

Citocinas pro-inflamatorias en la enfermedad periodontal experimental: Efecto del valsartán

Pro-inflammatory cytokines in experimental periodontal disease: Effect of valsartan

MARÍA GABRIELA MATOS, ANITA ISRAEL, ELODIE BILLET, MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO

RESUMEN

Las enfermedades periodontales son patologías que afectan al periodonto, es decir, a los tejidos que sostienen a los dientes, son patologías infecciosas, en la que se produce una destrucción que afecta a todos tejidos del periodonto: encía, el hueso alveolar, el cemento del diente y el ligamento periodontal. Esta destrucción es, además, irreversible. La respuesta inmune a los patógenos microbianos depende de componentes del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, que inducen excesiva producción de citocinas y contribuyen a la inflamación y a la resorción ósea. Existe un equilibrio entre las citocinas pro-inflamatorias y las anti-inflamatorias donde el patrón de citocinas expresadas localmente en el tejido periodontal y las células inflamatorias contribuyen a la fase destructiva de la progresión de la enfermedad. Se sabe que el sistema renina angiotensina está involucrado en la inflamación. Su efector, la angiotensina II (ANG II) ejerce acciones pro-inflamatorias. Con el fin de determinar el papel de la ANG II en la EP, se evaluó el efecto que ejerce sobre la respuesta inmunitaria innata inflamatoria el bloqueo del receptor AT_1 con valsartán, en un modelo de EP inducida por la administración de lipopolisacáridos (LPS) en la encía de la rata. Nuestros resultados demuestran que el valsartán, previene el incremento de los niveles de la proteína C reactiva (PCR) y de cuatro citocinas pro-inflamatorias: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α inducido por el LPS. Estos hallazgos sugieren un papel importante de la angiotensina II en la inflamación durante la EP y abre la posibilidad del uso del valsartán como una nueva alternativa terapéutica en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Palabras clave: Citocinas pro-inflamatorias, Periodontitis experimental, Angiotensina II, valsartán.

ABSTRACT

Periodontal disease (EP) is defined as a chronic pathology of infectious and inflammatory and destructive nature, which affects the tissues that support and surrounds the teeth: alveolar bone, tooth cement and periodontal ligament. This destruction is also irreversible. The immune response to microbial pathogens depends on both innate and adaptive components of the immune system, inducing excessive production of cytokines that contribute to inflammation and bone resorption. There is a balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines where the pattern of cytokines expressed locally in the periodontal tissue and inflammatory cells contribute to the state of the destructive phase of the disease progression. It is known that the renin-angiotensin system is involved in inflammation. Its effector, angiotensin II (ANG II) exerts pro-inflammatory actions. Thus we assessed whether blockade of AT_1 receptor with valsartan reduces inflammatory innate immune response in an experimental model of EP induced by lipopolysaccharide (LPS) administration into rat gingiva. Our results demonstrate that valsartan, prevented the increase in C-Reactive Protein (CRP) levels and four of the pro-inflammatory cytokines: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α induced by LPS. Our results support the role of ANG II during inflammation in periodontal disease and provides a new therapeutic option in the treatment of periodontal disease.

Key words: Pro-inflammatory cytokines, Experimental periodontitis. Angiotensin II, valsartán.

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

Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela. E-mail: Oficina: 0212-58-6052284

Introducción

La enfermedad periodontal (EP) es una infección caracterizada por una respuesta inflamatoria de los tejidos gingivales contra la microflora bacteriana patogénica que ha colonizado la zona. Su evolución lleva a la destrucción del tejido conectivo con pérdida progresiva de inserción epitelial, resorción de hueso alveolar y eventual pérdida de los dientes (Boter y Bedoya, 2010; Silva y col., 2015).

La colonización de los tejidos periodontales por especies bacterianas patógenas es el primer paso para el desarrollo de esta enfermedad. Este proceso destructivo se debe a la entrada de la bacteria o de sus productos bacterianos a los tejidos periodontales. En consecuencia, la destrucción periodontal deriva de productos bacterianos que causan directa o indirectamente daño en los mismos. Todos los tipos de enfermedad periodontal están asociados a la presencia de microorganismos patógenos en la placa subgingival, principalmente por especies Anaerobias Gram Negativas, que colonizan y proliferan en el tejido periodontal y a la susceptibilidad del hospedero. El resultado de esta interrelación, en el caso de la periodontitis, es la formación de un saco periodontal y una reacción inflamatoria del tejido mediada por células fagocíticas, plasmáticas, linfocitos T y B, las cuales podrían dañar estructuras del tejido conectivo y el hueso alveolar (Lindhe y Karring, 2000; Silva y col., 2015).

Las bacterias producen factores de virulencia como los lipopolisacáridos (LPS), que se unen al fibroblasto gingival, el cual juega un papel importante en el remodelado de los tejidos blandos periodontales. El fibroblasto estimulado por el LPS, actúa sobre la expresión de moléculas de adhesión celular en los tejidos gingivales, y de diversas citocinas, las cuales a su vez disparan las respuestas involucradas en los procesos inmunoinflamatorios (Wang y Ohura, 2002), los cuales contribuyen a la inflamación y a la resorción ósea *in vitro* (Amano y col., 1997) e *in vivo* (Orcel y col., 1993) y a su vez estos entran en contacto con las células del epitelio del surco que producen citocinas pro-inflamatorias.

El LPS estimula al eje monocito/linfocito y esto resulta en la secreción de sustancias mediadoras de la inflamación como las interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α , PGE2 (prostaglandina E2) y leucotrienos B4 (Dumitrescu, 2006; Graves, 2008). La EP que conduce a inflamación de la gingiva y destrucción de los tejidos periodontales involucra componentes tanto bacterianos como del hospedador. La respuesta inmune a los patógenos microbianos depende de componentes del sistema inmune tanto innato co-

mo adaptativo (Sarah y col., 2006). Esta respuesta inflamatoria del huésped en la infección periodontal libera los marcadores inflamatorios sistémicos que forman parte de los componentes del exudado inflamatorio proveniente desde la circulación hacia el surco de la encía, denominado líquido o fluido gingival crevicular (FGC).

En la EP, las citocinas además de ser mediadoras de la defensa en el FGC, también son un indicador de destrucción de los tejidos. Las citocinas son proteínas solubles que se unen a receptores específicos en células blanco e inician cascadas de señalización intracelulares que resultan en una alteración de la regulación de genes. Son efectivas a bajas concentraciones, son producidas transitoriamente en los tejidos y actúan primariamente en los tejidos donde son producidas. La citocinas son capaces de inducir su propia expresión de modo autocrino o paracrino y poseen efectos pleiotrópicos en un gran número de células. Las citocinas juegan un papel importante en la inflamación, incluyendo la EP (Castro y col., 2003; Silva y col., 2015; Ebersole y col., 2014).

La activación de la inmunidad innata es un requisito para el inicio de la inmunidad adaptativa, pero también puede conducir a la inflamación destructiva (crónica) si el daño original persiste. La importancia de las citocinas en la EP se hace evidente no solo porque actúan como iniciadores y reguladores de la respuesta innata y la inmunidad adaptativa, sino que ellas median también el daño tisular lo que conduce a una pérdida de función y enfermedad clínica, que a su vez ocasiona una síntesis y secreción inapropiada de citocinas con efectos concomitantes sobre la función y recambio de las células periodontales; más aún, muchas de las células no inmunes del periodonto como queratinocitos y fibroblastos, sintetizan citocinas en respuesta a bacterias y éstas influyen el recambio de componentes de la matriz extracelular y de las fibras del ligamento periodontal (Gaestel y col., 2009; Ebersole y col. 2014).

Por otra parte, se sabe que el sistema renina-angiotensina (SRA) es un mediador clave en los procesos inflamatorios (Saavedra y col., 2011). Efectivamente, se ha demostrado que la angiotensina II (ANG II), a través de su receptor AT₁, es capaz de iniciar una cascada inflamatoria mediada por la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Kim y col., 2011, 2012). Ahora bien, existe evidencia de la presencia de un sistema renina-angiotensina local a nivel de tejidos periodontales que podría estar involucrado en los procesos inflamatorios. Así, se ha demostrado la presencia de los componentes del SRA, especial-

mente la presencia de receptores de la ANG II en la pulpa dental (Souza y col., 2007), el tejido gingival y en cultivo de fibroblastos de diversas especies (Santos y col., 2009). Aún más, se ha descrito la presencia de todos los componentes del SRA en el tejido gingival de la rata, el cual es capaz de generar la ANG II y péptidos derivados (Santos y col., 2009). Estos autores, han descrito asimismo la expresión de los componentes de SRA en tejido gingival humano así como en los fibroblastos del ligamento periodontal (Santos y col., 2014).

Se desconoce hasta el presente el papel de la ANG II en los procesos inflamatorios implicados en la periodontitis. Por ello resulta de interés obtener un modelo experimental en animales que permitan el estudio de las manifestaciones y mecanismos involucrados en la patogénesis de la periodontitis. Efectivamente, los lipopolisacáridos (LPS), constituyentes de la pared celular de virtualmente todas las bacterias Gram negativas subgingivales (Wang y Quinn, 2010), constituye un estímulo potente en la iniciación de la respuesta inmune innata, induciendo inflamación y síntesis de citocinas pro-inflamatorias, osteo-teoclastogénesis y pérdida ósea alveolar (Vardar y col., 2004). Por ello, empleando el modelo experimental de periodontitis inducida por la administración de LPS en la encía de la rata, en el presente estudio se evaluaron los posibles cambios de los niveles salivares de citocinas pro-inflamatorias, así como el posible papel del sistema renina angiotensina local mediante el uso de un antagonista de los receptores AT₁ de la angiotensina II (valsartán).

Material y métodos

Se utilizaron ratas macho, de la cepa *Sprague-Dawley*, de 280-300 g de peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (UCV, Caracas), mantenidos bajo libre acceso al agua y comida (Ratarina[®]) hasta el momento del experimento. Los experimentos fueron realizados bajo la supervisión de la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV y de acuerdo al Código de bioética y bioseguridad sobre el manejo de animales de experimentación del Ministerio de Ciencias y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.

Inducción de la periodontitis

La periodontitis se indujo mediante inyecciones repetidas en el tejido gingival de la endotoxina de acuerdo al método de Ramamurthy y col. (1985). La inflamación periodontal fue inducida 24 horas antes del inicio del tratamiento con el antagonista de los receptores AT₁ (valsartán) (VAL). Las ratas fueron

anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/kg) e inyectadas directamente en la encía vestibular entre el primer y segundo molar con 10 µL (1 mg/mL) de LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*), purificado cromatográficamente (Sigma, St. Louis, MO), cada dos días para un total de 4 inyecciones en un período de 7 días de tratamiento. Las ratas fueron distribuidas en los siguientes grupos: (1) CONTROL, (2) LPS, (3) VALSARTÁN (VAL), (4) LPS+VAL (L+V). EL VAL fue administrado vía oral (10mg/Kg). Para la determinación de proteína C reactiva (PCR) y las citocinas se recolectó saliva, para lo cual las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/Kg) y utilizando una micropipeta se recolectó un aproximado de 500µL de saliva a los 7 días de tratamiento, ésta fue congelada a -20°C hasta el momento en que se realizaron los ensayos.

Determinación de la proteína C reactiva

Se realizó la determinación de PCR mediante el uso de un estuche comercial (DRG[®] C-Reactive Protein (CRP) ELISA (EIA-1952) el cual está basado en una tira de microtitulación revestida con anticuerpo anti-PCR que se incubó con suero diluido estándar y las muestras de saliva. Durante esta etapa de incubación la PCR se une específicamente a los pocillos. Después de la eliminación de las proteínas no fijadas de saliva por un procedimiento de lavado, el complejo antígeno-anticuerpo en cada pocillo se detecta con anticuerpos conjugados con peroxidasa. Después de separar el conjugado no unido, las tiras se incubaron con una solución cromógena que contiene tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno formando un color azul. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 0,5 M y los valores de absorbancia se determinaron a 450 nm. La curva estándar se obtuvo representando los valores de absorbancia frente a los valores referenciales correspondientes. La concentración de PCR en muestras se determinó por interpolación a partir de la curva estándar, y se expresó en µg/mL.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

Las muestras de saliva se evaluaron por duplicado mediante el análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex Pro Assays Cytokine, Chemokine and Growth Factors, Life Science Group, BIORAD). Brevemente, el sistema Bio-Plex[®] se basa en tres núcleos tecnológicos. El primero constituye una tecnología novedosa que emplea hasta 100 microesferas de poliestireno (5,6µm) o magnéticas (8µm), teñidas fluorescentemente y codificadas con un código espectral (Tecnología xMAP), con detección simultánea de hasta 100 moléculas diferentes por muestra. El segundo es

un citómetro de flujo con dos rayos láser asociados a un sistema óptico que permite cuantificar las diferentes moléculas unidas a la superficie de las microesferas. El tercero está constituido por un procesador de señal digital de alta velocidad que maneja los datos de fluorescencia con alta eficiencia. Esta técnica nos permitió estudiar en forma simultánea las concentraciones salivares de las interleucinas (IL)-1 alfa/beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL13, IL-15, IL-17, de las citocinas: eotaxina, factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-gamma (INF- γ), proteína 10 inducible por IFN- γ /quimioquina 10 motivo C X C (IP-10/CXCL10), proteína quimiotáctica de monocitos tipo-1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa/beta (MIP-1a/b), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), ligando 5 de motivo C/ proteína expresada y secretada en células T normales reguladas en la activación (CCL5/RANTES), factor de necrosis tumoral - alfa (TNF- α) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Análisis estadístico

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

Resultados

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA

En la figura 1 se observa que la inyección en la encía de LPS incrementó significativamente los niveles PCR en la saliva. El tratamiento con valsartán durante 7 días previno el incremento de PCR salival inducido por LPS.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS

Al evaluar las citocinas pro-inflamatorias se observó que se pudieron detectar niveles basales de las citocinas pro-inflamatorias, pero solo las IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α mostraron niveles significativamente elevados en los animales tratados con LPS. El tratamiento con valsartán durante 7 días previno el incremento de dichas citocinas pro-inflamatoria salival inducido por LPS (figura 2 y 3).

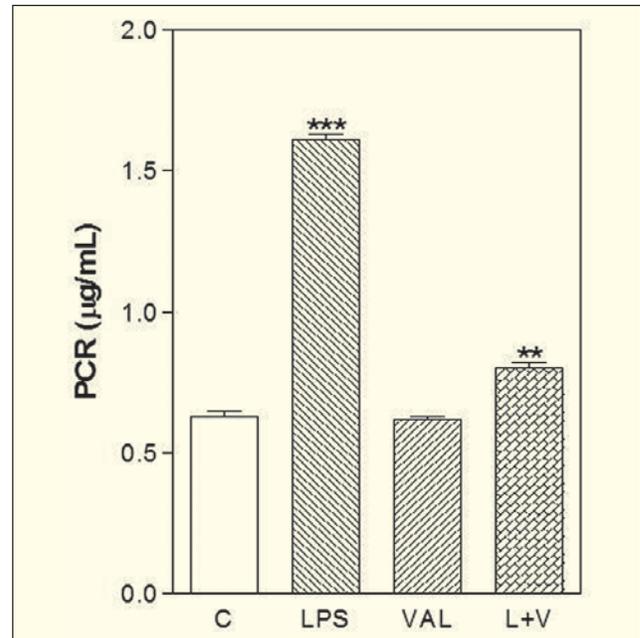


Figura 1. Determinación de la concentración de la PCR en la saliva de ratas tratadas durante 7 días con valsartán. Cada barra representa la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control. ** $p < 0,01$ respecto al grupo VAL.

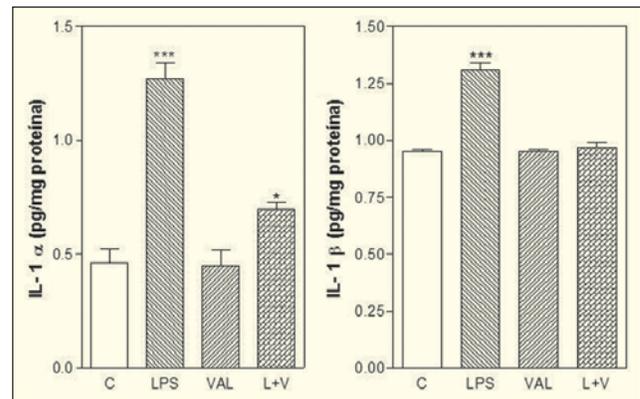


Figura 2. Concentración de IL-1 α y IL-1 β en saliva de rata tratada con valsartán durante 7 días. Cada barra representa la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control. * $p < 0,05$ respecto al grupo VAL.

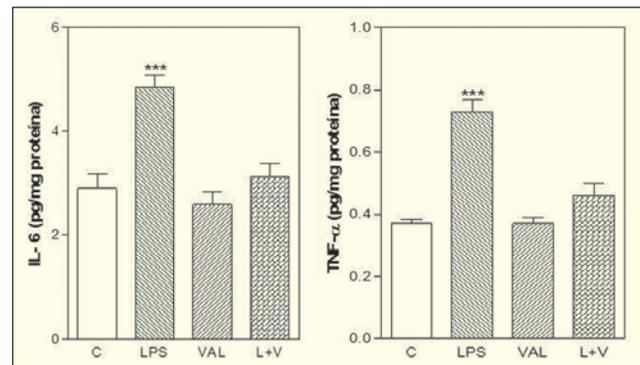


Figura 3. Concentración de IL-6 y TNF- α en saliva de rata tratada con valsartán durante 7 días. Cada barra representa la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

Discusión

La respuesta de fase aguda es un proceso no específico que ocurre en la respuesta inicial del hospedero ante un daño tisular, infecciones, necrosis o malignidad. Es iniciada por la activación de macrófagos locales, fibroblastos o células endoteliales llevando a la liberación de diversos mediadores (Qvarnstrom y col., 2010). Cuando la respuesta inflamatoria aguda es insuficiente, estos mediadores estimulan a los hepatocitos a segregar proteínas de fase aguda tales como la PCR durante el proceso de respuesta inflamatoria crónica sistémica no específica (Medzhitov y col., 2007). La PCR es sintetizada primariamente en el hígado y es uno de los marcadores de elección para monitorear esta respuesta, la PCR contribuye a la respuesta no específica en la mayoría de las formas de inflamación, infección y daño tisular (Pepys y Hirschfield, 2003; Podzimek y col., 2015).

Sin embargo, estudios recientes han subrayado la capacidad del tejido periodontal inflamado en la síntesis de PCR. Así, se ha demostrado la presencia de la proteína, así como la expresión de su ARNm en tejidos gingivales tanto de pacientes con periodontitis como en sujetos sanos (Lu y Jin, 2010). Adicionalmente, la expresión génica de la PCR está significativamente incrementada en la periodontitis comparada con la gingivitis (Maekawa y col., 2011).

Existe evidencia de estudios transversales, que la PCR plasmática está elevada en pacientes con periodontitis comparados con el grupo control (Paraskevas y cols., 2008; Bansal y col., 2014), así como en el suero y FGC (Haba y col., 2011). Efectivamente, Linden y col. (2008) reportaron una asociación entre los niveles de PCR y la periodontitis en el grupo de pacientes europeos entre los 60-70 años de edad, así como entre los niveles de PCR y la pérdida dental en la población estudiada.

Asimismo, Goyal y col. (2014) y Podzimek y col. (2015), encontraron un incremento en los niveles de PCR subsecuente a la severidad de la enfermedad periodontal, con los niveles menores en recesiones gingivales, incrementando en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica, con los niveles máximos en pacientes con periodontitis agresiva. Así, los valores de la PCR incrementan con la del daño o discapacidad del periodonto.

Se ha reportado una alteración de los niveles de la PCR en la saliva de los pacientes con EP en comparación con los controles. Se ha demostrado que los niveles salivares de PCR son significativamente mayores en pacientes con periodontitis en comparación con los pacientes desdentados totales (Christodoulides y col., 2005). Aún más, se han reportado

niveles de PCR 18,2 veces mayores en la saliva de los pacientes con EP en comparación con los de pacientes dentados sanos (Christodoulides y col., 2007). Por el contrario, un estudio con número limitado de pacientes informó que los niveles de PCR son más bajos durante la periodontitis crónica en comparación con los controles sanos (Aurer y col., 2005). Aunque los datos son controversiales, la opinión mayoritaria indica que los niveles de PCR parecen ser elevados en pacientes con periodontitis. Nuestros resultados, en un modelo experimental en rata, apuntan a esta posibilidad ya que demuestran claramente un incremento significativo de los niveles de PCR en la saliva de las ratas a las que se les indujo la EP con LPS, el cual resulta ser similar a los reportados en pacientes con periodontitis. Los cambios en estos valores, tanto en sentido ascendente como descendente, pueden llevar a un monitoreo eficiente del tratamiento de la enfermedad periodontal.

La periodontitis es una enfermedad multifactorial que resulta de la interacción de bacterias patógenas con los mecanismos de respuesta inmune del huésped, y que se caracteriza por una reacción inflamatoria sostenida caracterizada por la infiltración de los tejidos de neutrófilos, macrófagos y linfocitos y la generación de altas concentraciones locales de citocinas, que afecta el aparato de inserción del diente. Las variaciones de la respuesta inmune a la infección producida por las bacterias periodonto patógenas influyen, de forma directa, la susceptibilidad del huésped a esta patología.

Las citocinas estimulan el reclutamiento de células inflamatorias; son producidas por un amplio espectro de células residentes del periodonto, como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, osteoclastos, células epiteliales, leucocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos y mastocitos (Graves, 2008; Ebersole y col., 2014).

El resultado neto de la expresión de citocinas en el tejido, genera un escenario local específico que orquesta las respuestas inmunes, tanto celular como humoral necesaria para el control de los comensales orales y los patógenos (Manolagas y Jilka, 1995; Ebersole y col., 2014; Silva y col., 2015). No hay duda que el patrón de citocinas expresadas localmente en el tejido periodontal y las células inflamatorias contribuyen al estado o a la fase destructiva de la progresión de la enfermedad (Teng, 2006a,b; Ebersole y col., 2014; Silva y col., 2015).

Nuestros resultados demuestran un incremento significativo de al menos cuatro de las citocinas pro-inflamatorias, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , en la saliva de rata con enfermedad periodontal experimental, que se asocia con la pérdida de volumen óseo mandibular en la rata (Matos y col., 2014 y 2015).

Citocinas tales como TNF e IL-1 promueven la extravasación de leucocitos y contribuyen substancialmente a la pérdida ósea patológica que ocurre en la enfermedad periodontal (Graves y col., 2011). Ambas citocinas pueden asimismo regular hacia arriba la síntesis de Metaloproteinasas en diversos tipos celulares, las cuales a su vez contribuyen a la degradación de la matriz extracelular (Kusano y col., 1998). Adicionalmente, la IL-1 estimula la osteoclastogénesis y la resorción ósea mediante la regulación hacia arriba de RANK y RANKL, mientras que el TNF estimula la osteoclastogénesis a través de RANKL (Silva y col., 2015)

En apoyo a nuestros hallazgos, se ha demostrado niveles incrementados de IL-1 en muestras de biopsias gingivales y en FGC de pacientes con periodontitis, demostrándose una correlación entre estos niveles con parámetros de la enfermedad periodontal tales como movilidad dental, sangramiento, bolsa periodontal e índices de higiene (Chaudhari y col., 2011), así como una disminución en su concentración después de tratamiento (Wilton y col., 1992). Aun más, las concentraciones de IL-1 β en el FGC y la saliva en pacientes se encuentran elevados en los pacientes con EP comparados con pacientes sanos (Castro y col., 2003; Miller y col., 2006).

La IL-1 β es una molécula diana de la fase inflamatoria de la EP. Así, se ha reportado que pacientes con EP muestran porcentajes importantes de sitios positivos, para IL-1 α (56%) y para IL-1 β (87%). De las dos isoformas la IL-1 β es más potente en la estimulación de la resorción ósea y es la forma más frecuente en la periodontitis (Castro y col., 2003). En el periodonto, la IL-1 β puede ser sintetizada y secretada por células de tejido conectivo (fibroblastos y células endoteliales), o por los leucocitos infiltrantes (Castro y col., 2003). En estudios clínicos, niveles de IL-1 β mayores se han asociado con la inflamación gingival, la gravedad de la enfermedad periodontal y una falta de eficacia terapéutica (Figueredo y col., 1999).

Ebersole y col. (2014), en un estudio sobre el análisis transcripcional de citocinas en un modelo de periodontitis progresiva mediante ligadura en primates no humanos, reportan una sobre expresión de IL-1 β e IL-6 durante la fase aguda de la enfermedad.

La IL-6 es una citocina pleiotrópica que puede ser secretada por distintas células, que es producida por células T y B, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos en respuesta a la infección, el estrés y la neoplasia. También se libera en respuesta a IL-1 y TNF- α (Carrillo y col., 2006). La actividad biológica de la IL-6 es muy diversa: diferenciación de células B a células plasmáticas, activa-

ción de células T, liberación de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos y activación de la cascada del complemento (Revel y col., 1989). De particular importancia es la habilidad de la IL-6 para inducir resorción ósea, tanto de forma aislada como sinérgicamente con la IL-1 β (Ishimi y col., 1990). Esta resorción ósea probablemente sea debida a una estimulación y diferenciación por parte de la IL-6 sobre los precursores de los osteoclastos (Irwin y col., 1998). La IL-6 es útil en periodoncia como herramienta diagnóstica. Se ha medido su concentración en el FGC, en sangre periférica y en tejido gingival para determinar la progresión de la enfermedad, encontrándose que la IL-6 es indicador de pérdida de inserción incipiente y de actividad de la enfermedad (Gemmell y col., 1997).

La influencia de la IL-6 en la enfermedad periodontal ha sido ampliamente documentada. Reinhardt y col. (1993) encontraron niveles de IL-6 significativamente mayores en fluido gingival crevicular en pacientes con periodontitis refractaria que en sujetos estables. Lee y col. (1995) reportan niveles significativamente mayores de IL-6 en FGC en localizaciones activas que inactivas, tanto basales como a los 3 meses. Geivelis y col. (1993) observaron una correlación positiva entre sangrado gingival e IL-6, y entre profundidad de sondaje e IL-6 en pacientes con periodontitis, igualmente se han descrito incrementos en la IL-6 en suero de pacientes con periodontitis agresiva generalizada (Robati y col., 2011). Por el contrario, Bozkurt y col. (2000) no encontraron una correlación significativa entre parámetros periodontales y los niveles de IL-6 en FGC en pacientes con periodontitis del adulto. Estos hallazgos pueden significar que la producción local de mediadores inflamatorios varía de una región a otra y de paciente a paciente, y que los niveles de los mediadores inflamatorios en pacientes periodontales pueden verse influenciado por diversos factores como la composición bacteriana local (Reinhardt y col., 1993).

La superfamilia del TNF está formada por 20 proteínas o ligandos, entre los que se incluye TNF- α , cuya acción principal se desarrolla en el sistema inmune, modulando tanto la inmunidad innata como adquirida (Locksley y col., 2001). Su principal función es el reclutamiento y estimulación de neutrófilos y monocitos, junto con la inducción y regulación de mediadores de la inflamación, ya que desempeña un papel importante en la protección frente a la infección bacteriana (Gamble y col., 1985). El TNF- α es una citocina pro-inflamatoria e inmunomoduladora producida por un amplio espectro de células como monocitos, macrófagos, linfocitos B y T, células NK, así como células no pertenecientes al sistema

inmune como fibroblastos y queratinocitos. Su incremento ha sido detectado en sitios localizados de pacientes con periodontitis, y está asociado a la destrucción y resorción ósea (Page y col., 2000). Es así como se han reportado incrementos de TNF- α en el FGC y en el suero de pacientes con periodontitis cuando fueron comparados con controles sanos, asociados con la carga bacteriana de la placa dental (Andrukhov y col., 2011). De modo similar, Ertugrul y col. (2012) comparan los niveles de la IL-1 y del TNF- α en pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada cuando fueron comparados con pacientes sanos, encontrando niveles progresivamente incrementados según la progresión de la enfermedad.

Para Graves y Cochran (2003) y Graves y col. (2011), la mayor parte del daño que ocurre durante la destrucción del tejido periodontal puede ser atribuido a la actividad de la IL-1 y el TNF- α . Esto se basa en estudios que se han realizado en donde se observó que el uso de antagonistas de la IL-1 y el TNF- α en periodontitis experimental demuestra una relación causa-efecto entre la actividad de estas citocinas y la extensión de la inflamación hacia las áreas más profundas en el tejido conectivo, pérdida de inserción de tejido conectivo, formación de osteoclastos y pérdida ósea. A su vez, ambas citocinas incrementan la expresión de IL-6 en fibroblastos humanos (Souza y col., 2012).

Se ha establecido la secuencia de eventos pro-inflamatorios en el periodonto, iniciándose con productos bacterianos tales como los LPS los cuales inducen la expresión de la IL-1 β y el TNF- α , que a su vez estimulan la producción de citocinas, quimiocinas y productos de la ciclooxigenasa que amplifican la inflamación. Subsecuentemente se inducen las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que rompen el tejido conectivo y se inicia la resorción ósea resultando en destrucción del hueso alveolar conforme el frente inflamatorio se profundiza en el tejido (Preshaw y Taylor, 2011). Efectivamente, se ha reportado que el uso de LPS de origen bacteriano como modelo experimental de inducción de periodontitis se encuentra asociado a la pérdida de volumen óseo mandibular en la rata (Cheng y col., 2010). Así, Matos y col. (2014 y 2015) demostraron un incremento en la pérdida de hueso alveolar y del tejido conectivo, debido a un incremento de la osteoclastogénesis en el área donde se indujo la enfermedad periodontal. Aunado a ello se demostró, mediante el examen histológico de las mandíbulas de las ratas, una disminución de las tinciones de Von Kossa y Tricrómico de Masson, como índices de reducción de los depósitos de calcio y del colágeno, respectivamente. Estos

cambios histológicos estuvieron asociados a un incremento de la movilidad dentaria producto de la pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar, que involucra una serie de cambios en los tejidos de soporte caracterizados por la activa remodelación del tejido periodontal y óseo adyacente a la pieza dentaria, que permiten el desplazamiento de los dientes a través del proceso alveolar. La remodelación de este componente tisular es llevada a cabo por osteoclastos (Droghetti y col., 2010). Resultados similares han sido descritos en estudios histológicos realizados en conejos bajo diferentes modelos de inducción de la enfermedad periodontal (ligadura, inyecciones con *P. gingivalis*, ligadura + inyecciones con *P. gingivalis*), donde se observaron incrementos en el número de osteoclastos (Hasturk y col., 2006), o en modelos en rata mediante inyecciones con LPS (Kirkwood y col., 2007).

Actualmente, se reconoce que la ANG II está involucrada en eventos claves del proceso inflamatorio (Suzuki y col., 2003b). En efecto, se ha establecido un efecto anti-inflamatorio de los bloqueantes de receptores de la ANG II en la vasculatura tanto periférica (Benicky y col., 2009), como central (Hiromichi y col., 2004), y en patologías inducidas por el estrés como las úlceras gástricas (Bregonzio y col., 2003). Este efecto anti-inflamatorio de los antagonistas del receptor AT₁, ha sido igualmente demostrado en la inducción de la inflamación por LPS en tejidos ricos en macrófagos tales como el bazo, la glándula suprarrenal y la hipófisis (Sánchez-Lemus, 2008, 2009a, 2009b), en cerebro (Benicky y col., 2009) y en monocitos humanos (Larrayoz y col., 2009).

Existen numerosos reportes en la literatura que implican a la ANG II en patologías que cursan con un bajo grado de inflamación sistémica tales como síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2, encontrándose niveles elevados de IL-6, MCP-1 y PCR en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con y sin complicaciones, los cuales disminuyen significativamente tras el tratamiento con candesartán, un bloqueante del receptor AT₁ de la ANG II (Pavlatou y col., 2011).

Asimismo, Shishido y col. (2011), reportan que la administración del valsartán redujo el incremento de niveles crónicos de inflamación en pacientes con síndrome metabólico, con o sin diabetes mellitus, disminuyendo los valores de PCR y de microalbuminuria, indicando que las propiedades anti-inflamatorias del valsartán pueden ser beneficiosas en estas patologías. De modo similar, estados de inflamación crónicos subyacen en patologías como la hipertensión y la aterosclerosis presenta niveles circulantes elevados de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-6 y PCR. Estudios realizados administrando valsartán a este tipo de pacientes, condujo a una

reducción en los niveles de TNF- α e IL-6, sin cambios en la PCR (Manabe y col., 2005).

Nakamura y col. (2011), demostraron mediante inmunohistoquímica, que células inflamatorias y células similares a fibroblastos de tejido gingival humano inflamado fueron positivas para el receptor AT₁ en oposición a lo encontrado en tejido gingival sano. Igualmente al estudiar la expresión del ARNm y del receptor AT₁, así como los niveles de la IL-6, en cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con IL-1 β , se reportó un incremento en el nivel de los tres parámetros estudiados, que fue abolido silenciando el gen para el receptor AT₁, sugiriendo un papel de la ANG II en la regulación de la producción de IL-6 inducida por la IL-1 en los procesos inflamatorios gingivales (Nakamura y col., 2011).

Consistente con los reportes de Santos y col. (2009 y 2015) sobre la existencia de un sistema renina-angiotensina funcional en el tejido gingival de la rata y humanos, nuestros resultados, en los que se demuestra que el tratamiento con el bloqueante de los receptores AT₁ de la angiotensina II, el valsartán, previene de modo significativo la pérdida de tejido conectivo y la resorción del hueso alveolar (Matos y col., 2014 y 2015), así como incrementos en los niveles de la PCR, las citocinas pro-inflamatorias y signos generales de inflamación en ratas a las que se les indujo la periodontitis mediante la inyección de LPS, confirman y extienden la importancia de este hallazgo y sugieren que la respuesta del hospedador en la periodontitis puede ser modificada por la administración de un bloqueante selectivo de los receptores AT₁ de la angiotensina II.

Nuestros resultados se ven confirmados por reportes sobre los efectos del telmisartán, otro bloqueante de los receptores AT₁ sobre los niveles, en un modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratas, de IL-1 β y TNF. El telmisartán redujo, de modo dependiente de la dosis, la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y pérdida ósea en dicho modelo (Araújo y col., 2013).

Los mecanismos involucrados en la interacción entre el SRA y producción de la liberación local de citocinas pro-inflamatorias son multifactoriales. Existe evidencia que indica que la ANG II podría regular la activación del sistema inmune mediante mecanismos que involucran una regulación del receptor similar a Toll 4 (TLR4). Efectivamente, se ha demostrado que la ANG II induce la expresión de TLR4 en líneas de células de macrófagos murinos (RAW264.7) (Ji y col., 2009), en células mesoteliales de peritoneo en ratas (Wu y col., 2009), cultivos de células tubulares proximales murinas, células mesangiales en murinos, y podocitos murinos (Bondeva y col., 2007).

Igualmente, Wolf y col. (2006) demostraron en células mesangiales de ratones tratadas con ANG II, una regulación hacia arriba del ARNm y de la proteína del TLR4, mediado por el receptor AT₁. Del mismo modo, la pre-incubación de las células con ANG II, incrementó la activación del NF- κ B inducida por el LPS y la expresión de citocinas.

La participación del SRA en los procesos inflamatorios mediados por toxinas bacterianas y su relación con los receptores similares a Toll en la periodontitis se ven avalados por los hallazgos de Matos y col. (2014) en los que se demuestra mediante inmunofluorescencia, la presencia de receptores TLR4 en la encía de la rata y cuya expresión fue incrementada por el LPS. Este efecto fue completamente prevenido al bloquear el receptor AT₁, mediante el tratamiento con valsartán. Resultados similares fueron reportados por Benicky y col. (2009) quienes demuestran que el candesartán reduce los niveles y el ARNm de los receptores TLR2 y TLR4, reduce la activación de NF- κ B dependiente p65 con la concomitante reducción de la producción de mediadores inflamatorios. Estos hallazgos apoyan el concepto que el bloqueo del receptor AT₁ claramente limita la respuesta inmune innata frente a la administración de endotoxinas.

Nuestros resultados abren nuevas aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad periodontal y sugieren que los bloqueantes de los receptores AT₁ de la ANG II son candidatos firmes para entrar dentro del grupo terapéutico, no solo como antihipertensivos, sino como moduladores de la inflamación.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por Misión Ciencia (FONACIT-MPPCT) No. 2007001585 y CDCH PI-06-7368-2008-1 y CDCH PG-007349-2001 etapas 1 y 2.

Referencias bibliográficas

- Amano S, Kawakami K, Iwahashi H, Kitano S, Hanazawa S. 1997. Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. *J Cell Physiol* 173: 301-309.
- Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen P, Matejka M, Rausch-Fan X. 2011. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 82(6): 885-892.
- Araújo A, Souza T, Moura L, Brito G, Aragão K, Araújo L, Medeiros C, Alves M, Araújo R. 2013. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol*. 40(12): 1104-111.

- Aurer A, Jorgic-Srdjak K, Plancak D, Stavljenic-Rukavina A, Aurer-Kozelj J. 2005. Pro-inflammatory factors in saliva as possible markers for periodontal disease. *Coll Antropol* 29(2): 435-439.
- Bansal T, Pandey A, Deepa D, Asthana AK. 2014. C-reactive protein (CRP) and its association with periodontal disease: a brief review. *J Clinical Diag Res* 8: E21-E24.
- Benicky J, Sánchez-Lemus E, Pavel J, Saavedra JM. 2009. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. *Cell Mol Neurobiol* 29(6-7): 781-792.
- Bondeva T, Roger T, Wolf G. 2007. Differential regulation of Toll-like receptor 4 gene expression in renal cells by angiotensin II: dependency on AP1 and PU.1 transcriptional sites. *Am J Nephrol* 27(3): 308-14.
- Botero JE, Bedoya E. 2010. Determinantes del diagnóstico periodontal. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* Vol 3(2): 94-99.
- Bozkurt F, Berker E, Akkus S, Bulut S. 2000. Relationship between IL-6 levels in gingival crevicular fluid and periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. *J Periodontol* 71: 1756-1760.
- Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. 2003. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(2):G414-423.
- Carrillo A, García A, Bascones A. 2006. Papel de la IL-6 y TNF- α en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol* 2: 83-89.
- Castro C, Koss M, López M. 2003. Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal. *Med Oral* 8: 322-328.
- Chaudhari A, Byakod G, Waghmare P, Karhadkar V. 2011. Correlation of levels of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 12(1): 52-59.
- Cheng W, Huang R, Chiang C, Chen J, Liu C, Chu C, Fu E. 2010. Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 45(6): 788-795.
- Christodoulides N, Floriano P, Miller C, Ebersole J, Mohanty S, Dharshan P, Griffin M, Lennart A, Ballard KL, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV, McDevitt JT. 2007. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann NY Acad Sci* 1098: 411-428.
- Christodoulides N, Mohanty S, Miller C, Langub M, Floriano P, Dharshan P, Ali MF, Bernard B, Romanovicz D, Anslyn E, Fox PC, McDevitt JT. 2005. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* 5(3): 261-269.
- Droghetti P, Cruzat F, Smith Ferrer P, Oyarzún Droguett A. 2010. Role of MT1-MMP in the Remodeling of the Periodontal Ligament During Tooth Movement. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil Oral* 3(3): 113-117.
- Dumitrescu A. 2006. Histological comparison of periodontal inflammatory changes in two models of experimental periodontitis in the rat. A pilot study. *TIMISORA Med J* 56: 211-217.
- Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, González-Martínez J, Burgos A, González OA. 2014. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol* 41(9): 853-86.
- Ertugrul A, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. 2012. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01500.x.
- Figueredo C, Ribeiro M, Fischer R, Gustafsson A. 1999. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 70: 1457-1463.
- Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. 2009. Targeting innate immunity protein kinase signaling in inflammation. *Nature* 8: 480-499.
- Gamble J, Harlan J, Klebanoff S, Vadas M. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci* 82: 8667-8671.
- Geivelis M, Turner C, Pederson E, Lamberts B. 1993. Measurements of IL-6 in gingival crevicular fluid from patients with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 64: 980-983.
- Gemmell E, Marshall R, Seymour G. 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 14: 112-143.
- Graves D, Cochran D. 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 74(3): 391-401.
- Graves D. 2008. Cytoquines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79: 1585-1591.
- Graves D, Oates T, Garlet G. 2011. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 17: 3.
- Goyal L, Bey A, Gupta ND, Sharma VK. 2014. Comparative evaluation of serum C-reactive protein levels in chronic and aggressive periodontitis patients and association with periodontal disease severity. *Contemporary Clinical Dentistry* 5: 484-488.
- Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN, Van Dyke TE. 2006. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 20(2):401-403.
- Hiromichi A, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra JM. 2004. Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35: 1726-1731.
- Irwin C, Myrillas T. 1998. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 4: 43-47.
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin C, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, et.al. 1990. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunology* 145:3297-3303.
- Ji Y, Wang Z, Liu J, Liu N. 2009. Inhibitory effect of fenofibrate on angiotensin II-induced toll-like receptor 4 expression, myeloperoxidase activity and expression in RAW264.7 cells. *Yao Xue Xue Bao* 44(5): 462-467.

- Kim J, Heo H, Ha Y, Ye B, Lee E, Choi Y, Yu BP, Chung HY. 2012. Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- κ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)* 34(1): 11-25.
- Kim J, Uehara Y, Choi Y, Ha Y, Ye B, Yu B, Chung HY. 2011. Mechanism of attenuation of pro-inflammatory Ang II-induced NF- κ B activation by genistein in the kidneys of male rats during aging. *Biogerontology* 12(6): 537-550.
- Kirkwood K, Li F, Rogers J, Otremba J, Coatney D, Kreider JM, D'Silva NJ, Chakravarty S, Dugar S, Higgins LS, Protter AA, Medicherla S. 2007. p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 320(1):56-63.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. 1998. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, 3, 9 and 13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139: 1338-1345.
- Larrayoz I, Pang T, Benicky J, Pavel J, Sánchez-Lemus E, Saavedra JM. 2009. Candesartan reduces the innate immune response to lipopolysaccharide in human monocytes. *J Hypertens* 27(12): 2365-2376.
- Lee H, Kang I, Chung C, Choi S. 1995. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 22: 885-890.
- Linden G, McClean K, Young I, Evans A, Kee F. 2008. Persistently raised C-reactive protein levels are associated with advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 35(9): 741-747.
- Lindhe J y Karring T. 2000. Anatomía del periodonto. En: Lindhe J. editor. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 3era Edición. 19-68.
- Locksley R, Killeen N, Lenardo M. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-491.
- Lu Q y Jin L. 2010. Human gingiva is another site of C-reactive protein formation. *J Clin Periodontol* 37(9): 789-796.
- Maekawa T, Tabeta K, Kajita-Okui K, Nakajima T, Yamazaki K. 2011. Increased expression of C-reactive protein gene in inflamed gingival tissues could be derived from endothelial cells stimulated with interleukin-6. *Arch Oral Biol* 56(11): 1312-1318.
- Manabe S, Okura T, Watanabe S, Fukuoka T, Higaki J. 2005. Effects of angiotensin II receptor blockade with valsartan on pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 46(6): 735-739.
- Manolagas S y Jilka B. 1995. Bone Marrow, cytokines and bone remodelling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332 (5): 305-311.
- Matos María G, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido MR. 2015. Papel del receptor AT₁ de la angiotensina II en la remodelación ósea que ocurre durante la enfermedad periodontal experimental en la rata. *Rev Fac Farmacia* 78 (1-2): 84-93.
- Matos MG, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido MR. 2014. El valsartan previene la resorción ósea en la periodontitis experimental. *Rev Periodon Osteointegración* 4(4): 289-295.
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164): 819-826.
- Miller C, King C, Langub M, Kryscio R, Thomas M. 2006. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 137(3): 322-329.
- Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. 2011. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1 β -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts *Eur J Oral Sci* 119(5): 345-351.
- Orcel P, Feuga M, Bielakoff J, De Vernejoul M. 1993. Local bone injections of LPS and M-CSF increase bone resorption by different pathways in vivo in rats. *Am J Physiol* 264: E391-E397.
- Page R, Offenbacher S, Schroeder H. 2000. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 14: 216-248.
- Paraskevas S, Huizinga J, Loos B. 2008. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 35(4): 277-290.
- Pavlatou M, Mastorakos G, Margeli A, Kouskouni E, Tentolouris N, Katsilambros N, Chrousos GP, Papanotiou I. 2011. Angiotensin blockade in diabetic patients decreases insulin resistance-associated low-grade inflammation. *Eur J Clin Invest* 41(6): 652-658.
- Pepys M, Hirschfield G. 2003. C reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111(12): 1805-1812.
- Podzimek S, Mysak J, Janatova T, Duskova J. 2015. C-Reactive Protein in Peripheral Blood of Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis, Gingivitis, and Gingival Recessions. *Mediators Inflamm* 2015: 564858.
- Preshaw P, Taylor J. 2011. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 60-84.
- Qvarnstrom M, Janket S, Jones J, Jethwani K, Nuutinen P, García RI, Baird AE, Van Dyke TE, Meurman JH. 2010. Association of salivary lysozyme and C-reactive protein with metabolic syndrome. *J Clin Periodontol* 37(9): 805-811.
- Ramamurthy N, Greenwald R, Schneir M, Golub L. 1985. The effect of alloxan diabetes on prolyl and lysyl hydroxylase activity in uninflamed and inflamed rat gingiva. *Arch Oral Biol* 30: 679-683.
- Reinhardt R, Masada M, Kaldahl W, DuBois L, Kornman K, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. 1993. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 20(3):225-231.
- Revel M. 1989. Host defense against infections and inflammations: role of the multifunctional IL-6/IFN- β 2 cytokine. *Experientia* 45: 549-557.
- Robati M, Ranjbari A, Ghafourian Boroujerdnia M, Chinipardaz Z, Irán J. 2011. Detection of IL-4, IL-6 and IL-12 serum levels in generalized aggressive periodontitis. *Immunol* 8(3): 170-175.
- Saavedra JM, Sánchez-Lemus E, Benicky J. 2011. Blockade of brain angiotensin II AT₁ receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinol* 36(1): 1-18.

- Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Larrayoz I, Zhou J, Balianova M, Nishioku T, Saavedra JM. 2009a. Angiotensin II AT1 blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5):R1376-R1384.
- Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Saavedra JM. 2009b. In vivo Angiotensin II AT1 receptor blockade selectively inhibits LPS-induced innate immune response and ACTH release in rat pituitary gland. *Brain Behav Immun* 23(7): 945-957.
- Sánchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz-Roldán I, Moughamian A, Pavel J, Nishioku T, Saavedra JM. 2008. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 149(10): 5177-5188.
- Santos C, Akashi E, Dionisio T, Sipert C, Didier D, Greene AS, Oliveira SH, Pereira HJ, Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. 2009. Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol* 80: 130-139.
- Santos CF, Morandini AC, Dionisio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, Colombini-Ishikiriama BL, Sipert CR, Maciel RP, Akashi AP, Souza GP, Garlet GP, Rodini CO, Amaral SL, Becari C, Salgado MC, Oliveira EB, Matus I, Didier DN, Greene AS. 2015. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One*. 10(8): e0134601.
- Sarah S, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresch R. 2006. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. *Ind J Dent Res* 17(3): 114-116.
- Shishido T, Konta T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Takasaki S, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y. 2011. Suppressive effects of valsartan on microalbuminuria and CRP in patients with metabolic syndrome (Val-Mets). *Clin Exp Hypertens* 33(2):117-125.
- Silva N, Abusleme L, Bravo B, Dutzan N, García-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. 2015. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci* 23(3): 329-355.
- Souza P, Fukada S, Cunha F, Costa C, Costa C. 2007. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Reg Peptides* 140: 27-31.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J 2003b. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35(6): 881-900.
- Teng Y. 2006a. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1-Innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res* 85(3): 198-208.
- Teng Y. 2006b. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 2-T cell-mediated immunity in the periodontium. *J Dent Res* 85 (3): 209-219.
- Vardar S, Buduneli E, Turkoglu O, Berdeli A, Baylas H, Baskessen A, Atilla G. 2004. Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 75: 1640-1646.
- Wang P, Ohura K. 2002. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblast-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2): 132-142.
- Wang X, Quinn P. 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Res* 49(2): 97-107.
- Wilton J, Bampton J, Griffiths G, Curtis M, Life J, Johnson N, Powell JR, Harrap GJ, Critchley P. 1992. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *J Clin Periodontol* 19(1): 53-7.
- Wolf G, Bohlender J, Bondeva T, Roger T, Thaiss F, Wenzel U. 2006. Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 17(6): 1585-1593.
- Wu J, Yang X, Zhang Y, Zhou S, Zhang R, Dong XQ, Fan JJ, Liu M, Yu XQ. 2009. Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells. *Inflamm Res* 58(8): 473-482.