo igual. Una vez alcanzada el estado de anestesia requerido en las ratas, comenzaría la aplicación del tinte fotosensible mediante un hisopo de algodón con mango de aluminio (DeltaLab CA, Rubí, España) (Figura 19, 20 ,21 ,22 ,23).

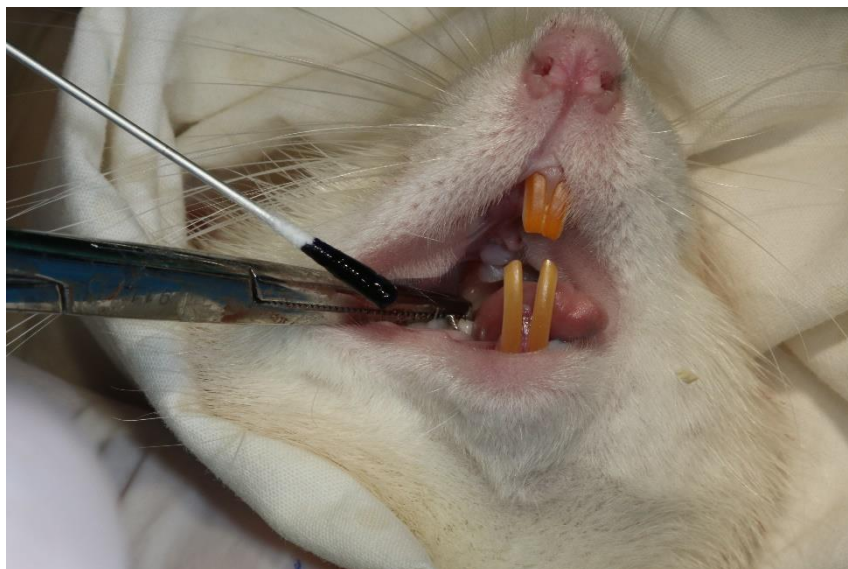
Para ello, en primer lugar, se administraría el tinte con la jeringa sobre la punta del hisopo (Figuras 15 y 16). Seguidamente se aplicaría sobre la zona de la ligadura, incidiendo especialmente en la zona lingual. Finalmente se revisó que la aplicación fue correcta (Figuras 16, 17 y 18) (Camacho y cols., 2016).



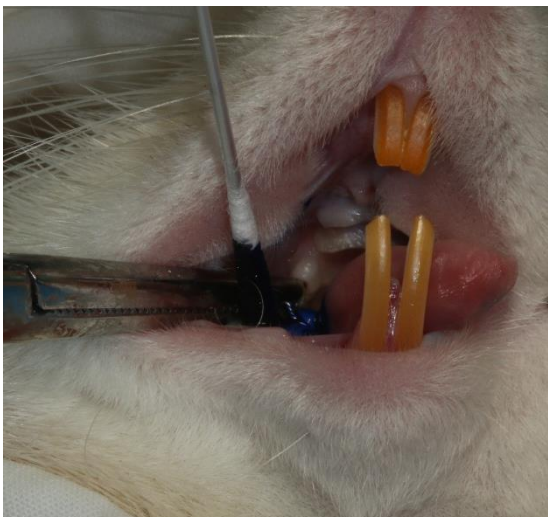
**Figura 15.** Aplicación del tinte sobre el hisopo



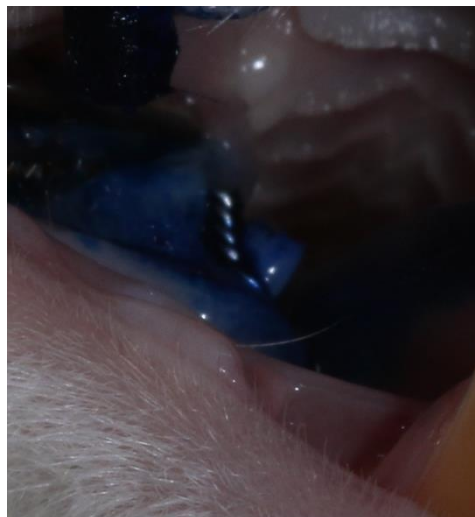
**Figura 16.** Aplicación del tinte sobre el hisopo



**Figura 17.** Introducción de hisopo cargado en la cavidad bucal



**Figura 18.** Aplicación en tejido gingival



**Figura 19.** Tinción aplicada

Una vez pasado el tiempo de espera recomendado por el fabricante del tinte fotosensible (3 minutos) continuamos con la aplicación de la luz láser en la zona a tratar.

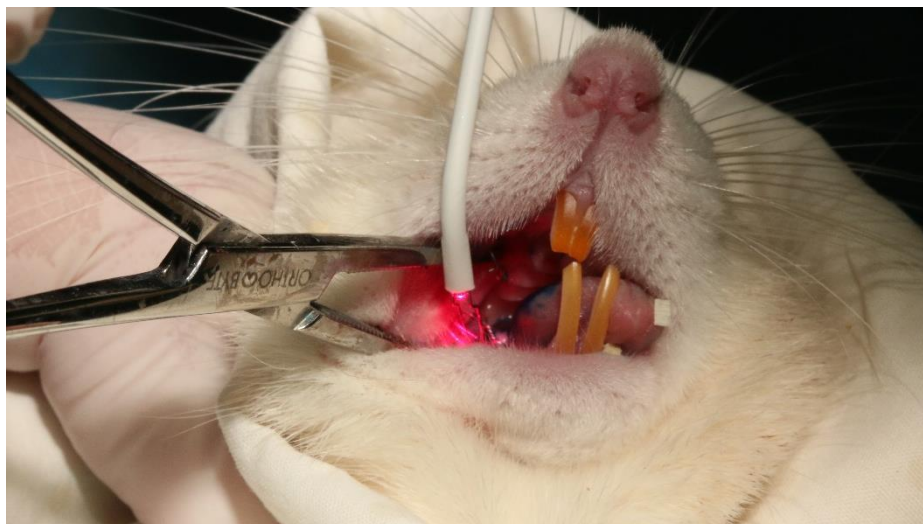
Previa apertura bucal, se situó la punta sin encender sobre el molar tintado. De esta manera se pudo evitar la excitación de la rata (Figura 20).



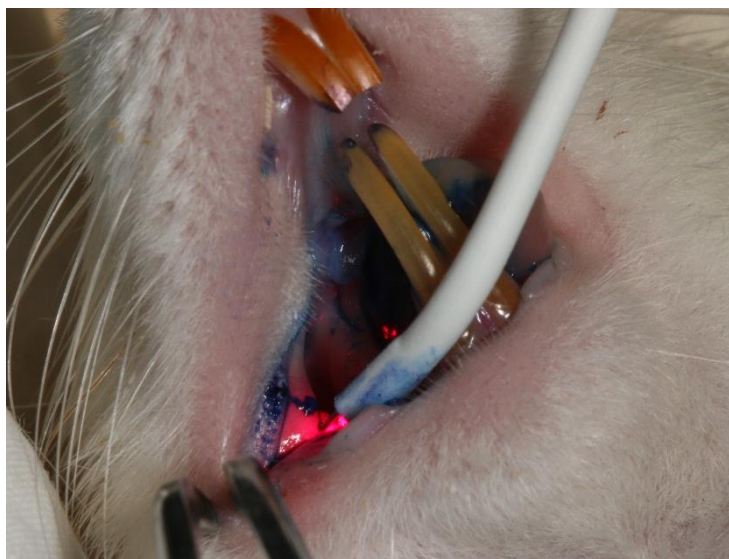
**Figura 20.** Introducción de la punta aplicadora sobre el primer molar inferior derecho

Una vez situado se activaría en el interior de la cavidad oral sobre la zona de tratamiento durante 20 segundos (Figura 21 y 22).










**Figura 21.** Activación de luz láser



**Figura 22.** Aplicación del haz de luz sobre la zona a tratar

### **3.2.5. Sacrificio y obtención de muestras**

Tras los 19 días de investigación, las ratas fueron sacrificadas mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Inmediatamente después de sacrificar a los animales de estudio, se obtuvo la mandíbula de cada animal, que fue seccionada sagitalmente en ambas hemimandíbulas y fueron sumergidas en formalina tamponada al 10% (pH 7,2) durante 48 horas (Tabla 1).

Rata 1 (Grupo 1)	
	
Ligadura	Control
Lingual	Lingual
	
Vestibular	Vestibular
	

**Tabla 1.** Imágenes fotográficas linguales y vestibulares de las hemimandíbulas de la rata 1.

Una vez hechas las secciones, se procedió a la extracción de 3 muestras de tejido gingival de 50-100 mg necesario para la medida de las variables correspondientes a la fase 2. No se dañó el tejido inmediato al diente. Para ello utilizamos un punch de 3 mm. (Figura 23).

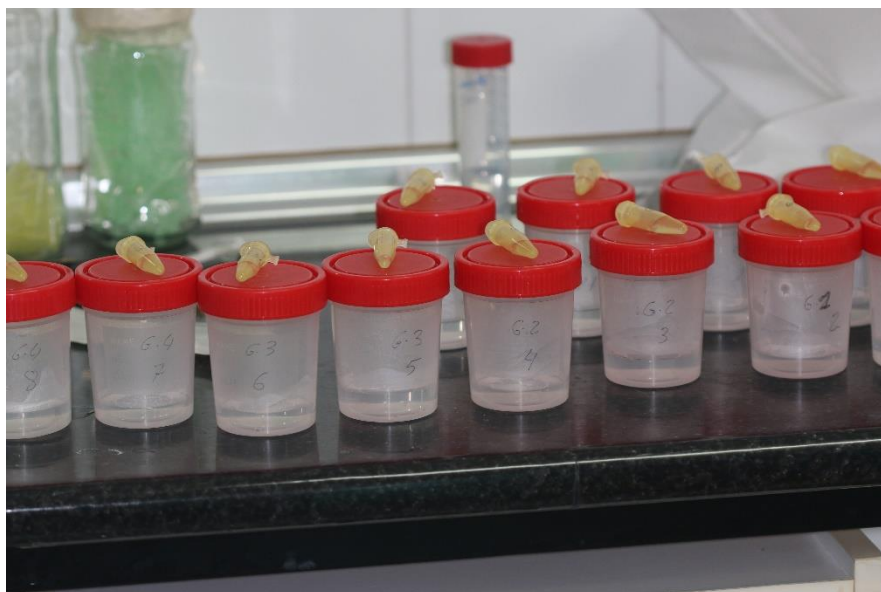


**Figura 23.** Sección de tejido gingival utilizando un punch de 3 mm.

### **3.2.6. Conservación**

El tejido gingival obtenido de cada muestra fue conservado en un pellet independiente en 1 ml de PBS.

Por otra parte, las mandíbulas se conservaron en duquesitas con formalina tamponada al 10% (Figura 24).



**Figura 24.** Muestras conservadas en pellet y duquesitas

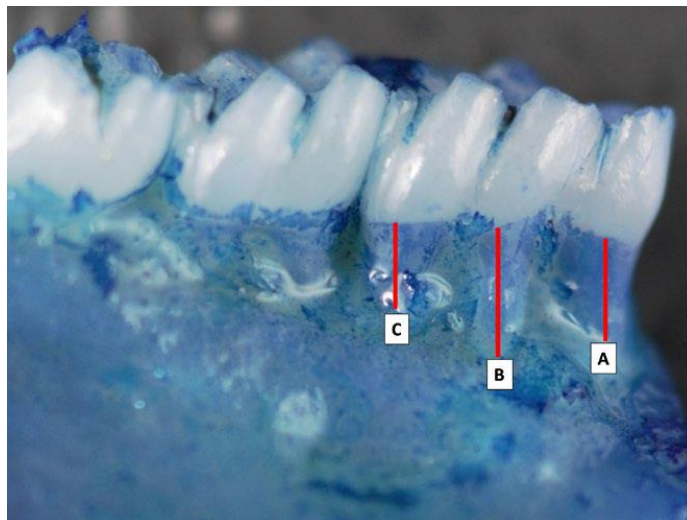
### 3.2.7. Variables de estudio

#### 3.2.7.1. *Análisis morfológico macroscópico*

Se extrajo tejido blando de la hemimandíbula derecha por descarnamiento tras someterlas a una inmersión en hipoclorito de sodio al 8% durante cuatro horas. Los especímenes se lavaron y se secaron. Se realizó la tinción de las piezas con azul de metileno al 1% (Sigma-Aldrich®, Madrid) durante un minuto para una mejor visualización de la unión cemento esmalte (UCE). Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital de 6.1 megapíxeles (Canon® EOS 70D, Canon®, Tokio, Japón) acoplada a un trípode y equipada con objetivo macro de 100 mm con distancia focal mínima. Las piezas se fijaron en cera con su plano oclusal paralelo al suelo y su eje longitudinal perpendicular a la cámara. Se tomaron fotografías de las caras vestibulares de los molares. Para verificar las medidas, se fotografió una regla milimetrada junto con todas las muestras medidas (Ferrandes y cols., 2007). La disminución ósea alveolar se determinó sobre la superficie vestibular del primer molar inferior derecho midiendo la distancia desde la cresta alveolar (CA) al UCE. Las medidas se tomaron a lo largo del eje de las 3 raíces que componen el primer molar (Barella y cols., 2012) (Figura 25). La disminución total de masa ósea alveolar se obtuvo a partir de las medidas medias de la CA



cuantificadas mediante el software de análisis de imágenes ImageJ® versión 1.46 (National Institute of Health, Maryland, EE. UU.).



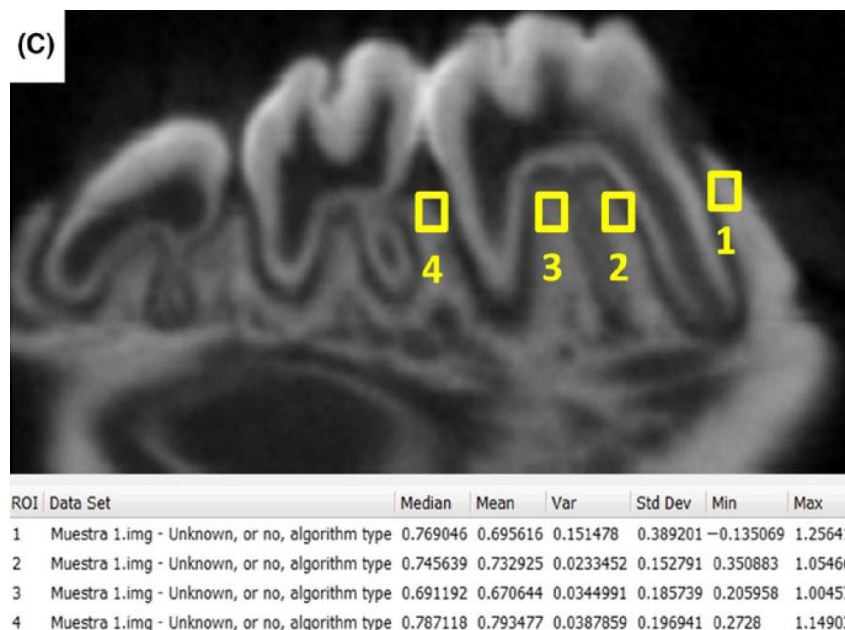
**Figura 25.** Medidas macroscópicas de mandíbula teñida de azul de metileno

#### 3.2.7.2. *Variable Radiográfica. Estudio Micro CT*

A todos los hemimaxilares, se les realizó un micro CT usando un escáner preclínico trimodal Albira SPECT / PET / CT (Bruker®, Massachusetts, EE. UU.). Se reconstruyeron las imágenes tridimensionales de la hemimandíbula derecha y se cuantificó la densidad mineral ósea (DMO) alrededor del primer molar derecho inferior en unidades Hounsfield (UH). Para ello se llevó a cabo mediante un software de análisis imágenes médicas (AMIDE, UCLA University, LA, EE.UU.). Se seleccionaron cuatro regiones de interés (RDI) de donde se extrajo una muestra de tejido con un volumen de 1 mm<sup>3</sup> para cada una. Las RDI fueron las siguientes:

- RDI 1: Mesial a la raíz mesial del primer molar inferior derecho.
- RDI 2: Mesial a la raíz central del primer molar inferior derecho.
- RDI 3: Distal a la raíz central del primer molar inferior derecho.
- RDI 4: Distal a la raíz distal del primer molar inferior derecho.

Las RDI estaban situadas en todos los casos justo debajo de la unión amelocementaria. El cálculo se llevó a cabo con la media de los resultados de las cuatro RDI (Figura 26).



**Figura 26.** Imagen obtenida con el micro CT con zonas de medición de RDI.

### 3.2.7.3. Variables Histopatológicas

Los hemimaxilares fueron fijados en formalina tamponada neutra al 10%. Se sometieron a un proceso de desmineralización en ácido nítrico al 7%. Las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina, para posteriormente hacer secciones de 4  $\mu$ m de espesor a lo largo del plano mesiodistal de los molares. Las secciones se llevaron a cabo entre el primer y segundo molar derecho, donde la ligadura fue colocada para provocar la enfermedad periodontal. Se les aplicó una tinción de con hematoxilina y eosina para su estudio posterior.

Para llevar a cabo el análisis, las muestras fueron evaluadas con microscopio óptico de luz a una magnificación de 40X. Un histopatólogo entrenado analizó parámetros como la concentración de células inflamatorias y la integridad del cemento y del hueso alveolar (siguiendo un protocolo de simple ciego). Puntuó las preparaciones con la siguiente graduación:

0. Actividad inflamatoria celular ausente o escasa y restringida a la región de la encía marginal, el proceso alveolar y el cemento están preservados.

1. Actividad inflamatoria celular moderada (infiltración celular inflamatoria presente en toda la encía insertada), leve reabsorción del proceso alveolar mientras que el cemento está intacto.
2. Actividad inflamatoria celular severa o acentuada (infiltración celular inflamatoria presente en la encía y en el ligamento periodontal), acentuada degradación del proceso alveolar y destrucción parcial del cemento.
3. Actividad inflamatoria celular severa o acentuada (infiltración celular inflamatoria presente en la encía y en el ligamento periodontal), completa reabsorción del proceso alveolar y destrucción severa del cemento (Leitão y cols., 2005).

#### 3.2.7.4. *Variable de medición actividad inflamatoria. Mieloperoxidasa*

Para estudiar el nivel de actividad inflamatoria se llevó a cabo la cuantificación de los neutrófilos presentes en las muestras de tejido gingival obtenido de las mandíbulas. Esta cuantificación se llevó a cabo analizando la actividad de la mieloperoxidasa presente en las muestras (Araújo y cols., 2013; de Araújo y cols., 2013). Las muestras de encía (de la hemimandíbula con ligadura y sin ligadura o control) fueron procesadas según la técnica propuesta por Souza y colaboradores en 2003:

Una de las dos muestras (de 50 a 100 mg de tejido gingival) fue homogeneizadas en 2 volúmenes de solución tampón para congelación (0,1 M NaCl, 20 mM NaPO<sub>4</sub>, 15 mM NaEDTA) a pH 4,7 y centrifugadas a 0,8 g durante 15 minutos. Seguidamente, Los pellets fueron sometidos a una lisis hipotónica (900 µl de solución de NaCl al 0,2% durante 30 segundos, posteriormente se añadió un volumen equivalente de una solución que contenía 1,6% de NaCl y 5% de glucosa). Después de someter a las muestras a una segunda centrifugación, los pellets fueron resuspendidos en un buffer de 50 mM NaPO<sub>4</sub> a pH 5,4 conteniendo 0,5% de H-TAB y de nuevo se volvieron a re-homogenizan y centrifugar a 9,3g y 40°C durante 15 minutos.

La actividad de la MPO en los pellets resuspendidos se cuantificó mediante espectrofotometría por el cambio en la absorbancia a 450 nm utilizando una solución de Tetrametilbencidina (1,6 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). Los resultados fueron obtenidos en unidades de MPO por gramo de tejido.

### 3.2.7.5. Variables medición de estrés oxidativo. Niveles de malonaldehído (MDA)

La peroxidación lipídica fue cuantificada llevando a cabo la medición de la producción de Malonaldehído (MDA) por la reacción producida con Ácido Tiobarbitúrico (Araújo y cols., 2013; de Araújo y cols., 2013). Las muestras de tejido homogenizadas (0,25 ml de un 10% de tejido gingival preparada en 0,15 M KCL) fueron añadidas a una solución de Ácido Tiobarbitúrico (1,5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 1% y 500 µl de Ácido Tiobarbitúrico al 0,6% en solución acuosa), calentando la muestra en un baño de agua y calentada a 100° C durante 45 minutos. Posteriormente, se añadieron 2 ml de n-butanol P.A. y las muestras se homogenizaron, para ser centrifugadas posteriormente 12000 rpm durante 15 minutos a 4° C. La absorbancia de la capa de butanol fue medida a 520 nm (A1) y 535 nm (A2). La concentración de MDA se calculó como la diferencia entre A2-A1 y los valores serán expresados en nmol de MDA/g de tejido gingival.

### 3.2.8. Tratamiento estadístico

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Se realizó un estudio descriptivo de cada variable. Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene, y los datos mostraron una distribución sesgada/desigual/distorsionada. Los datos se analizaron mediante una prueba de clasificación no paramétrica. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (para dos muestras independientes) para las variables cuantitativas. Se aceptó la significación estadística para  $p \leq 0,05$ .

# RESULTADOS

## 4. Resultados

### 4.1. Análisis morfométrico macroscópico

La colocación de la ligadura en el primer molar indujo una disminución ósea intensa. El grupo control (no recibió ningún tratamiento) mostró la mayor pérdida de hueso circundante a la zona ligada; 0,83 (0,77-0,93) mm, en la que se observaron exposición radicular y lesiones de furcación en los diez animales. Este grupo presentó una mayor disminución ósea macroscópica con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros grupos tratados con TFD ( $p=0,016$ ), ALN 0,25 mg / kg ( $p=0,016$ ), TFD + ALN 0,01 mg / kg ( $p=0,016$ ) y TFD + ALN 0,25 mg / kg ( $p=0,009$ ). Los animales tratados con TFD + ALN 0,25 mg / kg mostraron una disminución ósea significativamente menor según el estudio morfométrico, no sólo en comparación con el grupo de control ( $p=0,009$ ), sino también con el grupo tratado con ALN 0,01 mg / kg ( $p=0,016$ ) (Tabla 2).

Grupos de estudio	n	Pérdida de hueso alveolar (mm)
		Mediana (Rango)
Control	10	0,83 (0,77-0,93) <sup>#, †, ‡, †</sup>
TFD	10	0,61 (0,23-0,78) *
ALD 0,01 mg/kg	10	0,75 (0,55-1,11) <sup>†</sup>
ALD 0,25 mg/kg	10	0,56 (0,31-0,79) *
TFD + ALD 0,01 mg/kg	10	0,50 (0,32-0,81) *
TFD + ALD 0,25 mg/kg	10	0,36 (0,24-0,57) <sup>*, §</sup>
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO CONTROL; # DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD;		
§ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,25 MG/KG;		
‡ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,25 MG/KG		

**Tabla 2:** Análisis morfométrico de la pérdida de hueso alveolar (mm) alrededor del primer molar mandibular derecho entre los grupos de estudio (Mann-Whitney U test).

## 4.2. Estudio micro CT

La DMO bajo la unión cemento-esmalte resultó ser menor en el grupo control, 0,035 (0,020-0,600) HU, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos tratados con ALN 0,25 mg / kg ( $p=0,001$ ); TFD + ALN 0,01 mg / kg ( $p<0,001$ ); y TFD + ALN 0,25 mg / kg ( $p<0,001$ ). Estos tres grupos de tratamiento (ALN 0,25 mg / kg, TFD + ALN 0,01 mg / kg, TFD + ALN 0,25 mg / kg) también mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los animales tratados sólo con TFD ( $p=0,007$ ,  $p=0,005$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Cabe señalar que la DMO más alta se obtuvo en animales tratados con TFD + ALN 0,25 mg / kg 1,187 (1,000-1,600) HU, mostrando diferencias estadísticamente significativas no sólo con el grupo control ( $p<0,001$ ) y animales tratados con TFD ( $p<0,001$ ), sino también con aquellos que fueron tratados con ALN 0,01 mg / kg ( $p<0,001$ ), ALN 0,25 mg / kg ( $p=0,001$ ), e incluso con los tratados con la combinación TFD + ALN 0,01 mg/kg ( $p=0,010$ ) (Tabla 3).

Grupos de estudio	n	DENSIDAD MINERAL ÓSEA (mm)
		Mediana (Rango)
Control	10	0,035 (0,020-0,600) †, ‡, †
TFD	10	0,225 (0,150-0,900) †, ‡, †
ALD 0,01 mg/kg	10	0,132 (0,090-0,800) ‡, †
ALD 0,25 mg/kg	10	0,482 (0,400-1,100) *, #, ‡, †
TFD + ALD 0,01 mg/kg	10	0,725 (0,650-1,400) *, #, §, †, †
TFD + ALD 0,25 mg/kg	10	1,187 (1,000-1,600) *, #, §, †, ‡
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO CONTROL; # DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD; § DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,25 MG/KG; ‡ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,25 MG/KG		

**Tabla 3:** Análisis de la DMO del hueso alveolar (HU) alrededor del primer molar mandibular derecho entre los grupos de estudio (Mann-Whitney U test).

### 4.3. Análisis histológico de la disminución ósea alveolar

En el estudio microscópico, se observó el mayor nivel de infiltración de células inflamatorias con reabsorción de hueso alveolar y de cemento en el grupo de control, puntuación 3 (2-3), con diferencias significativas en comparación con los animales tratados con TFD ( $p<0,001$ ), ALN 0,01 mg/kg ( $p=0,01$ ), ALN 0,25 mg/kg ( $p<0,001$ ), TFD + ALN 0,01 mg/kg ( $p<0,001$ ) y TFD + ALN 0,25 mg/kg ( $p<0,001$ ). El menor proceso inflamatorio y destrucción ósea alveolar y cementos alveolares se observó en animales tratados con TFD + ALN 0,25 mg/kg 1 (puntuaciones 0-1), con diferencias significativas en comparación con el grupo de control ( $p<0,001$ ), y los grupos tratados con TFD ( $p<0,001$ ) y ALN 0,01 mg/kg ( $p<0,001$ ) (Tabla 4).

Grupos de estudio	n	Puntuaciones histológicas
		Mediana (Rango)
Control	10	3 (2-3) #, §, †, ‡, †
TFD	10	2 (1-3) *, †, ‡, †
ALD 0,01 mg/kg	10	2 (2-3) *, †, ‡, †
ALD 0,25 mg/kg	10	1 (1-3) *, #, §
TFD + ALD 0,01 mg/kg	10	1 (1-2) *, #, §
TFD + ALD 0,25 mg/kg	10	1 (0-1) *, #, §
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO CONTROL; # DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD; § DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,25 MG/KG; ‡ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,25 MG/KG		

**Tabla 4:** Análisis histológico de la respuesta inflamatoria con periodontitis experimental (Mann-Whitney U test).



#### 4.4. Actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

La mayor actividad de la MPO se encontró en el grupo de control, seguido por ALN 0,01 mg/kg > TFD > ALN 0,25 mg/kg > TFD + ALN 0,01 mg/kg > TFD + ALN 0,25 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con TFD + ALN 0,25 mg/kg presentaron la menor actividad la actividad más baja de MPO, 13,38 (13,11-13,51) nmol/g, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros grupos: control (p=0,002); TFD (p=0,003); ALN 0,01 mg/kg (p=0,003); ALN 0,25 mg/kg (p=0,002) y TFD + ALN 0,01 mg/kg (p = 0,003) (Tabla 5).

Grupos de estudio	n	Actividad MPO (NMOL/G DE TEJIDO)
		Mediana (Rango)
<b>Control</b>	10	22,32 (15,14-38,95) †, ‡, †
<b>TFD</b>	10	16,94 (13,56-62,11) †
<b>ALD 0,01 mg/kg</b>	10	17,92 (14,68-53,75) ‡, †
<b>ALD 0,25 mg/kg</b>	10	16,42 (13,67-27,14) *, †
<b>TFD + ALD 0,01 mg/kg</b>	10	14,51 (13,84-16,96) *, §, †
<b>TFD + ALD 0,25 mg/kg</b>	10	13,38 (13,11-13,51) *, #, §, †, ‡
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO CONTROL; # DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD;		
§ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,25 MG/KG;		
‡ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,25 MG/KG		

**Tabla 5:** Comparación de actividad MPO entre los grupos de estudio (Mann-Whitney U test).

#### 4.5. Niveles de malonaldehído (MDA)

Por último, el orden de los grupos de mayor a menor según la actividad de MDA fue el siguiente: grupo de control > ALN 0,01 mg/kg > TFD > ALN 0,25 mg/kg > TFD + ALN 0,01 mg/kg > TFD + ALN 0,25 mg/kg. Como ocurre con la actividad de (1a) MPO, se encontró la menor actividad/actividad más baja de MDA en animales tratados con TFD + ALN 0,25 mg/kg 27,20 (15,60-32,30) nmol/g, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con el resto de los grupos: control (p=0,009); TFD (p=0,009); ALN 0,01 mg/kg (p=0,009); ALN 0,25 mg/kg (p=0,028) y TFD + ALN 0,01 mg/kg (p=0,009) (Tabla 6).

Grupos de estudio	n	Actividad MDA (NMOL/G DE TEJIDO)
		Mediana (Rango)
<b>Control</b>	10	74,30 (68,50-77,00) #, †, ‡, †
<b>TFD</b>	10	53,50 (43,90-64,70) *, †, †
<b>ALD 0,01 mg/kg</b>	10	56,50 (52,70-87,00) †, †, †
<b>ALD 0,25 mg/kg</b>	10	35,60 (27,30-60,40) *, §, †
<b>TFD + ALD 0,01 mg/kg</b>	10	33,10 (22,50-50,20) *, #, §, †
<b>TFD + ALD 0,25 mg/kg</b>	10	27,20 (15,60-32,30) *, #, §, †, ‡

\* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO CONTROL; # DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD;  
 § DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO ALD 0,25 MG/KG;  
 ‡ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,01 MG/KG; † DIFERENCIA SIGNIFICATIVA COMPARADA CON EL GRUPO TFD + ALD 0,25 MG/KG

**Tabla 6:** Comparación de los niveles de MDA entre los grupos de estudio (Mann-Whitney U test).

# DISCUSIÓN

---

---

## 5. Discusión

A la hora de llevar a cabo investigaciones con modelos animales, se han utilizado una gran variedad de modelos animales en estudios experimentales destinados a determinar el efecto de la periodontitis, así como explorar nuevos medios terapéuticos para tratar la enfermedad periodontal. Entre ellos, los animales más utilizados en estos modelos son los perros, cerdos y roedores (ratas y ratones). A pesar de que los animales de experimentación más grandes, como los perros y los cerdos, son capaces de desarrollar periodontitis naturalmente para propósitos experimentales, debido a que presentan características más similares a las humanas (Oz y Puleo, 2011); su gran tamaño, alto coste y las cuestiones éticas implicadas limitan su uso (de Oliveira y cols., 2016).

Para la presente investigación se utilizaron ratas Wistar. Este modelo animal de experimentación es uno de lo más extendidos a la hora de investigar la periodontitis sobre animales. Las ratas Wistar son seleccionadas debido a su facilidad de manipulación y bajo coste. Además, la estructura y organización del tejido periodontal de los molares de la rata (epitelio gingival, epitelio sulcular, epitelio de unión, fibras de colágeno periodontal, cemento celular y acelular, y hueso alveolar) es muy similar a la humana (Listgarten, 1975). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la rata Wistar es una especie adecuada para estudios experimentales de enfermedad periodontal inducida por la colocación de una ligadura en el primer molar inferior, ya que en el análisis de los resultados del grupo de control no tratado se observó el efecto de la periodontitis en todas las variables de estudio. Se observó una pérdida ósea alveolar mayor, una DMO disminuida; en el estudio histológico se encontraron altos niveles de infiltrado inflamatorio; de la misma manera, el análisis gingival de MPO y MDA indicó altos niveles de actividad inflamatoria y estrés oxidativo.

En los últimos años, se han investigado una variedad de enfoques terapéuticos no invasivos para tratar la enfermedad periodontal, entre los más prometedores, podemos encontrar la TFD. El mecanismo de acción de la TFD se basa en un fotosensibilizador que se une a una célula diana y que es activado posteriormente mediante la aplicación de una dosis de luz visible a una longitud de onda concreta, de manera que el FS pasa de su estado base, a un estado excitado o energizado. Después de la activación del FS, se producen moléculas reactivas de oxígeno y otras sustancias reactivas que tienen una acción citotóxica afectando principalmente a la membrana de las células diana (Maisch y

cols., 2007). El mecanismo molecular de la acción bactericida de la TFD se debe a dos mecanismos diferentes (Fiel y cols., 1981). Ambos consiguen dañar la membrana citoplasmática de las bacterias (Sharman y cols., 1999). El FS activado puede reaccionar con las biomoléculas circundantes de dos formas distintas: provocando una reacción de transferencia de electrones entre el FS activado y las moléculas de las células circundantes, liberando radicales libres; estos radicales libres son altamente reactivos e interactúan con moléculas endógenas de oxígeno, produciendo derivados de oxígeno altamente reactivos tales como superóxidos, hidroxilos y peróxido de hidrógeno que dañan la integridad de las membranas celulares bacterianas causando daños biológicos irreversibles. La segunda vía de reacción se produce por la reacción entre el FS activado con el oxígeno presente ambiental, generando una molécula de oxígeno reactivo denominado oxígeno singlete, cuya reactividad química provoca daño oxidativo y efectos letales sobre las bacterias, debido a daños en la membrana y en la pared celular, como hemos mencionado anteriormente (Gualberto y cols., 2016).

En el presente estudio, los animales tratados con TFD mostraron menor disminución ósea alveolar, mayor DMO, menor actividad inflamatoria en el análisis histológico y menores niveles de MPO y MDA en las muestras gingivales que el grupo de control no tratado, con diferencias estadísticamente significativas observadas en el análisis morfométrico macroscópico ( $p=0,016$ ), análisis histológico ( $p<0,001$ ) y niveles de MDA ( $p=0,009$ ). Otros investigadores han observado resultados similares, como Oliveira y cols. (2016) en un trabajo de investigación sobre periodontitis inducida por ligadura del primer molar inferior y del segundo molar superior en ratas Wistar, en el cual se observó una disminución ósea alveolar menor después de 3, 7 y 15 días de tratamiento con TFD en comparación con animales no tratados (grupo de control). Asimismo, la cuantificación de células TRAP positivas que indica la actividad de los osteoclastos en la reabsorción ósea, y el análisis cuantitativo inmunoenzimático de las moléculas relacionadas con la resorción ósea (OPG y RANK-L) también fueron menores en el grupo TFD. Otros autores que investigaron la periodontitis experimental en ratas han obtenido resultados similares a los del presente estudio, y recomiendan una terapia combinada de TFD y desbridamiento mecánico o detartraje y raspado y alisado radicular (RAR) (Goes y cols., 2012; Theodoro y cols., 2015).

Los bifosfonatos (BF) son un grupo de fármacos mediadores del metabolismo óseo cuya acción antirresortiva para el tratamiento de la periodontitis está siendo investigada actualmente (Cantatore y cols., 1999; Sharma y cols., 2012; Price y cols., 2013; Goes y cols., 2014; Kanoriya y cols., 2016). El Alendronato (ALN) es un BF de tercera generación que contiene nitrógeno en su composición y presenta una potente acción antirresortiva debido a que favorece la apoptosis de los osteoclastos e inhibe la diferenciación de estos durante el proceso de maduración (Chacon y cols., 2006), esto provoca que la absorción de ALN por parte de los osteoclastos durante el recambio óseo anula sus funciones (inhibiendo la farnesil fosfato sintetasa y otras enzimas implicadas en la vía metabólica mevalonato/colesterol) e incluso activa la apoptosis de los osteoclastos, lo que reduce la resorción ósea alveolar provocada por la periodontitis (Zhang y cols., 1995).

Los resultados de este estudio mostraron mejores resultados en el grupo de animales tratados con ALN a 0,01 mg/kg que para los del grupo de control, el cual no recibió ningún tratamiento real, sin embargo, fueron peores comparados con el grupo tratado con TFD. Por otro lado, los animales tratados con ALN a 0,25 mg/kg presentaron buenos resultados en todas las variables estudiadas, sólo superados por los tratamientos combinados de TFD + ALN (0,01 y 0,25 mg/kg).

En 2014, Goes y cols utilizaron las mismas dosis de ALN que en el presente estudio para tratar la periodontitis experimental en ratas Wistar. Los resultados que obtuvieron mostraron una disminución ósea alveolar menor en el análisis histomorfométrico, menores niveles de TRAP en el análisis histoquímico, menor actividad inflamatoria en el estudio histológico y menos actividad de la MPO en comparación con el grupo de control no tratado. Pero, como en el presente estudio, los mejores resultados se obtuvieron con una dosis de ALN de 0,25 mg/kg.

En 2012, Goes y colaboradores llevaron a cabo un estudio donde trataron la periodontitis experimental en ratas Wistar con dosis de 0,01; 0,05 y 0,25 mg/kg de ALN; como en el presente estudio. Observaron una menor disminución ósea en el estudio histomorfométrico y menor actividad inflamatoria en el análisis histológico en los animales tratados con ALN a 0,25 mg/kg. Esta dosis más alta de ALN mostró una potente actividad antiinflamatoria a través de la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (Kellesarian y cols., 2016). Los resultados satisfactorios de estos estudios, que han

demostrado la eficacia del ALN en el tratamiento de la enfermedad periodontal han llevado a la fabricación de geles de ALN (normalmente al 1%) para el tratamiento de bolsas periodontales en seres humanos, siendo aplicado tanto de manera individual, como combinadas con otras sustancias, como el plasma rico en plaquetas (Kanoriya y cols., 2016; Sharma y cols., 2012).

Por último, con el posible efecto sinérgico de la combinación de TFD + ALN para tratar la periodontitis experimental en ratas se obtuvieron los mejores resultados en la disminución de hueso alveolar, así como para la conservación de la DMO. Además, se observó una menor actividad inflamatoria con respecto al resto los grupos de estudio; con la combinación de TFD + 0,25 mg/kg de ALN se alcanzaron mejores resultados que con la combinación de TFD + 0,01 mg/kg de ALN. En las variables gingivales estudiadas, los niveles más bajos de MPO y MDA se observaron en animales tratados con TFD + 0,25 mg/kg de ALN seguidos de aquellos tratados con TFD + 0,01 mg/kg de ALN. Así, la combinación TFD + 0,25 mg/kg de ALN consiguió mejores resultados para las variables DMO, MPO y MDA, con diferencias estadísticamente significativas.

La limitación del presente estudio es principalmente que los resultados obtenidos no pueden ser comparados con ninguna otra investigación, ya que, hasta la fecha, no se ha publicado ninguna otra evidencia científica del efecto sinérgico de la combinación de TFD + ALN. Solo existe una referencia de un estudio que utiliza la combinación de TFD y ALN para tratar a pacientes con neovascularización coroidea miópica (Miki y cols., 2013).

En el año 2015, Akyol y colaboradores estudiaron el posible efecto sinérgico de la irrigación de ALN (1 mg/ml) sobre los defectos óseos en la región distal de los vasos sanguíneos Epífisis de fístula de rata de Wistar, no combinada con TFD pero con láser de bajo nivel (LLLT) aplicada en los días 0, 2, 4, 6 y 8 con un láser GaAlAs (Gallium-Aluminium-Arsenide); Se concluyó que la combinación de LLLT y ALN riego tuvo un efecto beneficioso sobre la reparación ósea.

# CONCLUSIONES



## 6. Conclusiones

- 1 El uso de la terapia fotodinámica y del alendronato sódico para el tratamiento de periodontitis ha mostrado ser capaz de reducir la reabsorción ósea producida por la enfermedad periodontal, tanto de manera independiente como con tratamiento combinado, obteniendo los mejores resultados en la combinación de TFD y alendronato al 0,25%.
- 2 La densidad ósea del área circundante a la zona afectada mostró menos afectación en los grupos tratados, evidenciando el efecto positivo de los tratamientos, tanto independientemente como combinados, sobre la enfermedad periodontal. El grupo tratado con TFD y alendronato al 0,25% mostró los niveles más altos de densidad ósea, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación al resto de grupos.
- 3 Los marcadores de la actividad inflamatoria fueron significativamente mejores en los grupos tratados con respecto al grupo control, tanto si el tratamiento era sinérgico como independiente. El mejor resultado se dio en el tratamiento combinado de TFD con alendronato al 0,25%.
- 4 Tras la aplicación de los tratamientos de TFD y alendronato, la actividad de la mieloperoxidasa que nos permite cuantificar los neutrófilos, mostró valores menores en los grupos sometidos a los tratamientos propuestos, tanto en tratamiento individual como combinado. El grupo al que se le aplicó tanto TFD como la inyección del alendronato al 0,25% mostró los mejores resultados, siendo estos, estadísticamente significativos en comparación al resto de grupos.
- 5 Los valores de estrés oxidativo estudiados mediante el análisis de los niveles de malonaldehído fueron menores en los grupos tratados con respecto al grupo control, tanto en tratamientos combinados como individuales. El grupo tratado con TFD y alendronato al 0,25% presentó unos valores inferiores estadísticamente significativos con respecto al resto de grupos.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

## 7. Bibliografía

1. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 2008; 19:420-432.
2. Akyol UK, Sipal S, Demirci E, Gungormus M. The influence of low-level laser therapy with alendronate irrigation on healing of bone defects in rats. *Lasers Med Sci* 2015; 30:1141-1146
3. Araújo AA, Souza TO, Moura LM, et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol* 2013; 40:1104-1111.
4. Arboleya L, Alperi M, Alonso S. Efectos adversos de los bisfosfonatos. *Reumatología Clínica*. 2011 May 1;7(3):189-97.
5. Arboleya LR, Morales A, Fiter J. Efecto del alendronato sobre la densidad mineral ósea y la incidencia de fracturas en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis. Un metaanálisis de los estudios publicados. *Med Clin (Barc)*. 2000;114(Supl 2):79-84.
6. Armitage, GC. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 1995, vol. 7, no 1, p. 39-53.
7. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*. 1999 Dec 1;4(1):1-6.
8. Armitage, GC. Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. *Periodontol* 2000, 1995, vol. 9, no 7, p. 9-21
9. Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Annals of Periodontology*. 1996 Nov 1;1(1):37-215.
10. Arweiler NB, Pietruska M, Skurska A y cols. Nonsurgical treatment of aggressive periodontitis with photodynamic therapy or systemic antibiotics. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2013; 123:532-44.
11. Aurich-Barrera B, Wilton L, Harris S, Shakir SA. Ophthalmological Events in Patients Receiving Risedronate. *Drug safety*. 2006 Feb 1;29(2):151-60.

12. Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Archives of oral biology*. 1994 Dec 1;39(12):1035-40.
13. Balata ML, Andrade LP, Santos DB et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial *J Appl Oral Sci*. 2013; 21:208-14.
14. Barella GE, Suffredini IB, Ribeiro FV, Cirano FR, Pimentel SP. Evaluation of the effect of an organic extract obtained from *Ipomea alba* L. on experimental periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2012; 26:158-164.
15. Bascones Martínez A, Figuero Ruiz E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en periodoncia e implantología oral*. 2005 Dec;17(3):111-8.
16. Bastiaan RJ. Denture sore mouth. Aetiological aspects and treatment. *Aust Dent J* 1976; 21: 375-382.
17. Benov L, Photodynamic therapy: current status and future directions, *Med. Princ. Pract.* 24 (Suppl. 1) (2014) 14–28.
18. Bentzen BH, Grauballe MC, Björnsson MJ, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Holmstrup P. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2005;32(2):73-80.
19. Bergendal T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1 year follow-up study. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 227-238.
20. Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Balcom J. Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. *International forum of allergy & rhinology* 2011 Sep (Vol. 1, No. 5, pp. 329-334). Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
21. Björnsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *Journal of periodontal research*. 2003 Dec;38(6):543-50.
22. Black DM, Kelly MP, Genant HK, Palermo L, Eastell R, Bucci-Rechtweg C, Cauley J, Leung PC, Boonen S, Santora A, de Papp A. Bisphosphonates and fractures of the

- subtrochanteric or diaphyseal femur. *New England Journal of Medicine*. 2010 May 13;362(19):1761-71.
23. Borjes I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007; 2007:45794.
24. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337-342.
25. Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *Journal of clinical periodontology*. 1986 Mar;13(3):205-10.
26. Cantatore FP, Acquista CA, Pipitone V. Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol* 1999; 26:2318-2323.
27. Caplan L, Pittman CB, Zeringue AL, Scherrer JF, Wehmeier KR, Cunningham FE, Eisen SA, McDonald JR. An observational study of musculoskeletal pain among patients receiving bisphosphonate therapy. In *Mayo Clinic Proceedings* 2010 Apr 1 (Vol. 85, No. 4, pp. 341-348). Elsevier.
28. Carvalho AS, Napomoga MH, Colho-Campos J, Silva VJ, Thedei G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg* 2011; 29:735-740.
29. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N et al. Sensitivity of *Candida albicans* Germ Tubes and Biofilms to Photofrin-Mediated Phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4288-95.
30. Chacon GE, Stine EA, Larsen PE, Beck Fm, McGlumphy EA. Effect of alendronate on endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. *J oral Maxillofac Surg* 2006; 64:1005-1009.
31. Chen Z y cols. Bisorption of malaquite green from aqueous solution by *Pleurotus ostreatus* using Taguchi method. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2014, 12:63
32. Clark C, Bryden A, Dawe R, Moseley H, Ferguson J, Ibbotson SH. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and

- comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19(3):134–141.
33. Coukell AJ, Markham A. Pamidronate. *Drugs & aging.* 1998 Feb 1;12(2):149-68.
34. D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89:1241-1246.
35. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, et al. Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol* 2015; 86:1166-1175.
36. de Araújo Júnior RF, Souza TO, de Medeiros CA, et al. Carvedilol decrease IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis. *PLoS One* 2013;8:e66391.
37. De Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, Daifotis A, Stephenson W, Freedholm D, Pryor-Tillotson S, Seleznick MJ, Pinkas H, Wang KK. Esophagitis associated with the use of alendronate. *New England Journal of Medicine.* 1996 Oct 3;335(14):1016-21.
38. de Oliveira PG, Silveira E Souza AM, Novaes AB Jr. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, immunohistochemical, and cytokine evaluation. *Lasers Med Sci* 2016;31:1275-1283.
39. De Sant’Anna GR. Photodynamic Therapy for the Endodontic Treatment of a Traumatic Primary Tooth in a Diabetic Pediatric Patient. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2014; 8:56-60
40. Díaz, F. D. Contaminación de superficies de implantes dentales y su influencia en la osteointegración, 2017, Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
41. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):380–387.
42. Dréno, B.; Pécastaings, S.; Corvec, S.; Veraldi, S.; Khammari, A.; Roques, C. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2018, vol. 32, p. 5-14.

43. Dumitrescu AL, Abd El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004 Aug;31(8):596-603.
44. Camacho-Alonso F, Martinez-Beneyto Y, Gallego MC, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. *J Oral Pathol Med* 2016;45:627-633.
45. Farina AR, Cappabianca L, Di Ianni N, et al. Alendronate promotes plasmin-mediated MMP-9 inactivation by exposing cryptic plasmin degradation sites within the MMP-9 catalytic domain. *FEBS Lett* 2012;30:2366-2374.
46. Ferrandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2007;21:216-221.
47. Fiel RJ, Datta-Gupta N, Mark EH, Joward JC. Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Res* 1981;41:3543-3545.
48. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F y cols. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008; 34:728-34.
49. Fleisch H, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *Am J Physiol* 1961;200:1296–300
50. Fleisch H, Russell RGG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;212:901–3.
51. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR et al. Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy on Patients with Necrotic Pulps and Periapical Lesion. *J Endod* 2008; 34:138-42.
52. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2013 Jun;62(1):59-94.
53. Giannopoulou C, Cappuyns I, Cancela J, Cionca N, Mombelli A. Effect of photodynamic therapy, diode laser; and deep scaling on cytokine and acute-phase protein levels in gingival crevicular fluid of residual periodontal pockets. *J Periodontol* 2012;83:1018-1027.

54. Goes P, Melo IM, Dutra CS, Lima AP, Lima V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol* 2012;57:1537-1544.
55. Goes P, Melo IM, Silva LM, Benevides NM, et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontol Res* 2014;49:45-54.
56. Gold SI. Periodontics. The past: Part (I). Early sources. *Journal of clinical periodontology*. 1985 Feb;12(2):79-97.
57. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986 Jun 1;57(6):370-7.
58. Gualberto EC Jr, Theodoro LH, Longo M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy minimizes the deleterious effect of nicotine in female rats with induced periodontitis. *Lasers Med Sci* 2016;31:83-94.
59. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-450.
60. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*, 2009, vol. 54, p. S11-S26.
61. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2005 Jun;38(1):72-122.
62. Hong JS, Jung JY, Yoon JY, Suh DH. Acne treatment by methyl aminolevulinate photodynamic therapy with red light vs intense pulsed light. *Int J Dermatol*. 2013;52(5):614–619.
63. Hou C, Zhang Q, Li Y, Wang H. P25–graphene hydrogels: Room-temperature synthesis and application for removal of methylene blue from aqueous solution. *Journal of hazardous materials*. 2012 Feb 29;205:229-35.
64. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs*. 2008;2008:276109.
65. Kalmar JR WS. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006 May 16;144(10):753-61.



66. Kanoriya D, Pradeep AR, Singhal S, Garg V, Guruprasad CN. Synergistic Approach Using Platelet-Rich Fibrin and 1% Alendronate for Intraony Defect Treatment in Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* 2016;87:1427-1435.
67. Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell RG, Oppermann U. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 May 16;103(20):7829-34.
68. Keating GM. Ibandronate: a review in Japanese patients with osteoporosis. *Drugs & aging*. 2016 Apr 1;33(4):295-303.
69. Kinane DF, Hajishengallis G. Polymicrobial infections, biofilms, and beyond. *Journal of clinical periodontology*. 2009;36(5):404-5.
70. Kirkevang LL, Væth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *International Endodontic Journal*. 2007 Apr;40(4):290-9.
71. Kordiyak OJ, Masna ZZ. Analysis of gingival microvessels ultrastructure in the animal model study. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2014 Jan 1;55(1):129-34.
72. Kornman KS, Løe H. The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1993 Jun;2(1):83-97.
73. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med* 2011; 43:755-67.
74. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of bone and mineral research*. 2007 Oct;22(10):1479-91.e animal model study. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2014 Jan 1;55(1):129-34.
75. Leitão RF, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FA, Lima V, Brito GA. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J periodontal* 2005;76:956-63.

76. Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experiental pediodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 2000;108:123-129.
77. Listgarten MA. Similarity of epithelial relationships in the gingival of rat and man. *J Periodontol* 1975;46:677-680.
78. Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL. *Microbiología y parasitología médicas*. La Habana: Ciencias Médicas; 2001
79. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clinical microbiology reviews*. 2001 Oct 1;14(4):727-52.
80. López Jornet, P., Saura Ingles, A., y Cozar Fernández, A. . Estudio de las lesiones precancerosas de la mucosa bucal en el paciente geriátrico. *Rev Esp Geriat Gerontol*, 1999, vol. 34, no 3.
81. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci* 2007; 22:83-91.
82. Major P, Lortholary A, Hon J, Abdi E, Mills G, Menssen HD, Yunus F, Bell R, Body J, Quebe-Fehling E, Seaman J. Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: a pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. *Journal of clinical oncology*. 2001 Jan 15;19(2):558-67.
83. Marotti J, Tortamano P, Cai S, et al. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2013; 28:303-9.
84. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries research*. 2004;38(3):204-11.
85. Mazariegos DO. La terapia fotodinámica como una alternativa para la enfermedad periodontal. *Odontología Actual* 2008; 60: 5.
86. Menezes AM, Rocha FA, Chaves HV, Carvalho CB, Ribeiro RA, Brito GA. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005;76:1901-1909.
87. Miki A, Honda S, Nagai T, Tsukahara Y, Negi A. Effects of oral bisphosphonates on myopic chroidal neovascularization wih anti-VEGF therapy and photodynamic therapy. A pilot study. *Br J Ophthalmol* 2013;97:770-774.

88. Mitchell DY, Heise MA, Pallone KA, Clay ME, Nesbitt JD, Russell DA, Melson CW. The effect of dosing regimen on the pharmacokinetics of risedronate. *British journal of clinical pharmacology*. 1999 Oct;48(4):536.
89. Mohanty N, Jalaluddin M, Kotina S. y cols. Photodynamic therapy: the imminent milieu for treating oral lesions. *J Clin Diagn Res* 2013; 7:1254-7.
90. Moreno Arias G A, Luna AE, Alvarado Delgadillo A y cols. Photodynamic therapy. *Med Cutan Iber Lat Am* 2007; 35:255-268.
91. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2): 2516–2539.
92. Nyst HJ, Tan IB, Stewart FA, et al: Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis PhotodynTher* 2009; 6: 3–11.
93. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005 Mar 1;90(3):1294-301.
94. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of periodontology*. 1996 Nov 1;1(1):821-78.
95. Oktay S, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, Holliday LS, Kesavalu L. Periodontitis in rats induces systemic oxidative stress that is controlled by bone-targeted antiresorptives. *J Periontol* 2015;86:137-145.
96. Olson K, Van Poznak C. Significance and impact of bisphosphonate-induced acute phase responses. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2007 Dec;13(4):223-9.
97. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biochem* 2011;2011:754857.
98. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR y cols. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod* 2010; 36:322-8.
99. Pavlica Z, Petelin M, Nemec A, Erzen D, Skaleric U. Measurement of total antioxidant capacity in gingival crevicular fluid and serum in dogs with periodontal disease. *American journal of veterinary research*. 2004 Nov 1;65(11):1584-8.

100. Pereira Vasconcelos DF, Dias da Silva MA, Rocha Marques M, Gibilini C, Cardoso Guimarães Vasconcelos AC, Pereira Barros S. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: a histomorphometric study. *J Clin Exp Dent* 2013;5:e95-99.
101. Perazella MA, Markowitz GS. Bisphosphonate nephrotoxicity. *Kidney international*. 2008 Dec 1;74(11):1385-93.
102. Pérez AS, Fenoll AB. Estudio preliminar y experimental de 8 sistemas de raspado. *Quintessence: Publicación internacional de odontología*. 1996;9(8):499-505.
103. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The lancet*. 2005 Nov 19;366(9499):1809-20.
104. Price U, Le HO, Powell, et al. Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. *J Periodontal Res* 2013; 48:541-548.
105. Rajesh S, Koshi P y Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol*. 2011; 15:323-27
106. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, Watson B, Owen D, Wolff M, Greenwald RA. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2002 Jan;37(1):1-7.
107. Reynolds-Campbell G, Nicholson A, Thoms-Rodriguez CA. Oral bacterial infections: diagnosis and management. *Dental Clinics*. 2017 Apr 1;61(2):305-18.
108. Ricatto LG, Conrado LA, Turssi CP, Franca FM, Basting RT, Amaral FL. Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study. *Eur J Dent* 2014; 8:509-14.
109. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcified tissue international*. 2004 Dec 1;75(6):451-61.
110. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes and infection*. 2000 Nov 1;2(13):1599-607.
111. Russel, RRG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*, 2011, vol. 49, no 1, p. 2-19.

- 
- 
- 112.Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl. 6):108-129.
  - 113.Santana JC. Candidiasis de la mucosa bucal. En: Santana JC. Infección por el VIH en el complejo bucal. La Habana: Ciencias Médicas; 2000;73-87.
  - 114.Sanz-Sánchez I, Bascones-Martínez A. Otras enfermedades periodontales: I: Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2008 Apr;20(1):59-66.
  - 115.Sanz-Sánchez I, Bascones-Martínez A. Otras enfermedades periodontales: II: Lesiones endo-periodontales y condiciones y/o deformidades del desarrollo o adquiridas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2008 Apr;20(1):67-77.
  - 116.Schou S, Holmstrup P, Kornman KS. Non-human primates used in studies of periodontal disease pathogenesis: a review of the literature. *Journal of periodontology*. 1993 Jun 1;64(6):497-508.
  - 117.Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012;83:19-26.
  - 118.Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999;4:507-517.
  - 119.Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S. Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. *J Pharmacol Sci* 2008;106:555-558.
  - 120.Shoaib Haider Siddiqui M.Dent.Sci., BDSa, Kamran Habib Awan Ph.D. et al. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: A systematic literature review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013; 10:632-43.
  - 121.Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998 Feb;25(2):134-44.
  - 122.Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy, *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2595–601

- 123.Souza MH, Troncon LE, Cunha FQ, Oliveira RB. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1383-1390.
- 124.Storrer CL, Deliberator TM, Giovanini AF, Crivellaro V, Zielak JC, Romito GA. Effect of alendronate on the progression of periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: a study in rats. *Clin Oral Investig* 2016;20:2565-2573.
- 125.Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:237-252.
- 126.Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA, et al. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci* 2015;30:677-683.
- 127.Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R et al. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)* 2012; 9:613–18.
- 128.Vidal MA, Medina C, Torres LM. Seguridad de los bifosfonatos. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. 2011 Feb;18(1):43-55.
- 129.Wan, Marilyn T. Lin, Jennifer Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 2014, vol. 7, p. 145.
- 130.Wang S, Liu Y, Fang D, Shi S. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral diseases*. 2007 Nov;13(6):530-7.
- 131.Wara-aswapati K, Surarit R, Chayasodom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and *porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2007;78:1062-1069.
- 132.White DJ. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *European journal of oral sciences*. 1997 Oct;105(5):508-22.

133. Zhang D, Udagawa N, Nakamura I, Murakami H, Saito S. The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J Cell Sci* 1995;108:2285-2292.
134. Zuradelli M, Masci G, Biancofiore G, Gullo G, Scorsetti M, Navarria P, Tancioni F, Berlusconi M, Giordano L, Santoro A. High incidence of hypocalcemia and serum creatinine increase in patients with bone metastases treated with zoledronic acid. *The oncologist*. 2009 May 1;14(5):548-56.

**ANEXOS**



## Anexos

## 8.1. Anexo 1. Informe del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia

UNIVERSIDAD DE MURCIA	Vicerrectorado de Investigación	<b>CEEA</b> Comité Ético de Experimentación Animal	<b>cmn</b> 37 35 CAMPUS MARE NOSTRUM
-----------------------	---------------------------------	--	---

Código CEEA: 58/2014	<b>INFORME DE COMITÉ ÉTICO</b>
----------------------	--------------------------------

**INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

**DATOS DEL CENTRO**

Nombre: **CEEA Universidad de Murcia**

Número de Registro del Centro: **REGA ES300305440012**

Título del procedimiento: *"Efectos de la terapia fotodinámica y el alendronato sódico sobre la periodontitis experimental en ratas"*


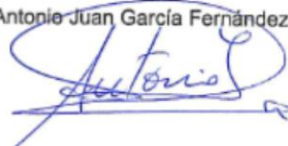
Responsable: D. Fabio Camacho Alonso

Aspectos que han sido considerados para su evaluación:

- Capacitación del personal investigador
- Idoneidad del procedimiento en relación a los objetivos del estudio.
- Metodología empleada
- Posibilidad de conseguir conclusiones válidas con el menor nº posible de animales
- Consideraciones de métodos alternativos
- Idoneidad de las especies seleccionadas
- Supervisión, Criterios de Punto Final y Finalización del Procedimiento

Una vez evaluado el procedimiento antes mencionado, atendiendo a los puntos indicados y de conformidad con lo acordado el día 2 de julio de 2014<sup>1</sup>, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, **INFORMA FAVORABLEMENTE** sobre la realización de dicho procedimiento.

Murcia, 7 de julio de 2014

D <sup>a</sup> . Carmen Lagares Martínez	D. Antonio Juan García Fernández
	
Secretaria CEEA	Presidente CEEA

<sup>1</sup> A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

## 8.2.Anexo 2. Informe favorable de la autoridad competente



Región de Murcia  
Consejería de Agricultura y Agua  
Dirección General de Ganadería y Pesca

Servicio de Sanidad Animal

Plaza Juan XXIII s/n  
30008 Murcia

T. 012  
T.968.368913  
F. 968 362863  
F.968.394378  
www.carm.es/cagric



FABIO CAMACHO ALONSO  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
HOSPITAL MORALES MESEGUER  
CLÍNICA ODONTOLÓGICA UNIVERSITARIA  
AVDA. MARQUÉS DE LOS VÉLEZ, S/N  
30008 MURCIA

### RESOLUCION

Vista la solicitud presentada con fecha 22/07/2014 y nº de registro de entrada 3000N°201400347755, para la autorización de la realización de un proyecto de investigación con animales presentada por D. Fabio Camacho Alonso, como responsable del mismo.

Vista la propuesta del proyecto denominado: "Efectos de la terapia fotodinámica y el alendronato sódico sobre la periodontitis experimental en ratas"

Visto el informe favorable del comité ético del establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Visto el resumen no técnico del proyecto.

Visto el resultado favorable de la evaluación del proyecto por el órgano habilitado "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia".

Visto que en dicha evaluación se clasifica el proyecto como Tipo II y se indica que no es necesario llevar a cabo la evolución retrospectiva del mismo.

Visto el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el Informe emitido por el Jefe del Servicio de Sanidad Animal el 28 de julio de 2014.

Considerando la competencia que tiene atribuida esta Dirección General sobre la base de lo dispuesto en el Decreto 26/2011, de 25 de febrero, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, y Agua y lo dispuesto en el Decreto de Gobierno nº 42/2014, de 14 de abril, por el que se establecen los Órganos Directivos de la Consejería de Agricultura y Agua, y con independencia de otras actuaciones que esta u otra Administración puedan emprender, esta Dirección General

Proyecto de investigación A1320140708



Región de Murcia  
Consejería de Agricultura y Agua  
Dirección General de Ganadería y Pesca

Servicio de Sanidad Animal  
Plaza Juan XXIII s/n  
30008 Murcia

T. 012  
T.968.368913  
F. 968 362863  
F.968.394378  
www.carm.es/cagric

### RESUELVE

Conceder autorización a D. Fabio Camacho Alonso, para la realización del proyecto solicitado, como responsable y usuario del mismo, asignándole el código de identificación N° A1320140708, teniendo esta autorización una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho procedimiento, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

El proyecto se llevará a cabo en el establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Lo que en cumplimiento del Art. 58 de la Ley de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Común (Ley 30/1992, de 26 de noviembre) se le NOTIFICA, significándole que contra dicha RESOLUCIÓN cabe Recurso de Alzada ante el Excmo. Sr. Consejero de Agricultura y Agua en el plazo de UN MES desde la recepción de la presente notificación, sin perjuicio de poder ejercitar, en su caso, cualquier otro que se estime pertinente.

Murcia, a 28 de julio de 2014  
La Directora General de Ganadería y Pesca



Carmen T. Morales Cuenca

Proyecto de investigación A1320140708

### 8.3. Anexo 3. Artículo publicado.

J Periodontol Res. 2018 Jun;53(3):306-314. doi: 10.1111/jre.12515. Epub 2017 Oct 31.

#### Synergistic effect of photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis.

Camacho-Alonso F<sup>1</sup>, Davia-Peña RS<sup>2</sup>, Vilaplana-Vivo C<sup>1</sup>, Tudela-Mulero MR<sup>1</sup>, Merino JJ<sup>3</sup>, Martínez-Beneyto Y<sup>4</sup>.

##### Author information

- 1 Department of Oral Surgery, University of Murcia, Murcia, Spain.
- 2 Private Dental Practice, Albacete, Spain.
- 3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.
- 4 Department of Preventive and Community Dentistry, University of Murcia, Murcia, Spain.

##### Abstract

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Photodynamic therapy (PDT) and antiresorptive drugs, such as alendronate (ALN), have been shown to reduce alveolar bone loss. The aim of this study was to evaluate the possible synergic effects of combining PDT and ALN on bone loss in periodontitis in rats.

**MATERIAL AND METHODS:** Periodontitis was induced by ligature in 60 Wistar rats randomized into the following groups: control (Group 1); PDT (Group 2); ALN 0.01 mg/kg (Group 3); ALN 0.25 mg/kg (Group 4); PDT + ALN 0.01 mg/kg (Group 5); and PDT + ALN 0.25 mg/kg (Group 6). The rats were killed on day 12 and the mandibles were processed for macroscopic morphometric analysis, micro-computed tomography to analyze bone mineral density (BMD) and histological analysis. Gingival samples were collected to evaluate myeloperoxidase (MPO) and malonaldehyde (MDA) levels.

**RESULTS:** Bone loss and inflammatory activity in histological studies, from the greatest to least was: control > ALN 0.01 mg/kg > PDT > ALN 0.25 mg/kg > PDT + ALN 0.01 mg/kg > PDT + ALN 0.25 mg/kg, while the order from least to greatest BMD was: control < ALN 0.01 mg/kg < PDT < ALN 0.25 mg/kg < PDT + ALN 0.01 mg/kg < PDT + ALN 0.25 mg/kg. The order of MPO and MDA activity from greatest to least was: control > ALN 0.01 mg/kg > PDT > ALN 0.25 mg/kg > PDT + ALN 0.01 mg/kg > PDT + ALN 0.25 mg/kg. The positive results obtained in the group treated with PDT + ALN 0.25 mg/kg showed statistically significant differences ( $P \leq .05$ ) compared with the other 5 groups for BMD, MPO and MDA.

**CONCLUSION:** Combined approach therapy of PDT + ALN 0.25 mg/kg demonstrated a protective effect on alveolar bone loss.

© 2017 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

**KEYWORDS:** alendronate; alveolar bone loss; experimental periodontitis; ligature-induced periodontitis; photodynamic therapy

PMID: 29086417 DOI: [10.1111/jre.12515](https://doi.org/10.1111/jre.12515)

[Indexed for MEDLINE]