

Efecto del valsartán sobre los niveles de citocinas y quimiocinas salivales en la enfermedad periodontal experimental

Effect of valsartan on the salivary levels of cytokines and chemokines in experimental periodontal disease

MARÍA GABRIELA MATOS^{A,*}, ANITA ISRAEL^A, ELODIE BILLET^A, MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO^A

Resumen

La enfermedad periodontal (EP) es una patología infecciosa que afecta los tejidos que sostienen a los dientes en la que se produce no solo una respuesta inflamatoria sino una destrucción irreversible del ligamento periodontal, hueso, cemento y tejidos blandos. La respuesta inmune a los patógenos microbianos depende de componentes del sistema inmune, que inducen la producción de citocinas y contribuyen a la inflamación. Existe un equilibrio entre las citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y las citocinas anti-inflamatorias donde el patrón de éstas 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 (SRA) está involucrado en la inflamación, a través de la angiotensina II (ANG II) que 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 AT1 con valsartán, en un modelo de EP inducido por la administración de lipopolisacáridos (LPS) en la encía de la rata durante 7 días. Nuestros resultados demuestran que el LPS incrementa los niveles salivales de la proteína C reactiva (PCR), IL-17 y quimiocinas (RANTES y MIP-3 α), mientras que reduce la citocina anti-inflamatoria IL-4. El tratamiento con valsartán durante 7 días previene estos efectos. Los hallazgos indican que la angiotensina II participa en la inflamación inducida por el LPS en EP, y sugieren que el valsartán podría constituir una nueva alternativa terapéutica en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Palabras clave: angiotensina II, valsartán, citocinas anti-inflamatorias, quimiocinas, enfermedad periodontal.

Abstract

Periodontal disease (PE) is an infectious pathology that affects the tissues that support the teeth in which not only an inflammatory response occurs but also irreversible destruction of the periodontal ligament, bone, cementum, and soft tissues. The immune response to microbial pathogens depends on components of the immune system, which induce the production of cytokines and contribute to inflammation. There is a balance between pro-inflammatory cytokines, chemokines and anti-inflammatory cytokines where the pattern of these expressed locally in periodontal tissue and inflammatory cells contribute to the destructive phase of disease progression. It is known that the renin angiotensin system (SRA) is involved in inflammation, through angiotensin II (ANG II) that exerts pro-inflammatory actions. In order to determine the role of ANG II in PD, the effect exerted on the innate inflammatory immune response by AT1 receptor blockade with valsartan was evaluated in a PD model induced by the administration of lipopolysaccharide (LPS) in the gum of the rat for 7 days. Our results demonstrate that LPS increases the salivary levels of C-reactive protein (CRP), IL-17 and chemokines (RANTES and MIP-3 α), while reducing the anti-inflammatory cytokine IL-4. Treatment with valsartan for 7 days prevents these effects. This data indicates that angiotensin II participates in the inflammation induced by LPS in PD, and suggests that valsartan could constitute a new therapeutic alternative in the treatment of periodontal disease.

Key words: angiotensin II, valsartan, anti-inflammatory cytokines, chemokines, periodontal disease.

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

* Correspondencia: gbrielamatos@hotmail.com, Teléfono de oficina: +58212-6052284.

Introducción

La enfermedad periodontal (EP) es ampliamente conocida como una enfermedad crónica cuya etiología es multifactorial. Se sabe que la participación bacteriana inicia la EP, pero es la respuesta del huésped la que determina la extensión del daño inmuno-inflamatorio; éste involucra la destrucción de tejidos de soporte dentario como ligamento periodontal, hueso, cemento y tejidos blandos (Silva y col., 2015).

Las primeras defensas con las que se enfrentan los agentes externos al intentar penetrar en el organismo son totalmente inespecíficas, su actuación es fundamental para el desarrollo posterior de la defensa inmune adaptativa. Esta labor de defensa de las agresiones externas a cargo del sistema inmune, está compuesto por un conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas, que elabora una respuesta coordinada.

La incidencia y progresión de la enfermedad periodontal depende de las complejas interacciones entre las bacterias periodontopatógenas y las células del sistema inmune del huésped, las cuales están mediadas por citocinas y quimiocinas producidas tanto por el huésped como por las células presentes en el sitio de la inflamación (Herane y col., 2013).

El lipopolisacárido (LPS) bacteriano 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 leucotrieno B4 (Graves, 2008). La respuesta inmune a los patógenos microbianos depende de componentes del sistema inmune tanto innato como 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 gingivocrevicular (FGC).

Una serie de citocinas pro-inflamatorias son sintetizadas *de novo* tras infecciones virales o bacterianas. Estas citocinas son activas en la estimulación de células fagocíticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales (Grover y col., 2016). Las citocinas y quimiocinas inicialmente fueron identificadas por su capacidad de activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos circulantes hacia los sitios inflamados, son las moléculas efectoras clave que determinan la progresión del proceso inflamatorio y la destrucción tisular (Panzai y col., 2017).

Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva que conlleve la destrucción tisular, la actividad del TNF- α y de las citocinas pro-inflamatorias debe ser regulada. Esta actividad se lleva a cabo gracias a las citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10, la IL-4 y las formas solubles de sus receptores. Estas citocinas antagonistas inhiben la unión del ligando con los receptores de manera competitiva, bloqueando su acción e impidiendo el desarrollo de la señalización intercelular.

Las células T CD4+ juegan un importante papel en el funcionamiento de un sistema inmunitario sano. Ayudan a las células B a producir anticuerpos, activan la capacidad de destrucción de microbios de los macrófagos y reclutan otras células a las áreas infectadas o inflamadas del organismo. Estas actividades son orquestadas a través de la producción de varias citocinas y quimiocinas. Desde hace tiempo se sabe

que las células T CD4⁺ naïve pueden diferenciarse en los subtipos Th1 y Th2 en función del ambiente pro-inflamatorio o anti-inflamatorio, respectivamente. Estos subtipos tienen una función y un patrón de producción de citocinas distinto. Generalmente, las células Th1 se han asociado con la eliminación de patógenos intracelulares, mientras que las Th2 están involucradas en las respuestas frente a patógenos extracelulares y parásitos (Morán y Mastaglia, 2014). Por casi dos décadas, el paradigma Th1/Th2 sirvió de marco conceptual en la investigación de la patogénesis de la periodontitis, sin embargo como en otras enfermedades inflamatorias, la inmunidad mediada por células T en la periodontitis no encaja del todo en este modelo. La demostración realizada por Infante-Duarte y col. (2000) de que lipopéptidos de *Borrelia burgdorferi* estimulan a las células T a producir IL-17, TNF α , y factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), citocinas no asociadas con los linajes Th1 o Th2, llevó al descubrimiento de unas nuevas células CD4⁺ identificadas como Th17 con predominio pro-inflamatorio (Gaffen, 2008), las cuales juegan un papel esencial en la regulación de los procesos inflamatorios y en las enfermedades autoinmunes (Weaver y col., 2007).

Durante las reacciones inflamatorias, los leucocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular donde ejercen gran variedad de funciones biológicas. También pueden salir de la circulación bajo condiciones fisiológicas como parte de su función de vigilancia, tanto en la inflamatoria como la homeostática; algunas citocinas con funciones muy específicas controlan la activación y el flujo de estas células (Cano y Montoya, 2001). Las quimiocinas son una gran familia de citocinas quimiotácticas que 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. Algunas quimiocinas contribuyen con la inflamación e inducen la resorción ósea, ya que pueden estimular uno o varios pasos de ésta, incluso el reclutamiento, la diferenciación, o la fusión de células precursoras para formar osteoclastos (Graves, 2008).

Por otra parte, se sabe que el sistema renina-angiotensina (SRA) es un mediador clave en los procesos inflamatorios (Saavedra y col., 2011; Labandeira-García y col., 2017). 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; Matos y col., 2013). 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, especialmente 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). No solo se ha descrito la expresión de los componentes de SRA en tejido gingival y en los fibroblastos del ligamento periodontal humano, sino que también se ha demostrado su

funcionalidad en el tejido periodontal humano y de rata. Efectivamente, el bloqueo del receptor AT_1 y renina puede prevenir significativamente la pérdida de hueso inducida por la EP en ratas (Santos y col., 2015).

Se sabe poco sobre el papel de la ANG II en los procesos inflamatorios implicados en la periodontitis. 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 salivales de algunas citocinas inflamatorias, anti-inflamatorias y quimiocinas, así como el posible papel del sistema renina angiotensina local mediante el uso del valsartán, un antagonista de los receptores AT_1 de la angiotensina II.

Materiales 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 AT_1 (valsartán) (VAL). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60 mg/kg) e inyectadas directamente en la encía vestibular entre el primer y segundo molar con 10 μ L (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 (10 mg/Kg) mediante el uso de una sonda gástrica. 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% (60 mg/Kg) y utilizando una micropipeta se recolectó un aproximado de 500 μ L 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 PROTEINA 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 formándose 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 las muestras se determinó por interpolación a partir de la curva estándar, y se expresó en µg/mL.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

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 (5,6 µm) o magnéticas (8 µm), 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 salivales de las interleucinas (IL)-1alfa/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/quimiocina 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 ± el error estándar de la media (X ± 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 Y QUIMIOCINAS

Al evaluar la respuesta de la administración de LPS sobre los niveles salivales de la citocina pro-inflamatoria (IL17), la citocina anti-inflamatoria (IL4) y las quimiocinas (MIP-3α y RANTES), se puede observar que los niveles salivales de la IL-17, RANTES y MIP-3α incrementaron significativamente. Por el contrario, la administración de LPS disminuyó de forma significativa los niveles salivales de IL-4. En todos los casos, el tratamiento con valsartán, un antagonista del receptor AT₁, previno el efecto inducido por LPS

sobre las citocinas y quimiocinas salivales (**Figura 2**).

Discusión

La enfermedad periodontal se caracteriza por una inflamación que se extiende hasta la profundidad de los tejidos, y causa la degeneración y destrucción del tejido de soporte y del hueso alveolar. De los diferentes modelos para la inducción de la EP, la administración sistémica y local de endotoxinas bacterianas como los LPS de bacterias *Gram* negativas, a roedores, constituyen hoy en día un sistema bien caracterizado de inflamación, reproduciendo así los aspectos clínicos, radiográficos e histológicos de la periodontitis en humanos y constituyéndose en una herramienta útil en el estudio de la EP (Matos y col., 2016).

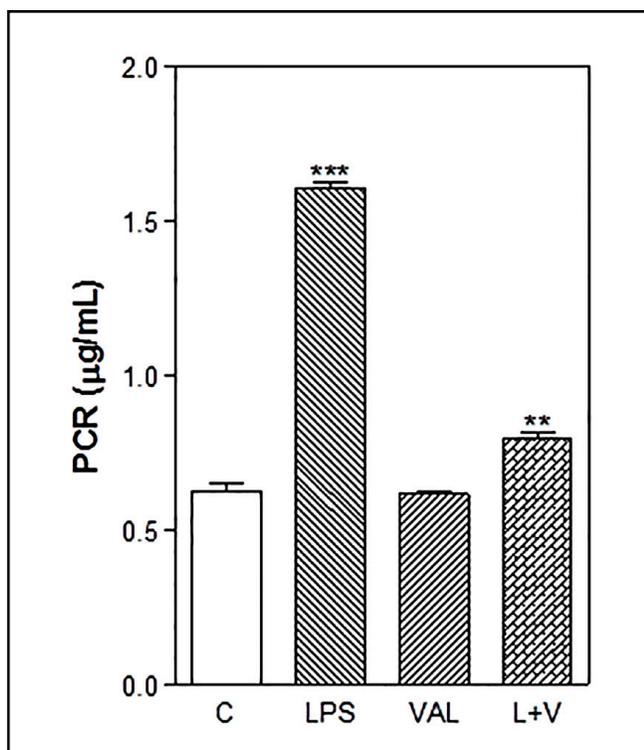


Figura 1. Determinación de la concentración de la PCR en la saliva de ratas tratadas durante 7 días con valsartán. Cada barra representa la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control. ** $p < 0,01$ respecto al grupo VAL.

El LPS estimula al eje monocito/linfocito y esto resulta en la secreción de sustancias mediadoras de la inflamación. El mecanismo fisiopatológico por el cual ocurre este proceso tiene explicación en la respuesta inmune del hospedero frente a los microorganismos productores de toxinas. Éstas endotoxinas estimulan a las células de defensa de los tejidos periodontales a que expresen diferentes mediadores inflamatorios, entre los cuales están la IL-1, IL6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el receptor activador del factor $\kappa\beta$ ligando (RANKL) (Matos y col., 2014, 2016). Sumado a estos mediadores inflamatorios, también se liberan otras sustancias como las proteínas de choque térmico (HSP60) y la Proteína C Reactiva (PCR), entre otras sustancias potencialmente citotóxicas (Matos y col., 2016). Cuando la respuesta inflamatoria aguda es insuficiente, estas citocinas estimulan a los hepatocitos para que secreten proteínas de fase aguda tales como la PCR durante el proceso de respuesta inflamatoria crónica sistemática no específica (Qvarnstrom y col., 2010). 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 (Podzimek y col., 2015).

Estudios recientes han demostrado la capacidad del tejido periodontal inflamado de sintetizar PCR, así como la presencia de la proteína y 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). Así, hemos demostrado en un modelo experimental

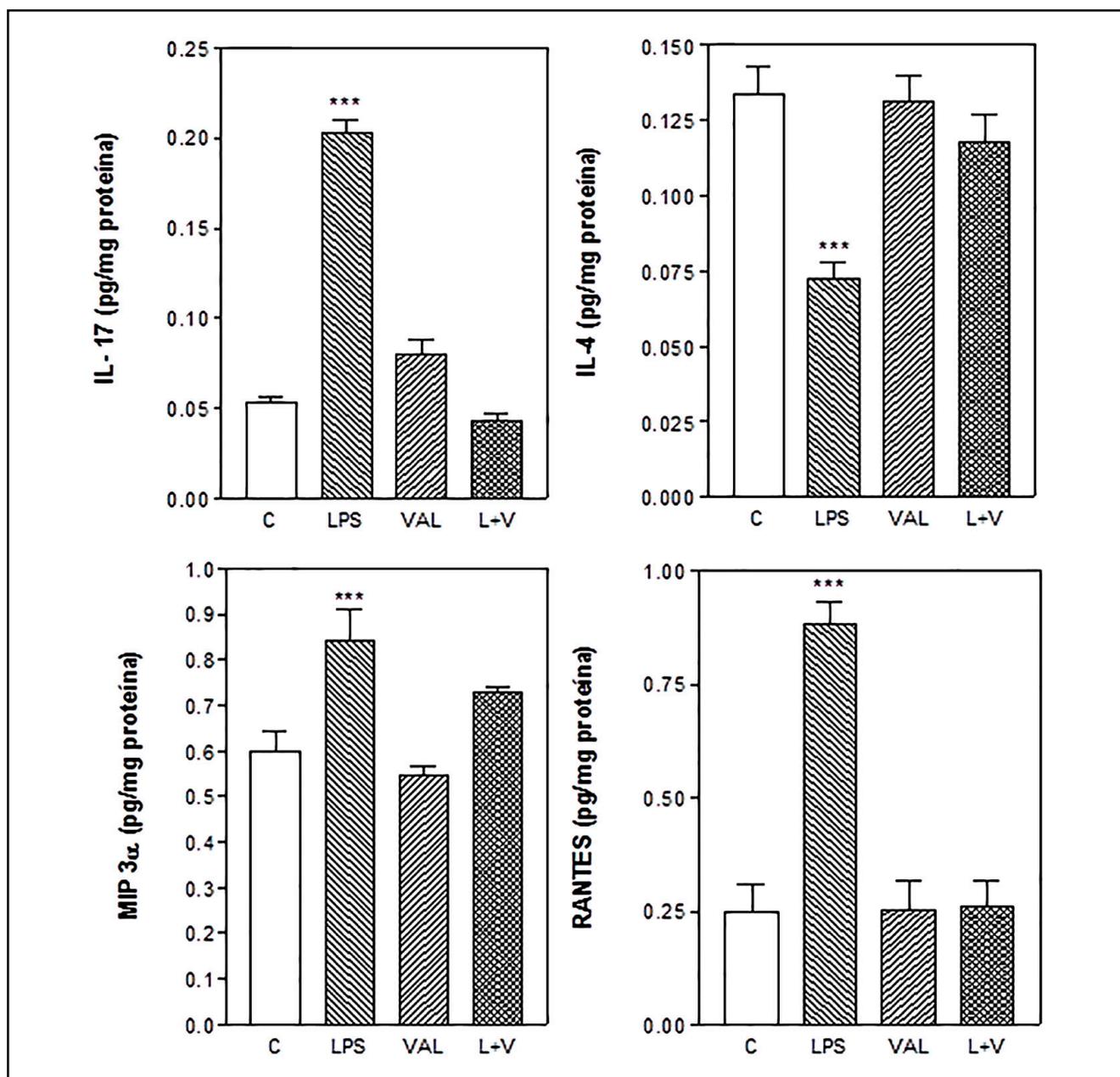


Figura 2. Concentración de IL-17, IL-4, MIP-3 α y RANTES en saliva en los animales tratados con valsartán durante 7 días. Cada barra representa la media \pm E.E.M.***p<0,001 respecto al control.

en rata, el incremento de los niveles de PCR salival inducido por la administración de LPS (resultados presentes), sugiriendo un papel de la PCR en la periodontitis. Efectivamente, existe evidencia de estudios transversales, que la PCR sérica está elevada en pacientes con periodontitis severa comparados con el grupo control (Bansal y col., 2014), así como en el fluido crevicular gingival (Haba y col., 2011).

Podzimek y col. (2015), encontraron un incremento en los niveles de PCR, el cual dependía de la severidad de la enfermedad periodontal, siendo baja en recesiones gingivales, incrementando en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica, con los niveles máximos en pacientes con periodontitis agresiva, incrementando según la progresión de la enfermedad. Asimismo, se ha reportado una alteración

de los niveles de la PCR en la saliva de los pacientes con EP en comparación con los controles. En efecto, se ha demostrado que los niveles salivales de PCR son significativamente mayores en pacientes con periodontitis en comparación con los pacientes edéntulos totales (Christodoulides y col., 2005). Aún más, se han reportado niveles de PCR 18 veces mayores en la saliva de los pacientes con EP en comparación con los de pacientes dentados sanos (Christodoulides y col., 2007). Por lo anterior se puede afirmar que la PCR constituye un índice fiable de daño tisular en procesos orales donde están involucradas bacterias odontopatógenas.

La respuesta inmune del huésped a bacterias patógenas, resulta en 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 periodontopatógenas influyen, de forma directa, la susceptibilidad del huésped a esta patología.

La enfermedad periodontal no puede describirse en términos dicotómicos de Th1 frente a Th2 (Gaffen y Hajishengallis, 2008). Efectivamente, se sabe que las células Th17 producen IL-17, TNF α , y factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), las cuales son citocinas no asociadas con los linajes Th1 o Th2 que actúan con un predominio pro-inflamatorio (Gaffen, 2008) y juegan un papel esencial en la regulación de los procesos inflamatorios (Weaver y col., 2007). La célula Th17 es activada por diferentes citocinas y factores de transcripción (IL-1, IL-6, IL-21, IL-23, TGF- β , STAT-3) e inhibida por otros (IL-4,

INF, IL-2, IL-27, IL-10), mientras que la IL-1 estimula la diferenciación de la célula Th17 (van Beelen y col., 2007). El hecho que la IL-17 esté involucrada tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (Grover y col., 2016) explica muchas de las discrepancias en el modelo clásico Th1/Th2.

Se ha reportado que *Porphyromonas gingivalis* puede estimular la producción de IL-17 en células T *in vitro* (Oda y col., 2003) y puede exacerbar las reacciones inflamatorias producidas por los fibroblastos gingivales en la enfermedad periodontal (Kotake y col., 1999). Igualmente, se ha demostrado la expresión del ARNm para la IL-17 en tejido gingival, con altos niveles en el tejido enfermo (Honda y col., 2008). La IL-17 es una activadora potente de los neutrófilos ya que regula la expresión de G-CSF y su receptor así como de las quimiocinas (Gaffen, 2008). En este sentido, Konermann y col. (2012) demostraron que en cultivos de células de ligamento periodontal humanas, la IL-17A incrementa la secreción de IL-6 facilitando el reclutamiento de leucocitos. Diversos autores han reportado el incremento de los niveles de IL-17 salivales, séricos y del fluido crevicular gingival en la enfermedad periodontal cuando se compara con sujetos sanos (Cardoso y col., 2009; Awang y col., 2014; Cheng y col., 2014; Prakasam y Srinivasan, 2014; Da Costa y col., 2015). Estudios clínicos reportan niveles incrementados de la IL-17 asociados con periodontitis crónica en biopsias de tejidos (Ohyama y col., 2009), en fluido gingival crevicular (Vernal y col., 2005) y en lesiones periapicales crónicas (Colic y col., 2007). Del mismo modo, Schenkein y col. (2010) reportan niveles apenas detectables en pacientes sanos, en oposición a niveles progresivamente incrementados en periodontitis agresiva

localizada y en periodontitis agresiva generalizada; los mismos autores demuestran una correlación entre los niveles de IL-17 y la destrucción periodontal.

El papel de esta citocina en la EP está demostrado por su participación en los procesos de destrucción ósea mediante la inducción de la producción de RANKL (Garlet, 2010). La IL-17 es inducida por el TGF- β , la IL-1 β y la IL-6 y es mantenida por la IL-23. La IL-17 estimula una gran variedad de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos para producir mediadores inflamatorios tales como IL-1, IL-6, TNF α , PGE2, MMPs y quimiocina IL-8 (Takahashi y col., 2011). Efectivamente, se ha reportado que la IL-17 está implicada en los procesos de destrucción ósea mediante la inducción de la producción de RANKL (Garlet, 2010). Igualmente, se sabe que la IL-17 aumenta la expresión de RANKL y produce la disminución de la expresión del receptor soluble denominado osteoprotegerina (OPG) en células osteoblásticas (Grover y col., 2016). Lin y col. (2015) reportan que la IL-17 incrementa la expresión de RANKL, mientras que inhibe la expresión de la OPG en células de ligamento periodontal en humanos, ambos indicadores críticos de osteoclastogénesis. La evidencia y los resultados del presente estudio donde demostramos una asociación entre la EP inducida por LPS y los niveles elevados IL-17 salival, sugieren un papel de esta citocina en los procesos de inflamación así como un papel en la patogénesis de la remodelación ósea periodontal.

Ahora bien, durante las reacciones inflamatorias, los leucocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular donde ejercen gran variedad de funciones biológicas. También pueden

salir de la circulación bajo condiciones fisiológicas como parte de su función de vigilancia. En ambas migraciones, tanto la inflamatoria como la homeostática, algunas quimiocinas con funciones muy específicas controlan la activación y el flujo de estas células (Cano y Montoya, 2001). En la enfermedad periodontal, se ha demostrado la expresión de diversas quimiocinas en tejidos periodontales inflamados y han sido involucradas en la patogénesis de la enfermedad, entre sus efectos biológicos están que son quimiotácticas para linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos, células NK (*Natural Killer*) y células dendríticas; inducen la activación del endotelio, los eosinófilos, basófilos y células NK; regulan la degranulación y liberación de enzimas por las células NK y T citotóxicas; modulan la apoptosis; controlan el crecimiento de las células hematopoyéticas; modulan la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Th1, Th2 o Th17 y aumentan la producción de IgE e IgG4.

Como ejemplo de quimiocina CC se encuentra la proteína CCL5 o RANTES (*Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*, por sus siglas en inglés), la cual atrae células como eosinófilos y basófilos que expresan el receptor CCR5 y que ha sido implicada en la compleja interacción de los varios aspectos de la biología de los linfocitos T que podría contribuir a los síntomas de la enfermedad periodontal (Ward y Westwick, 1998). Esta quimiocina puede mediar el reclutamiento selectivo de subconjuntos de células T en la inflamación periodontal (Ward y Westwick, 1998). En efecto, RANTES es un eficiente quimioatrayente de células Th1 que predominantemente controlan la respuesta inmune mediada por células, RANTES induce la migración de las células Th1 de una manera dependiente de la dosis, mientras que las células Th2

no son atraídas por esta quimiocina (Siveke y Hamann, 1998). De este modo, se ha sugerido que podían mediar la compleja red de interacciones dentro del sistema inmunológico mediante el control del equilibrio entre los subconjuntos de células T pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Gamonal y col., 2001).

Estudios recientes han demostrado la presencia de altos niveles de RANTES en el fluido crevicular gingival en pacientes con periodontitis crónica y estos niveles han demostrado estar relacionados con la destrucción periodontal (Gamonal y col., 2000a, 2000b, 2001). Así, en biopsias de encías sanas comparadas con encías hemorrágicas, con surcos gingivales superiores a 3 y 6 mm, se demostró una correlación entre las concentraciones de RANTES y el surco gingival (Johnson y col., 2004). Igualmente, en cultivos de glóbulos rojos provenientes de pacientes con y sin periodontitis y estimulados con LPS, los eritrocitos de pacientes con periodontitis no tratada, liberaron en promedio, dos veces más RANTES que el grupo control (Fokkema y col., 2003). Nuestros hallazgos apoyan estas evidencias ya que en el modelo de EP experimental inducido por LPS se observó un incremento significativo de los niveles salivales de RANTES, lo que sugiere que este incremento producido en el ambiente periodontal podría estar asociado al reclutamiento de células inflamatorias y la destrucción ósea periodontal (Matos y col., 2016).

La quimiocina CC MIP-3 α , denominada actualmente como CCL20, es expresada por varios tipos de células epiteliales, incluyendo queratinocitos, células epiteliales pulmonares e intestinales (Reibman y col., 2003). La CCL20 se expresa en muy bajos niveles basales, pero puede ser fuertemente inducida

por señales pro-inflamatorias incluidas citocinas como el TNF- α y agonistas de los receptores similares a Toll (Schutyser y col., 2003). De modo interesante, mientras que la mayoría de las quimiocinas se unen a múltiples receptores, la MIP-3 α se une exclusivamente al receptor CCR6 el cual media su efecto (Graves y col., 1997). El par CCL20/CCR6 es responsable de la quimio-atracción de células dendríticas inmaduras, células efectoras de memoria T y células B y juega un papel importante en las mucosas bajo condiciones de inflamación y en patologías tales como el cáncer y la artritis reumatoide (Dieu y col., 1998; Liao y col., 1999).

En el tejido periodontal enfermo, se ha descrito la presencia de infiltración de células T de memoria (Yamazaki y col., 1993) y células dendríticas (Yuan y col., 2011), pero el mecanismo de la infiltración de estas células es incierto. Nuestros hallazgos indican que esta quimiocina incrementa significativamente en la saliva durante la enfermedad periodontal experimental, sugiriendo un papel regulatorio importante de la MIP-3 α en la migración de linfocitos específicos hacia la región inflamada del tejido periodontal. En apoyo a esto está lo reportado por Hosokawa y col. (2002), quienes demostraron que tejidos gingivales inflamados expresan el ARNm para MIP-3 α , en contraste con los bajos niveles encontrados en tejido sano. Adicionalmente, mediante marcaje inmunohistoquímico, se reporta una infiltración masiva de células que expresan CCR6 en el tejido periodontal enfermo, y un porcentaje mayor de células T-CD4+ que en sangre periférica de células de los mismos pacientes (Hosokawa y col., 2002). Finalmente, las células T aisladas de la encía inflamada mostraron una respuesta quimiotáctica *in vitro* para MIP-3 α que fue inhibida por un anticuerpo

monoclonal anti-CCR6, lo que sugiere que la migración selectiva de células T hacia la encía inflamada puede ser regulada por la interacción CCR6/MIP-3 α (Hosokawa y col., 2002). Adicionalmente, se ha reportado un efecto de la MIP-3 α en fibroblastos gingivales humanos, incrementando la producción de CXCL12 (Hosokawa y col., 2002).

El cambio en los niveles de citocinas pro y anti-inflamatorias, indica una disminución en las reservas adaptativas del cuerpo y puede afectar la dinámica posterior del proceso inflamatorio en los tejidos periodontales (Berezniakova y Cheremisina, 2017). Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva que conlleve la destrucción tisular, la actividad del TNF- α y de las citocinas pro-inflamatorias deben ser reguladas. Esta actividad se lleva a cabo gracias a las citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10, la IL-4 y las formas solubles de sus receptores.

La IL-4 es una citocina pleiotrópica expresada primariamente por las células Th2 y los mastocitos que controla la migración y acumulación de las células T en la lesión periodontal (Berglundh y col., 2003). Se ha demostrado la presencia de linfocitos Th2 que expresan la IL-4 en biopsias gingivales de pacientes con EP (Ito y col., 2005). Adicionalmente la IL-4 ha sido detectada en el fluido gingivo crevicular humano (Bozkurt y col., 2006), con niveles incrementados en el periodonto sano, lo que sugiere una asociación entre esta citocina y la remisión de la EP (Pradeep y col., 2009). La IL-4 inhibe la resorción ósea *in vivo* e *in vitro*, reduciendo la hipercalcemia inducida por el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (Nagasaki y col., 1991), la osteoporosis causada por ovariectomía (Nakano y col., 1994) y la pérdida

de hueso yuxta-articular en diversos modelos experimentales de artritis (Woods y col., 2001). La IL-4 disminuye la osteoclastogénesis y la resorción ósea disminuyendo la relación RANKL/OPG en los osteoblastos (Palmqvist y col., 2006) y directamente inhibiendo las células progenitoras osteoclasticas (Palmqvist y col., 2006) y células T (Miroslavljevic y col., 2003).

Souza y col., (2012) investigaron los efectos de la IL-4 sobre la expresión de otras citocinas en fibroblastos gingivales humanos, encontrando que la IL-4 inhibe la expresión del ARNm y la proteína de la IL-1 β y del TNF- α , demostrando así un efecto modulador negativo de la IL-4 en la inflamación inducida en la periodontitis. Por otro lado, Hosokawa y col. (2016) demostraron que la IL-4 modula la producción de CCL11 y CCL20 en células de ligamento periodontal humano estimulado por IL-1 β , al inhibir la acumulación de células Th17 en el tejido periodontal enfermo e inhibir la producción de CCL20. Se sabe que las células Th17 se encuentran relacionadas con la reabsorción ósea por lo que la IL-17 podría aumentar la expresión de RANKL en las células residentes periodontales (Lin y col., 2015). Así, la IL-4 estaría relacionada positivamente con la patogénesis de la EP al controlar la producción de citocinas en la lesión periodontal.

Los resultados del presente trabajo demuestran una disminución de los niveles salivales de la IL-4 inducida por LPS en un modelo experimental de EP en rata. Nuestros hallazgos están en concordancia con los reportados por diversos autores quienes han investigado la expresión de esta citocina en la EP. Así, se ha reportado que en la pérdida ósea ocurrida por inflamación inducida vía células Th1 por bacterias periodontopatógenas, ocurre

un nivel bajo de la IL-4 y una excesiva formación de osteoclastos, mientras que respuestas basadas en células Th2 están asociadas a un alto nivel de IL-4 sin formación de osteoclastos y bajo nivel de pérdida ósea (Stashenko y col., 2007). Del mismo modo, Napimoga y col. (2011), reportaron en biopsias gingivales, una disminución en la expresión del ARNm y la proteína para la IL-4 en sitios con periodontitis crónica comparados con los sitios sanos, esto se vio acompañado por un incremento en los niveles de anticuerpos en saliva. Robati y col. (2011) demostraron niveles disminuidos de IL-4 en el suero de pacientes con periodontitis agresiva generalizada cuando son comparados con el grupo control sano, en oposición al incremento de los valores de IL-6 en estos pacientes. Asimismo, Shaddox y col. (2011), demuestran niveles superiores de esta citocina en sitios sanos comparados con sitios enfermos en pacientes con periodontitis agresiva.

La ANG II, es el efector principal del sistema renina-angiotensina, la cual además de participar en la regulación de la presión arterial, regula el crecimiento celular y la fibrosis. Adicionalmente, la ANG II está involucrada en eventos claves del proceso inflamatorio (Suzuki y col., 2003). Así, se ha establecido un efecto anti-inflamatorio de los bloqueantes de los 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 (Bergonzio y col., 2004). 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 el 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) reportaron 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 presentando elevados niveles circulantes 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).

Por otro lado, 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, estos autores reportaron un incremento en 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 , efectos que fueron abolidos 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. Consistente con estos hallazgos, nuestros resultados indican un papel fundamental de la ANG II en el proceso inflamatorio subyacente en la enfermedad periodontal ya que el bloqueo del receptor AT₁ con valsartán, previno el incremento de los niveles salivales de la PCR, IL-17, RANTES y MIP-3 α inducido por el LPS y revirtió el efecto de la IL-4. Estos efectos son consistentes con el concepto que el sistema renina angiotensina local no solo es detectable en el tejido periodontal humano y de rata, sino que es funcional. Por lo que el bloqueo de los receptores AT₁ podría prevenir la inflamación y la pérdida ósea en la enfermedad periodontal.

Nuestros resultados están en línea con los reportados por Santos y col. (2015), quienes demostraron que la inhibición del SRA con un inhibidor de la renina (aliskiren), así como con un antagonista del receptor AT₁ (losartán), bloquearon de modo significativo la pérdida de hueso alveolar inducida por la EP en ratas. Del mismo modo, Li y col. (2019) al evaluar los mecanismos subyacentes detrás de la exacerbación de la periodontitis en la hipertensión primaria y mediante el uso de un modelo de periodontitis inducida por bacterias en ratones normotensos e hipertensos (Nos3 -/-), reportaron que la hipertensión primaria empeora la reabsorción ósea y la destrucción del ligamento periodontal en un modelo de periodontitis y que el tratamiento con losartán revirtió estos efectos. Lo que demuestra un papel central para ANG II como mediador pro-inflamatorio

del receptor tipo Toll en la patogénesis de la periodontitis exacerbada por la hipertensión primaria.

Hasta la fecha, la investigación periodontal no ha caracterizado completamente la red de citocinas en el periodonto. Aunque ha sido reconocido que las citocinas son un ejemplo de "red" biológica, nuestro conocimiento sobre el funcionamiento de esta red es aún limitado. Existe una enorme variedad en la respuesta inflamatoria periodontal dado el gran número de mediadores involucrados, los múltiples y superpuestos nexos entre citocinas y linfocitos y las muchas oportunidades de control de su actividad (tales como regulación transcripcional, receptores señuelo, presencia de enzimas activadoras, proteínas accesorias y retrocontroles) (Preshaw y Taylor, 2011). Por esta razón se han reportado numerosos estudios en la literatura que sugieren un efecto beneficioso de compuestos con propiedades anti-inflamatorias en modelos de periodontitis inducidos por ligadura o por administración de toxinas bacterianas con fluoxetina (Branco de Almeida y col., 2011), extractos de Ginkgo Biloba (Sezer y col., 2013), ácido bórico (Demirer y col., 2012), donantes de óxido nítrico como el S-nitrosoglutatión (de Menezes y col., 2012), quercetina (Cheng y col., 2010), cúrcuma (Guimarães y col., 2011), resolvinas y lipoxinas (Van Dyke 2017), flavonoides (Gugliandolo y col., 2019) entre otros. Nuestros resultados 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

- Awang R, Lappin D, MacPherson A, Riggio M, Robertson D, Hodge P, Ramage G, Culshaw S, Preshaw P, Taylor J, Nile C. 2014. Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity. *Inflammation Res* 63(12): 1001–1012.
- Bansal T, Pandey A, Deepa D, Asthana A. 2014. C-reactive protein (CRP) and its association with periodontal disease: a brief review. *J Clin Diag Res* 8(7): E21–E24.
- Benicky J, Sánchez-Lemus E, Pavel J, Saavedra J. 2009. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. *Cell Mol Neurobiol* 29(6-7): 781–792.
- Berezniakova A, Cheremisina V. 2017. 4 and 6 interleukin's action in the pathogenesis of periodontitis, gingivitis and dental alveolitis. *Wiad Lek* 70(5): 910–912.
- Berglundh T, Donati M, Hahn-Zoric M, Hanson L, Padyukov L. 2003. Association of the -1087 IL 10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish swedish Caucasianscaucasians. *J Clin Periodontol* 30 (3): 249–254.
- Bergonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Savedra J. 2004. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT₁ receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(2): G414–G423.
- Bozkurt F, Yetkin A, Berker E, Tepe E, Akkuş S. 2006. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine* 35(3-4): 180–175.
- Branco-de-Almeida L, Franco G, Castro M, Dos Santos J, Anbinder A, Cortelli S, Kajiya M, Kawai T, Rosalen P. 2011. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 83(5): 664–671.
- Cano N, Montoya C. 2001. Las quimioquinas: citoquinas proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular. *IATREIA* 14(1)/VOL 14/ No.1/.: 57–72.
- Cardoso C, Garlet G, Crippa G. 2009. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 24(1): 1–6.
- 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.
- Cheng W, Hughes F, Taams L. 2014. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clinical Periodont* 41(6): 541–549.
- Christodoulides N, Floriano P, Miller C, Ebersole J, Mohanty S, Dharshan P, Griffin M, Lennart A, Ballard K, King C Jr, Langub M, Kryscio R, Thomas M, McDevitt J. 2007. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 1098: 411–428.
- Christodoulides N, Mohanty S, Miller C, Langub M, Floriano P, Dharshan P, Ali M, Bernard B, Romanovicz D, Anslyn E, Fox P, McDevitt J. 2005. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* 5(3): 261–269.
- Código de bioética y bioseguridad sobre el manejo de animales de experimentación del Ministerio de Ciencias y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela. https://www.uis.edu.co/webUIS/es/investigacionExtension/comiteEtica/normatividad/documentos/otraNormatividad/16_BioeticaVenezuela2002.pdf
- Colic M, Vasilijic S, Gazivoda D, Vucevic D, Marjanovic M, Lukic A. 2007. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci* 115: 315–320.

- Da Costa T, Silva M, Alves P, Chica J, Giani M, Garlet G, da Silva J, Rodrigues Júnior V, Rodrigues D, Cardoso C. 2015. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. *Mediators of Inflammation* Article ID 983782.
- De Menezes A, de Souza G, Gomes A, de Carvalho L, de Albuquerque R, de Oliveira M, de Castro Brito G. 2012. S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 83(4): 514–521.
- Demirer S, Kara M, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H. 2012. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol* 57(1): 60–65.
- Dieu M, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J, Oldham E, Ait-Yahia S, Brière F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373–386.
- Fokkema S, Loos B, Van Der Velden U. 2003. Monocyte-derived RANTES is intrinsically elevated in periodontal disease while MCP-1 levels are related to inflammation and are inversely correlated with IL-12 levels. *Clin Exp Immunol* 131: 477–483.
- Gaffen S. 2008. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 43(3): 402–407.
- Gaffen SL, Hajishengallis G. 2008. A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res* 87(9): 817–828.
- Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. 2001. Characterization of cellular infiltrate detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodont Res* 36: 194–203.
- Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. 2000a. Levels of interleukin-1beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodont* 71: 1535–1545.
- Gamonal J, Bascones A, Jorge O, Silva A. 2000b. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluid of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodont* 27: 675–681.
- Garlet G. 2010. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dental Res* 89(12): 1349–1363.
- Graves D, Wang W, Dairaghi D, Dieu M, Saint-Vis B, Franz-Bacon K, Rossi D, Caux C, McClanahan T, Gordon S, Zlotnik A, Schall T. 1997. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med* 186: 837–844.
- Graves D. 2008. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontal* 79: 1585–1591.
- Grover H, Saini R, Bhardwaj P, Bhardwaj A. 2016. Cytokines and other inflammatory mediators in periodontal health and disease. *Indian J Oral Health Res* 2: 12–16.
- Gugliandolo E, Fusco R, D'Amico R, Peditto M, Oteri G, Di Paola R, Cuzzocrea S, Navarra M. 2019. Treatment with a flavonoid-rich fraction of bergamot juice improved lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. *Front Pharmacol* 9: 1563.
- Guimarães M, Coimbra L, de Aquino S, Spolidorio L, Kirkwood K, Rossa C Jr. 2011. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease *in vivo*. *J Periodontal Res* 46(2): 269–279.
- Haba D, Teslaru S, Ungureanu D, Hodorog D, Alecu C, Benghiac A, Zetu L, Anuța C, Anuța E, Nemțoi A, Iordache C. 2011. Evaluation of serum and gingival crevicular fluid C-reactive protein and IL-6 levels in patients with periodontitis and transient ischemic attacks. *Rom J Morphol Embryol* 52(4): 1243–1247.
- Herane A, Chaparro A, Quintero A, Sanz A, Hernández M, Gaedechens D, Carrión F, Inostroza C. 2013. Expresión de

- citoquinas Th17 y su correlación con periodontopatógenos y el área periodontal inflamada en pacientes con periodontitis crónica. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 6(3): 109–113.
- Hirromichi A, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra J. 2004. Angiotensin II AT₁ receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35:1726–1731.
- Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, Tabeta K, Okui T, Kajita K, Domon H, Yamazaki K. 2008. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta* 395(1-2): 137–141.
- Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, Ozaki K, Matsuo T. 2016. IL-4 modulates CCL11 and CCL20 productions from IL-1 β -stimulated human periodontal ligament cells. *Cell Physiol Biochem* 38: 153–159.
- Hosokawa Y, Nakanishi Y, Yamaguchi D, Takahashi K, Yumoto H, Ozaki K, Matsuo T. 2002. Macrophage Inflammatory Protein 3 α -CC chemokine receptor 6 interactions play an important role in CD4⁺ T-cell accumulation in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 128: 548–554.
- Infante-Duarte C, Horton H, Byrne M, Kamradt T. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165(11): 6107–6115.
- Ito H, Honda T, Domon H, Oda T, Okui T, Amanuma R, Nakajima T, Yamazaki K. 2005. Gene expression analysis of the CD41 T cell clones derived from gingival tissues of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 20: 382–386.
- Johnson R, Wood N, Serio F. 2004. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 75: 37–43.
- Kim J, Heo H, Ha Y, Ye B, Lee E, Choi Y, Yu B, Chung H. 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 H. 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.
- Konermann A, Beyer M, Deschner J, Allam J, Novak N, Winter J, Jepsen S, Jäger A. 2012. Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. *Cell Immunol* 272(2): 13–143.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie M, Martin T, Suda T. 1999. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103: 1345–1352.
- Labandeira-Garcia J, Rodríguez Perez A, Garrido-Gil P, Rodríguez-Pallares J, Lanciego J, Guerra M. 2017. Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration. *Frontier Aging Neurosci* 9: 129.
- Larrayoz I, Pang T, Benicky J, Pavel J, Sánchez-Lemus E, Saavedra J. 2009. Candesartan reduces the innate immune response to lipopolysaccharide in human monocytes. *J Hypertens* 27(12): 2365–2376.
- Li J, Xiao X, Wei W, Ding H, Yue Y, Tian Y, Nabar NR, Liu Z, Yang Z, Wang M. 2019. Inhibition of angiotensin II receptor I prevents inflammation and bone loss in periodontitis. *J Periodontol* 90(2): 208–216.
- Liao F, Rabin R, Smith C, Sharma G, Nutman T, Farber J. 1999. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 α . *J Immunol* 162: 186–194.
- Lin D, Li L, Sun Y, Wang W, Wang X, Ye Y, Chen X, Xu Y. 2015. IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF- κ B pathways. *Immunology* 144: 472–485.
- Lu Q, 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.
- Matos M, Billet E, Mathison Y, Israel A, Garrido M. 2013. Generación de especies reactivas de oxígeno en la periodontitis experimental en la rata. Papel del receptor AT₁ y la NADP(H) oxidasa. *Rev Fac Farm* 76(1 y 2): 58–66.
- Matos M, Israel A, Billet E, Garrido M. 2016. Las citoquinas proinflamatorias en la enfermedad periodontal experimental. Efecto del valsartán. *Rev Fac Farm* 79(1-2): 17–27.
- Matos M, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido M. 2014. El valsartán previene la resorción ósea en la periodontitis experimental. *Rev Periodoncia Osteointegración* 4(4): 289–295.
- Mirosavljevic D, Quinn J, Elliott J, Horwood N, Martin T, Gillespie M. 2003. T-cells mediate an inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 18(6): 984–93.
- Morán EM, Mastaglia FL. 2014. Cytokines in immune-mediated inflammatory myopathies: cellular sources, multiple actions and therapeutic implications. *Clin Exp Immunol* 178(3): 405–15.
- Nagasaki K, Yamaguchi K, Watanabe K, Eto S, Abe K. 1991. Interleukin-4 blocks parathyroid hormone-related protein-induced hypercalcemia *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 178(2): 694–698.
- 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.
- Nakano Y, Watanabe K, Morimoto I, Okada Y, Ura K, Sato K, Kasano K, Nakamura T, Eto S. 1994. Interleukin-4 inhibits spontaneous and parathyroid hormone-related protein-stimulated osteoclast formation in mice. *J Bone Miner Res* 9(10): 1533–1539.
- Napimoga M, Nunes L, Maciel A, Demasi A, Benatti B, Santos V, Bastos M, de Miranda T, Duarte P. 2011. Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects. *Scand J Immunol* 74(6): 596–602.
- Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. 2003. Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF- κ B ligand *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 18: 30–36.
- Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. 2009. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* 88(7): 633–638.
- Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway H, Lerner U. 2006. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem* 281: 2414–2429.
- Panezai J, Ghaffar A, Altamash M, Sundqvist K-G, Engström P, Larsson A. 2017. Correlation of serum cytokines, chemokines, growth factors and enzymes with periodontal disease parameters. *PLoS ONE* 12(11): e0188945.
- Pavlatou M, Mastorakos G, Margeli A, Kouskouni E, Tentolouris N, Katsilambros N, Chrousos G, Papassotiriou I. 2011. Angiotensin blockade in diabetic patients decreases insulin resistance-associated low-grade inflammation. *Eur J Clin Invest* 41(6): 652–658.
- 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 of Inflamm* 2015: 564858.

- Pradeep A, Hadge P, Chowdhry S, Patel S, Happy D. 2009. Exploring the role of Th1 cytokines: interleukin-17 and interleukin-18 in periodontal health and disease. *J Oral Sci* 51(2): 261–266.
- Prakasam S, Srinivasan M. 2014. Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Diseases* 20(2): 171–177.
- 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, Garcia R, Baird A, Van Dyke T, Meurman J. 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.
- Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. 2003. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/ CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 648–654.
- Robati M, Ranjbari A, Ghafourian Boroujerdnia M, Chinipardaz Z, Iran J. 2011. Detection of IL-4, IL-6 and IL-12 serum levels in generalized aggressive periodontitis. *Immunol* 8(3): 170–175.
- Saavedra J, 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, Baliova M, Nishioku t, Saavedra J. 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 J. 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-Roldan I, Moughamian A, Pavel J, Nishioku T, Saavedra J. 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 A, Oliveira S, Pereira H, Becari C, Oliveira E, Salgado M. 2009. Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol* 80: 130–139.
- Santos C, Morandini A, Dionísio T, Faria F, Lima M, Figueiredo C, 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.
- Schenkein H, Koertge T, Brooks C, Sabatini R, Purkall D, Tew J. 2010. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 89(9): 943–947.
- Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 409–426.
- Sezer U, Kara M, Erciyas K, Ozdemir H, Ustün K, Ozer H, Göze F. 2013. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand* 71(1): 38–44.
- Shaddox L, Wiedey J, Calderon N, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell J, Zapert E, Aukhil I, Wallet S. 2011. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res* 90(9):1140–1144.

- Shishido T, Konta T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Takasaki S, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 2011. Suppressive effects of valsartan on microalbuminuria and CRP in patients with metabolic syndrome (Val-Mets). *Clin Exp Hypertens* 33(2): 117–123.
- Silva N, Abusleme L, Bravo D, 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.
- Siveke J, Hamann A. 1998. Cutting edge: T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 160: 550–554.
- 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.
- Souza P, Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hånström L, Souza J, Conaway H, Lerner U. 2012. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit the expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 in fibroblasts. *Mol Immunol* 49(4): 601–610.
- Stashenko P, Gonçalves R, Lipkin B, Ficarella A, Sasaki H, Campos-Neto A. 2007. Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by *Porphyromonas gingivalis*. *Am J Pathol* 170(1): 203–213.
- 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.
- Takahashi N, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. 2011. Effect of interleukin-17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells. *Eur J Oral Sci* 119(5): 339–344.
- Van Beelen A, Zelinkova Z, Taanman-Kueter E, Muller F, Hommes D, Zaat S, Kapsenberg M, de Jong E. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27(4): 660–669.
- Van Dyke T. 2017. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol Aspects Med* 58: 21–36.
- Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela A, Gamonal J. 2005. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32: 383–389.
- Ward S, Westwick J. 1998. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J* 333: 457–470.
- Weaver C, Hatton R, Mangan P, Harrington L. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821–852.
- Woods J, Katschke K, Volin M, Ruth J, Woodruff D, Amin M, Connors M, Kurata H, Arai K-I, Haines G, Kumar P, Koch A. 2001. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol* 166(2): 1214–1222.
- Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T, Hara K. 1993. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissue with periodontal disease. *J Periodont Res* 28: 324–334.
- Yuan Q, Wang J, Fang Q, Liu Y, Fan J, Zhang S, Ma Y. 2011. Attenuating effect of pretreatment with Yiqifumai on lipopolysaccharide-induced intestine injury and survival rate in rat. *J Inflamm (Lond)* 8: 10.

Recibido: 05-04-2019
Aceptado: 22-06-2019