

Efecto del valsartán sobre las vías de señalización del receptor TRL4 en la enfermedad periodontal experimental

Effect of valsartan on TRL4 receptor signaling pathways in experimental periodontal disease

MARÍA GABRIELA MATOS^{1,*}, MARCO ÁLVAREZ², LOURDES PERDOMO²,
MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO¹, ANITA ISRAEL¹

Resumen

La enfermedad periodontal (EP) es una patología infecciosa que afecta a los tejidos que sostienen a los dientes, en la que se produce la destrucción del ligamento periodontal, hueso, cemento y tejidos blandos, que se inicia como una respuesta inflamatoria frente al ataque de un agente patógeno. Los lipopolisacáridos (LPS) provenientes de la bacteria se unen a los receptores similares a Toll (TLR4), activando diferentes vías de señalización tales como la activación de proteínas kinasas tipo p38 y el factor nuclear kB (NFkB), las cuales regulan los procesos inflamatorios locales del tejido periodontal. Existe evidencia que la angiotensina II (ANG II), a través del receptor AT₁, participa en procesos inflamatorios. Evaluamos si el bloqueo del receptor AT₁, con valsartán, podría reducir la respuesta inmunitaria inflamatoria innata en la EP. Para ello, se estudió el efecto del valsartán sobre la expresión de receptores TRL4 y AT₁; y de la MAPKs p38 y el NFkB, en un modelo de EP inducido por la inyección de LPS en la encía de la rata durante 7 días. Nuestros resultados demuestran que el LPS aumenta la expresión de TRL4, AT₁, p38, p-p38, NFkB, p-NFkB, así como la relación p-NFkB/NFkB y p-p38/p38, en la encía de las ratas con EP experimental. El tratamiento con valsartán durante 7 días previene estos efectos. Estos hallazgos indican que la ANG II participa en la inflamación inducida por el LPS en la EP, y sugiere que el valsartán podría constituir una nueva alternativa terapéutica en el tratamiento de la EP.

Palabras clave: angiotensina II, valsartán, MAPK p38, NFkB, enfermedad periodontal

Abstract

Periodontal disease (PD) is an infectious pathology that affects the tissues that support the teeth, in which the destruction of the periodontal ligament, bone, cementum, and soft tissues occurs, which begins as an inflammatory response to the attack of a pathogen agent. Lipopolysaccharides (LPS) from the bacteria bind to Toll-like receptors (TLR4), activating different signaling pathways such as the activation of p38-type protein kinases and nuclear factor-kB (NFkB) that in turn regulate inflammatory processes locally in periodontal tissue. There is evidence that angiotensin II (ANG II), through the AT₁ receptor, participates in inflammatory processes. We evaluated whether blocking the AT₁ receptor, with valsartan, could reduce the innate inflammatory immune response in PD. To do this, the effect of valsartan on the expression of TRL4 and AT₁ receptors; and of p38 MAPKs and NFkB, was studied in a model of PD induced by LPS injection into the rat gingiva for 7 days. Our results show that LPS increases TRL4, AT₁, p38, p-p38, NFkB, p-NFkB expression, as well as the ratio p-NFkB/NFkB and p-p38/p38, in the rat gingiva with experimental PD. Treatment with valsartan for 7 days prevents these effects. These findings indicate that ANG II participates in the inflammation induced by LPS in PD, and suggests that valsartan could constitute a new therapeutic alternative in the treatment of PD.

Key words: angiotensin II, valsartan, p38 MAPK, NFkB, periodontal disease

¹ Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

² Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela, Caracas. Teléfono de oficina: +58 212-6052284.

* Correspondencia: gbrielamatos@hotmail.com

Introducción

Al igual que con otras barreras corporales, tales como el tracto respiratorio y el gastrointestinal, el tejido periodontal está continuamente expuesto a la microbiota oral. Aunque ciertas bacterias son consideradas patógenas debido a su fuerte asociación con la enfermedad periodontal, existe actualmente evidencia de que la periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial, que tiene como etiología primaria las bacterias, a la que contribuye la respuesta inmunológica del hospedador a los microorganismos asociados con el biofilm periodontal, o a sus productos tales como los lipopolisacáridos (LPS), desembocando en el daño tisular que destruye los tejidos del periodonto, que en su conjunto constituyen estructuras tisulares que protegen y soportan los dientes (Villa, 2015). Así, la participación bacteriana inicia la EP, pero la respuesta del hospedador es la que determina la extensión del daño inmunoinflamatorio, que destruye los tejidos de soporte dentario como cemento, ligamento periodontal, hueso y tejidos blandos (Silva y col., 2015). El desbalance entre las respuestas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias del hospedador constituye un elemento clave entre la patogénesis de la enfermedad y el daño tisular (Silva y col., 2015; Pan y col., 2019).

El lipopolisacárido (LPS) proveniente de las bacterias, estimula al eje monocito/linfocito produciéndose la secreción de sustancias mediadoras de la inflamación (Graves, 2008; Hajishengallis, 2015). La respuesta inmunológica a los patógenos microbianos depende de componentes del sistema inmune tanto innato como

adaptativo (Sarah y col., 2006), siendo ésta la primera línea de defensa contra un antígeno desconocido. Una serie de citocinas pro-inflamatorias son activadas en la estimulación de células fagocíticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales (Grover y col., 2016). Representantes de estas citocinas son la familia de la interleukina 1 (IL-1), la familia de la interleukina 6 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Estas citocinas tienen efectos pleotrópicos en la promoción de linfocitos y en la destrucción tisular y son reconocidas como citocinas pro-inflamatorias (Hajishengallis, 2015). El TNF- α ejerce su acción a través de dos receptores, receptores 1 y 2 de TNF- α (TNFR1 y TNFR2), expresados en la mayoría de las células. El principal receptor responsable de la señalización intercelular parece ser TNFR1, mientras que TNFR2 potencia esta actividad. Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva que conlleve a la destrucción tisular, la actividad de TNF- α y de las citocinas pro-inflamatorias debe ser regulada. Esto se lleva a cabo gracias a las citocinas anti-inflamatorias, como IL-10, 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 su señalización intercelular.

Un importante paradigma en inmunología es que factores inflamatorios activan mecanismos de retro-inhibición para restringir la inflamación y limitar el daño tisular asociado (Carrillo y col., 2006; Ivashkiv y col., 2011). Las células del hospedador reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), que no están presentes en las células del hospedador, incluyendo el

LPS, a través de la interacción con receptores que reconocen dichos patrones (AlQallaf y col., 2018; Ilango y col., 2016). El prototipo de estos receptores está constituido por la familia de los receptores similares a Toll (Toll-like receptor, TLR), considerados como la unión entre la inmunidad adaptativa y la innata en la enfermedad periodontal. Hasta la fecha han sido identificadas 10 TLRs (TLR1 a TLR10 en humanos) (Gu y Han, 2020).

Hasta el momento se ha demostrado que la inyección de LPS activa múltiples vías de señalización en células del periodonto, tales como fibroblastos y osteoblastos (Rossa y col., 2007). Para ello, el LPS bacteriano requiere activar receptores similares a Toll (TLR), especialmente el TLR4, los cuales proporcionan el nexo entre el ambiente extracelular y la iniciación de los eventos intracelulares que activan diversos componentes de señalización (Tsan y Gao, 2004). Entre ellos se encuentran los componentes de tres grandes subfamilias de las vías inflamatorias de las MAPK (mitogen activated protein kinase, proteínas cinasas activadas por mitógenos): la p38, la ERK (extracelular signal-regulated kinase, cinasas reguladas por señales extracelulares) y JNK (c-Jun N-terminal kinase, cinasa c-Jun N-terminal). La p38, una cinasa serina-treonina, y la JNK son activadas aguas arriba por diversos estímulos, como Fas ligando (Fas L), factores de crecimiento, citocinas pro-inflamatorias, LPS, proteínas virales y estrés celular osmótico en células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos T y B. Estas enzimas regulan aguas abajo procesos celulares fundamentales, como la regulación del ciclo celular, apoptosis, envejecimiento celular y la producción de citocinas

como la IL-10. La ERK es activada aguas arriba por agentes infecciosos, señales mitóticas, factores de crecimiento, hormonas y citocinas pro-inflamatorias, activando aguas abajo la síntesis de proteínas del citoesqueleto, la proliferación y la diferenciación celular, esta vía es regulada negativamente por las MAPK cinasas, así como por tirosinas-fosfatasas (PTP) de MAPK como las llamadas *dual specificity protein phosphatase* (DUSP, proteína fosfatasa de doble especificidad). Los defectos de la regulación en estas vías de señalización inducen alteraciones en la respuesta inmune innata y adaptativa, proliferación de células tumorales, resistencia a la insulina, desarrollo de enfermedades neurológicas y/o degenerativas, fallos en el control de infecciones y autoinmunidad. La p38 es una proteína clave en la regulación de la respuesta pro-inflamatoria, por lo que han sido una de las primeras proteínas quinasas investigadas como diana terapéutica en autoinmunidad e inflamación (Hernández-Flórez y Valor, 2016).

La activación aguas abajo de estas enzimas favorece la activación de otras vías que regulan la inflamación como MAPK (p38, ERK1/2), fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*), fosfolipasa C (PLC) y factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF-kB, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). La vía final del sistema molecular de la inmunidad innata es la activación de factores de transcripción como el NFkB para la inducción de genes que regulan la síntesis de moléculas en el control de la infección, tales como las citocinas pro-inflamatorias, IL-1, IL-8, TNF- α , IL-12, y moléculas afines tales como la CD80,

CD86 y CD40 (Beinke y Ley, 2004). La activación del NFκB también puede ser inducida por endotoxinas bacterianas y, se ha demostrado que los LPS bacterianos también pueden activar al NFκB de macrófagos y la consiguiente transcripción de citocinas de modo independiente de la PKC (Wallach y col., 1999; Chen y Lin, 2001). El estudio de las vías de señalización involucradas en la EP ha tomado relevancia en los últimos años (Kirkwood y col., 2007).

Ahora bien, se sabe que el sistema renina-angiotensina (SRA) es un mediador clave en los procesos inflamatorios (Labandeira-García y col., 2017). 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 NFκB (Kim y col., 2011, 2012; Matos y col., 2013). 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 sólo 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, ya que el bloqueo del receptor AT₁ y renina puede prevenir significativamente la pérdida de hueso periodontal en ratas (Santos y col., 2015). Recientemente, Matos y col. (2016, 2019) demostraron que el valsartán fue capaz de prevenir el incremento inducido por el LPS de los niveles salivales de la proteína C reactiva (PCR), de citocinas proinflamatorias como las interleucinas (IL) IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-17, el TNF-α; las quimiocinas RANTES y MIP-3α, y de prevenir la reducción de la citocina antiinflamatoria IL-4, en un modelo experimental de EP. Esto sugiere que la ANG II participa en la inflamación inducida por el LPS en EP. Hasta ahora poco se sabe acerca las vías de señalización involucradas en la acción inflamatoria del LPS en la EP, así como el posible papel de la ANG II en dichos mecanismos de segundos mensajeros.

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 evaluó las vías de señalización involucradas en el proceso inflamatorio que resulta de la acción del LPS mediada por el TLR4, así como el posible papel del sistema renina angiotensina local, mediante el uso del valsartán (VAL), un antagonista de los receptores AT₁ de la ANG 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), mantenidas 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 de la endotoxina en el tejido gingival, 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% (60 mg/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 (n=6 por grupo): (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 intragástrica.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUCOSA

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se aisló la encía del maxilar inferior. La mucosa bucal fue colocada en una solución amortiguadora fría de fosfatos (NaCl al 0,9% en buffer de fosfatos 0,01 M, pH 7,0) para ser dividida en pedazos pequeños con una tijera y lavada con la misma solución para eliminar la sangre. La determinación de la expresión de proteínas

se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Se realizaron cortes de aproximadamente 3 micras con un micrótopo (MICROTOME PLUS, Triangle Biomedical Science, TBS), colocados en cubreobjetos, lavados con PBS (10 mM; pH=7) y permeabilizados con metanol a -10 °C por 10 min, luego se eliminó la autofluorescencia mediante la incubación en NH₄Cl (100 mM) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se bloquearon con tampón PBS, 1% BSA (albúmina de suero bovino) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se incubaron durante 2 horas con los anticuerpos primarios con PBS, 1% BSA, lavados con PBS e incubados durante 1 hora con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo (FITC longitud de onda 475-500 nm). Se realizó la tinción de los núcleos celulares incubando las muestras con DAPI (longitud de onda 375-400 nm), lavados con PBS y montados con glicerol al 80%. Las imágenes se capturaron en un microscopio Confocal Olympus y se analizaron con el software *Image J* (National Institute of Health, USA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como la media ± 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 LOS RECEPTORES TLR4, AT₁, p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFκB Y p-NFκB MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA

La expresión del receptor TLR4, AT₁, y de p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFκB y p-NFκB fue determinada mediante inmunofluorescencia (**Figuras 1, 2, 3 y 4**). En todos los casos se observa que la inyección de LPS en la encía de la rata durante 7 días, aumentó significativamente las densidades ópticas en el grupo LPS al compararla con el grupo control. Al graficar las relaciones de las densidades ópticas relativas de las proteínas fosforiladas/totales (p-p38/p38, p-NFκB/NFκB) se observó un aumento en el grupo tratado con LPS, indicando un incremento de la activación de estas proteínas (**Figuras 3 y 4**). El tratamiento con valsartán previno el incremento inducido por el LPS de la expresión del receptor TLR4, AT₁, y de p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFκB y p-NFκB (**Figuras 1, 2, 3 y 4**).

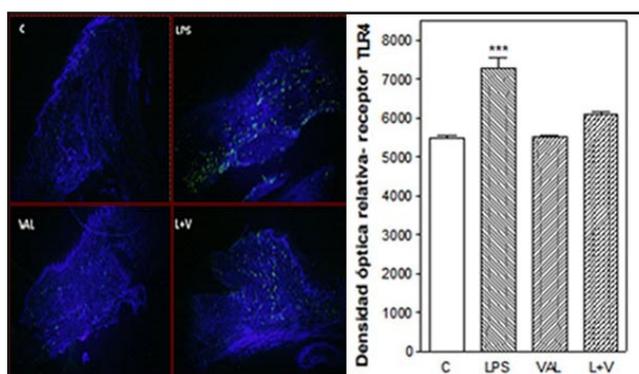


Figura 1. Inmunofluorescencia del receptor TLR4 en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación (Izquierda). Densidad óptica relativa del receptor TLR4 en la encía de rata en el grupo tratado por 7 días (Derecha). Cada barra representa la media \pm E.E.M., *** $p < 0,001$ respecto al control. C=control, LPS= lipopolisacárido (L), Val= valsartán (V).

Discusión

La EP se caracteriza por una inflamación que se extiende hasta la profundidad de los tejidos, causando la degeneración y destrucción del tejido de soporte y hueso alveolar. El LPS estimula al eje monocito/linfocito y esto resulta en la secreción de sustancias mediadoras de la inflamación como las interleucinas. En efecto, recientemente demostramos que en un modelo experimental de EP inducido por LPS, se produce un incremento de los niveles salivales de IL-6, IL-1, IL17 y TNF- α , sugiriendo un papel de estas citocinas en los procesos inflamatorios y la destrucción ósea (Matos y col., 2016, 2019). Adicionalmente, la inyección de LPS en la encía de la rata produce un incremento significativo en la expresión de RANK (*receptor activator of NF-κB*) y RANKL (*receptor activator of NF-κB ligand*), una disminución en la expresión de osteoprotegerina (OPG) y un incremento de la relación RANKL/OPG

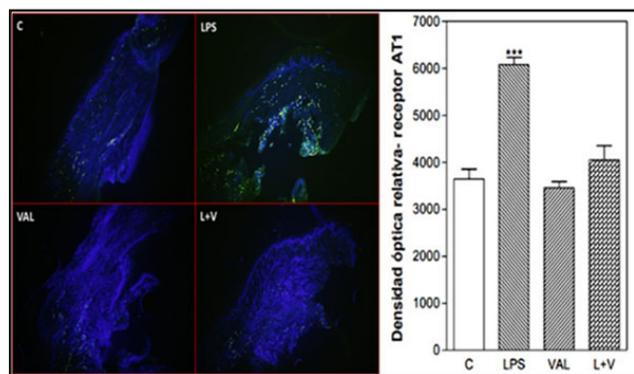


Figura 2. Inmunofluorescencia del receptor AT₁ en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación (Izquierda). Densidad óptica relativa del receptor AT₁ en la encía de rata en el grupo tratado por 7 días (Derecha). Cada barra representa la media \pm E.E.M., *** $p < 0,001$ respecto al control. C=control, LPS= lipopolisacárido (L), Val= valsartán (V).

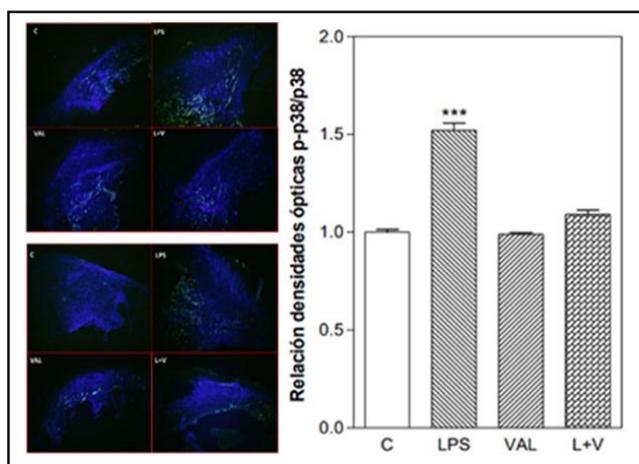


Figura 3. Inmunofluorescencia de la p-p38 MAPK (izquierdo superior) y p38MAPK (Izquierdo inferior) en la encía de rata en el grupo tratado por 7 días. Densidad óptica relativa de p-p38/p38 MAPK en la encía de rata en el grupo tratado por 7 días (Derecha). Cada barra representa la media \pm E.E.M., *** $p < 0,001$ respecto al control. C=control, LPS= lipopolisacárido (L), Val= valsartán (V).

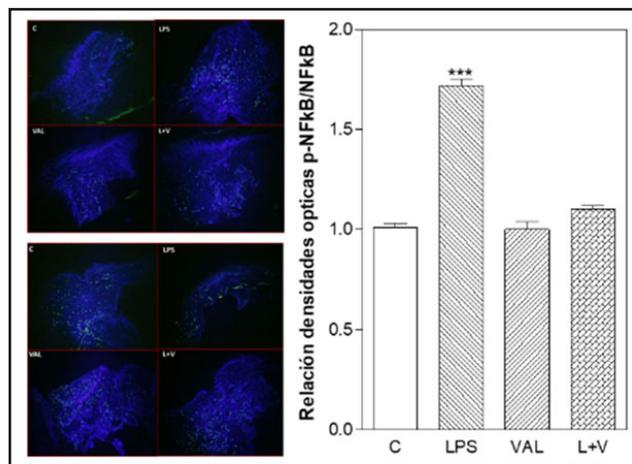


Figura 4. Inmunofluorescencia de p-NFkB (izquierdo superior) y de NFkB (Izquierdo inferior) en la encía de rata en el grupo tratado por 7 días. Densidad óptica relativa de p-NFkB/NFkB en la encía de rata en el grupo tratado por 7 días (Derecha). Cada barra representa la media \pm E.E.M., *** $p < 0,001$ respecto al control. C=control, LPS= lipopolisacárido (L), Val= valsartán (V).

(Matos y col., 2014, 2016), indicando que la alteración en la expresión de las moléculas que regulan la diferenciación y función de los osteoblastos y osteoclastos, como lo es el sistema RANK/RANKL/OPG, fundamental en la osteoclastogénesis, altera el remodelado óseo observado en la periodontitis. Adicionales al incremento de los mediadores inflamatorios, y cuando la respuesta inflamatoria aguda es insuficiente, estos mediadores estimulan a los hepatocitos a segregar proteínas de fase aguda, tales como la la Proteína C Reactiva (PCR), durante el proceso de respuesta inflamatoria crónica sistémica no específica (Medzhitov, 2007). Efectivamente, los hallazgos de Matos y col. (2016) demuestran claramente que el LPS inyectado en la encía de la rata produce un incremento significativo de los niveles de PCR en la saliva de la rata, el cual resulta ser similar a los reportados en pacientes con periodontitis (Goyal y col., 2014; Podzimek y col., 2015).

De la estimulación del eje monocito/linfocito no solo resulta la secreción de sustancias mediadoras durante las reacciones inflamatorias, sino que los leucocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular donde ejercen gran variedad de funciones biológicas. Algunas quimocinas como RANTES/CCL5 (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*, células T normales expresadas y secretadas, reguladas tras la activación), y MIP-3 α y β (*Macrophage Inflammatory Protein-3 α and β* ; Proteína inflamatoria de macrófagos-3 α y β) son especialmente quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T; entre sus efectos biológicos están que son quimiotácticas para linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos, células NK (*Natural Killer Cells*) y células dendríticas; cuyo incremento producido en el ambiente periodontal podría estar asociado al reclutamiento de células inflamatorias y la destrucción ósea periodontal. Al respecto, Matos y

col. (2019) en un grupo de animales tratados con LPS por 7 días, demostraron incrementos en la secreción de RANTES, lo que apoya el concepto del papel de las quimocinas en la EP.

Ahora bien, con el fin de 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. Efectivamente, la evidencia indica que dicha regulación ocurre ya que se observó una disminución de los niveles salivares de la IL-4 inducida por LPS, en el modelo experimental de EP en rata (Matos y col., 2019).

La activación de los receptores TLR4 proporciona el nexo entre el ambiente extracelular y la iniciación de los eventos intracelulares que activan diversos componentes de señalización. Se ha demostrado que las inyecciones de LPS activan dichos receptores (Matos y col., 2014), activándose múltiples vías de señalización en las células del periodonto, tales como fibroblastos y osteoblastos (Rossa y col., 2007). Nuestros resultados de un incremento en la expresión del receptor TLR4 en la encía de la rata con EP apoya esta posibilidad. Resultados similares han sido reportados por Buduneli y col. (2011), en pacientes con periodontitis crónica, quienes exhibieron incrementos de valores salivares y plasmáticos del TLR4. Igualmente, Sun y col. (2010), observaron un incremento en la expresión génica de TLR4 en células de ligamento periodontal humanas estimuladas con LPS, sugiriendo un papel clave para estos receptores en

la producción de citocinas inducidas por bacterias *Gram* negativas periodontales o sus LPS.

Entre las diversas moléculas de señalización que regulan las vías inflamatorias, se destacan la MAPK, debido a que su expresión aguas arriba contribuye significativamente a la regulación de la enfermedad inflamatoria (Li y col., 2011). Aunque la vía de las ERKs responde a mitógenos extracelulares y regulan la supervivencia celular, la p38 MAPK, la JNK y el NF κ B están involucradas en las respuestas ambientales al estrés, incluyendo estímulos inflamatorios. Se ha reportado que la señalización de la p38 MAPK es fundamental para la expresión de citocinas inflamatorias y citocinas inducidas por LPS, que pueden contribuir a la pérdida de hueso periodontal (Rossa y col., 2007). Igualmente, existen estudios *in vitro* que muestran la relevancia que tiene la p38 MAPK en la regulación de la expresión de IL-6, MMP-13 y NF κ B en fibroblastos y osteoclastos del tejido periodontal (Patil y col., 2004, 2006; Rossa y col., 2006, 2007). En concordancia con la evidencia, nuestros resultados demuestran que cuando se induce periodontitis con inyecciones de LPS en la encía de la rata, se produce activación de la p38 MAPK mediante un aumento de la fosforilación. El papel de la p38 MAPK queda claro cuando se demuestra que la administración oral de un inhibidor de p38 α MAPK, el SD-282, reduce la pérdida de hueso alveolar inducida por LPS periopatogénico, indicando el papel de la p38 MAPK en la producción de citocinas inflamatorias inducidas por LPS, la formación de osteoclastos y la pérdida ósea alveolar estimulada por LPS (Kirkwood y col., 2007).

La acción de la microbiota oral y sus productos puede ser necesaria, pero no suficiente para explicar las reacciones desencadenantes de la inflamación y, en el caso que nos ocupa, de la pérdida del tejido de sostén de los dientes.

Se conoce que niveles elevados de ANG II contribuyen al desarrollo de patologías como la hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis y re-estenosis después de la lesión vascular (Feng y col., 2001; Kobori y col., 2007). Estos efectos fisiopatológicos de la ANG II se han atribuido a la remodelación de los tejidos cardiovasculares consiguientes a la reorganización del citoesqueleto, la activación de células inflamatorias y la migración y el crecimiento de células músculo liso vascular y células cardíacas (Suzuki y col., 2003; de Cavanagh y col., 2009).

En estudios previos, Matos y col. (2014) han demostrado fehacientemente el papel de la ANG II en la pérdida ósea inducida por el LPS y su reversión cuando se administra el bloqueante de los receptores AT₁ de la ANG II, el valsartán. En forma similar, recientemente Dionísio y col. (2020) demostraron, en ratas sometidas a EP experimental mediante ligadura, que el tratamiento con losartán, un bloqueante del receptor AT₁, fue capaz de atenuar la pérdida de hueso alveolar debido a la reducción de citocinas inflamatorias, de regular la formación de las especies reactivas de oxígeno y revertir la destrucción del hueso alveolar manteniendo el equilibrio entre la formación ósea y los factores de reabsorción.

La evidencia indica que los efectos están mediados por el receptor AT₁, a

través de la producción de ERO y la activación de una o más serina treonina y tirosina quinasa que incluyen MAPKs (Touyz y Schiffrin, 2000; Touyz, 2004; Clempus y Griendling, 2006), ERK1/2, la p38 MAPK, y c-Jun (Kyaw y col., 2004; Ohtsu y col., 2005; Lee y col., 2007). La ANG II induce la activación de la p38 MAPK en cultivos de células de monocitos humanos (células U-937) (Yaghooti y col., 2011) y en células del músculo liso aórtico de rata (Lee y col., 2007).

Como se indicó anteriormente, existen reportes que relacionan la activación de la p38 MAPK con la pérdida ósea alveolar, sin embargo, aparentemente no existe información que relacione estos dos elementos con la ANG II y la EP. Al respecto, nuestros resultados permiten establecer la asociación entre estos eventos, ya que demuestran, mediante la inmunofluorescencia, la expresión del receptor AT₁ de la ANG II, así como de p38 MAPK en la encía de la rata. Igualmente se demuestra que la inyección de LPS en la encía de la rata fue capaz de incrementar la expresión de los receptores AT₁, la activación mediante fosforilación de la p38 MAPK, y de los valores de la densidad óptica relativa de p-p38/p38 totales. El hecho que estos efectos fueron revertidos con el bloqueo del receptor AT₁ con valsartán, sugiere fuertemente que la p38 MAPK constituye una de las vías de señalización común involucradas en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

La contribución del NFκB a la EP es mejor entendida en el contexto de las patologías inflamatorias y enfermedades autoinmunes, donde citocinas pro-inflamatorias inducen la activación del

NFkB, que a su vez, induce la producción de citocinas (Lawrence, 2009). El NFkB está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas asociadas con periodontitis, incluyendo aterosclerosis, la diabetes tipo 2, cáncer, enfermedades cardiovasculares y obesidad entre otras (Taylor y col., 2004; Demmer y Desvarieux, 2006; Rial y col., 2012). En lesiones periodontales, se ha demostrado la localización de las subunidades p50 y p65, componentes del complejo del factor NFkB, demostrándose un incremento de la actividad de estos componentes (Ambili y col., 2005). Adicionalmente, se ha observado un aumento de la relación p50/pp65 en pacientes con enfermedad periodontal (Jotwani y col., 2010). Nuestros resultados están en línea con estos hallazgos, ya que demostramos que el tratamiento con LPS por 7 días, indujo un incremento significativo en la relación pNFkB/NFkB en la encía de la rata.

Ahora bien, se sabe que existe una íntima relación entre el SRA y el factor de transcripción NFkB. Así, entre las señales intracelulares involucradas en la respuesta inflamatoria inducida por la ANG II, la activación del NFkB es de especial interés. Como un factor de transcripción primario, el NFkB responde directamente a numerosos estímulos extracelulares incluyendo LPS, ERO y ANG II. Se ha demostrado *in vitro* que la ANG II activa el NFkB en células del músculo liso vascular (CMLV) y en células mesangiales (Hernández-Presa y col., 1997). Otros estudios *in vivo* han demostrado que la infusión sistémica de ANG II aumenta la actividad del NFkB en los vasos y en el riñón, tanto en células residentes como infiltrantes (Ruiz-Ortega y col., 2006). En aorta de ratas normales y en células del músculo liso

vascular de ratones con *knockout* para el receptor AT₁, se ha demostrado que la activación del NFkB ocurre vía ambos subtipos de receptores (AT₁ y AT₂) (Ruiz-Ortega y col., 2006).

Hasta el momento no existe en la literatura reportes sobre un papel de la ANG II en la activación del NFkB en tejidos periodontales. Sin embargo, nuestros hallazgos presentes aportan evidencia prometedora ya que demuestran que el bloqueo de los receptores AT₁ con valsartán, previene el incremento de la activación del NFkB inducido por el LPS en la encía de la rata, lo que establece el posible enlace entre el proceso inflamatorio que ocurre durante la enfermedad periodontal inducida por la endotoxina bacteriana y el sistema renina angiotensina local. En apoyo a nuestros hallazgos están los resultados reportados por Sánchez-Lemus y col. (2009a) quienes demostraron que la administración periférica de LPS a roedores incrementa las citocinas pro-inflamatorias en la circulación y el bazo. Donde el candesartán, un bloqueante de los receptores AT₁, inhibió este efecto tanto en la expresión génica como a nivel de las proteínas. Los autores indican que los receptores AT₁ son esenciales para el desarrollo de una respuesta inflamatoria completa a las endotoxinas bacterianas. Estos datos sugieren que las estrategias terapéuticas que bloquean las vías de ANG II o NFkB podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio donde el sistema inmunológico se encuentra involucrado, y donde la ANG II puede mediar el proceso inflamatorio. En efecto, el bloqueo de los receptores AT₁ disminuye la inflamación inducida por LPS en diversas patologías, tipos celulares y tejidos. Efectivamente, se

demonstró que el bloqueo de los receptores AT₁ actúa disminuyendo la liberación de citocinas inflamatorias a la circulación a expensas de un aumento de citocinas anti-inflamatorias en tejidos ricos en macrófagos, en experimentos *in vivo*, en tejido periférico de ratas normotensas (Sánchez-Lemus y col., 2008, 2009a, b), así como en experimentos *in vitro* con monocitos de pacientes voluntarios normotensos (Larrayoz y col., 2009). Aun más, el candesartán puede disminuir o eliminar de la circulación los factores inflamatorios inducidos por el LPS, sin afectar la inducción de factores anti-inflamatorios. Esto disminuye significativamente el perfil pro-inflamatorio inducido por el LPS en la circulación general (Sánchez-Lemus y col., 2008, 2009a, 2009b).

Aún no ha sido totalmente esclarecido el mecanismo exacto mediante el cual se relaciona el receptor AT₁ y la inflamación inducida por el LPS en la enfermedad periodontal experimental. La evidencia apunta al receptor TLR4. Así, 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), células mesangiales (Lv y col., 2009), cultivos de células tubulares proximales murinas, células mesangiales en murinos, y podocitos murinos (Bondeva y col., 2007). Wolf y col. (2006) demostraron en células mesangiales de ratones tratados con ANG II, una regulación hacia arriba del ARNm y de la proteína del TLR4, mediado por el receptor AT₁; la pre-incubación de las células con ANG II, incrementó la activación del NFκB inducida por el LPS y la expresión de citocinas, sugiriendo que la ANG II

induce la activación del sistema inmunológico mediante mecanismos que involucran una regulación del TLR4. Igualmente, se ha propuesto la existencia de mecanismos de transactivación de los TLRs por receptores acoplados a proteínas G, así, Abdulkhalek y col. (2011, 2012) postulan un modelo, donde la cascada de señalización se inicia con la unión del LPS al TLR4 para potenciar la señalización del receptor acoplado a proteínas G vía la subunidad G α i y activación de la MMP9 (*Matrix metalloproteinase* 9) para inducir la activación de la neuraminidasa 1 (Neu1). Igualmente se ha demostrado que la ANG II es capaz de inducir la actividad de la Neu1 y de la metaloproteína 9 en líneas celulares de macrófagos y macrófagos de médula ósea de murinos, llevando a una transactivación del TLRs. En apoyo a la evidencia, están nuestros resultados presentes en los que se demuestra mediante inmunofluorescencia, que el LPS incrementa la expresión tanto de los receptores AT₁ como los TLR4 en la encía de la rata, efecto se ve revertido por el uso del valsartán, indicando la participación del SRA en los procesos inflamatorios mediados por toxinas bacterianas que activan el receptor TLR4 en la periodontitis, sugiriendo que estrategias que interfieran con la señalización de los TLR, y de células inmunes regulatorias, pueden constituir una aproximación exitosa en el restablecimiento del equilibrio de la respuesta inmune y de la conservación de los tejidos periodontales, incluido el hueso alveolar en la EP (Gu y Han, 2020).

Se necesitan estudios adicionales para determinar la exacta interacción entre los receptores de ANG II y los TLRs, sin embargo, podemos afirmar

que nuestros resultados apoyan los beneficios de los bloqueantes de los receptores AT_1 de la ANG II sobre los procesos inflamatorios en patologías tales como diabetes, aterosclerosis y como demostramos en el presente trabajo, en enfermedades orales como la periodontitis. Igualmente, nuestros hallazgos abren nuevas posibilidades terapéuticas en el uso de los bloqueantes del receptor AT_1 en el tratamiento de la EP y 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

- Abdulkhalek S, Amith S, Franchuk S, Jayanth P, Guo M, Finlay T, Gilmour A, Guzzo C, Gee K, Beyaert R, Szewczuk MR. 2011. Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for Toll-like receptor activation and cellular signaling. *J Biol Chem* 286(42): 36532–36549.
- Abdulkhalek S, Guo M, Amith S, Jayanth P, Szewczuk M. 2012. G-protein coupled receptor agonists mediate Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk to induce transactivation of TOLL-like receptors and cellular signaling. *Cell Signal* 24(11): 2035–2042.
- AlQallaf H, Hamada Y, Blanchard S, Shin D, Gregory R, Srinivasan M. 2018. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. *PLoS One* 13(12): e0200231.
- Ambili R, Santhi W, Janam P, Nandakumar K, Pillai M. 2005. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol* 76(7): 1148–1153.
- Beinke S, Ley S. 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 382(Pt 2): 393–404.
- 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): 308–314.
- Buduneli N, Özçaka Ö, Nalbantsoy A. 2011. Salivary and plasma levels of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in chronic periodontitis. *J Periodontol* 82(6): 878–884.
- Carrillo de Albornoz Sainz A, García Kass A, Bascones Martínez A. 2006. Papel de la IL-6 y TNF- α en la enfermedad periodontal. *Avances Periodon Implantol Oral* 18(2): 83–89.
- Chen B, Lin W. 2001. PKC- and ERK-dependent activation of I κ B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. *Br J Pharmacol* 134(5): 1055–1065.
- Clempus R, Griendling K. 2006. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 71(2): 216–225.
- Código de bioética y bioseguridad sobre el manejo de animales de experimentación del Ministerio de Ciencias y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela. Disponible en: <https://www.uis.edu.co/webUIS/es/investigacion/Extension/comiteEtica/normatividd/documentos/otraNormatividad/16BioeticaVenezuela2002.pdf>
- Dionísio TJ, Souza GP, Colombini-Ishikiriama BL, Garbieri TF, Parisi VA, Oliveira GM, Canol P, Rodini CO, Oliveira SH, Greene AS, Santos CF. 2020. AT_1 receptor antagonism promotes bone loss attenuation in experimental periodontitis, blocks inflammatory mediators, and upregulates antioxidant enzymes and bone formation markers. *J Periodontol* 91(4): 533–544.
- De Cavanagh E, Ferder M, Inserra F, Ferder L. 2009. Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(3): H550–H558.
- Demmer R, Desvarieux M. 2006. Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart

- of the matter. *J Am Dent Assoc* 137 Suppl: 14S–20S.
- Feng T, Ying W, Hua R, Ji Y, de Gasparo M. 2001. Effect of valsartan and captopril in rabbit carotid injury. Possible involvement of bradykinin in the antiproliferative action of the renin-angiotensin blockade. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2(1): 19–24.
- Graves D. 2008. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79(8 Suppl): 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(1): 12–16.
- Goyal L, Bey A, Gupta N, Sharma V. 2014. Comparative evaluation of serum C-reactive protein levels in chronic and aggressive periodontitis patients and association with periodontal disease severity. *Contemporary Clin Dent* 5(4): 484–488.
- Gu Y, Han X. 2020. Toll-Like receptor signaling and immune regulatory lymphocytes in periodontal disease. *Int J Mol Sci* 21(9): 3329.
- Hajishengallis G. 2015. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 15(1): 30–44.
- Hernández-Flórez D, Valor L. 2016. Los inhibidores de las proteínas-cinasas en enfermedades auto-inmunes e inflamatorias: presente y futuro de nuevas dianas terapéuticas. *Reumatol Clin* 12(2): 91–99.
- Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. 1997. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95(6): 1532–1541.
- Ilango P, Mahalingam A, Parthasarathy H, Katamreddy V, Subbareddy V. 2016. Evaluation of TLR2 and 4 in chronic periodontitis. *J Clin Diagn Res* 10(6): ZC86–ZC89.
- Ivashkiv L, Zhao B, Park-Min K, Takami M. 2011. Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8. *Ann N Y Acad Sci* 1237: 88–94.
- 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.
- Jotwani R, Moonga B, Gupta S, Cutler C. 2010. Nuclear factor-kappa B p50 subunits in chronic periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* 1192: 278–285.
- 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-κB activation by genistein in the kidneys of male rats during aging. *Biogerontology* 12(6): 537–550.
- 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-κB through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)* 34(1): 11–25.
- Kirkwood K, Li F, Rogers J, Otremba J, Coatney D, Kreider J, D'Silva N, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter A, Medicherla S. 2007. p38-alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 320(1): 56–63.
- Kobori H, Nangaku M, Navar L, Nishiyama A. 2007. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathophysiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59(3): 251–287.
- Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kagami S, Izawa Y, Fujita Y, Ali N, Kanematsu Y, Toida K, Ishimura K, Tamaki T. 2004. Src and Cas are essentially but differentially involved in angiotensin II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Mol Pharmacol* 65(4): 832–841.
- Labandeira-Garcia J, Rodríguez A, Garrido P, Rodríguez J, Lanciego J, Guerra M. 2017. Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration. *Front 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.
- Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6): a001651.
- Lee H, Lee C, Lee S, Roh H, Bae Y, Lee K, Lim J, Park P, Park T, Lee Y, Won K, Kim B. 2007. p38 mitogen-activated protein kinase contributes to angiotensin II-stimulated migration of rat aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci* 105(1): 74–81.
- Li M, Liu J, Han C, Wang B, Pang X, Mao J. 2011. Angiotensin II induces the expression of C-reactive protein via MAPK-dependent signal pathway in U937 macrophages. *Cell Physiol Biochem* 27(1): 63–70.
- Lv J, Jia R, Yang D, Zhu J, Ding G. 2009. Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 380(1): 81–86.
- 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 UCV* 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 UCV* 79(1 y 2): 17–27.
- Matos M, Israel A, Billet E, Garrido M. 2019. Efecto del valsartán sobre los niveles de citocinas y quimiocinas salivales en la enfermedad periodontal experimental. *Rev Fac Farm UCV* 80(1 y 2): 27–45.
- Matos M, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido M. 2014. El valsartán previene la resorción ósea en la periodontitis experimental. *Rev Periodoncia Osteointegr* 24(4): 289–295.
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449 (7164): 819–882.
- Ohtsu H, Mifune M, Frank G, Saito S, Inagami T, Kim-Mitsuyama S, Takuwa Y, Sasaki T, Rothstein J, Suzuki H, Nakashima H, Woolfolk E, Motley E, Eguchi S. 2005. Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(9): 1831–1836.
- Pan W, Wang Q, Chen Q. 2019. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci* 11(3): 30, 13 pp.
- Patil C, Rossa C Jr, Kirkwood K. 2006. *Actinobacillus actinomycetes comitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 21(6): 392–398.
- Patil C, Zhu X, Rossa C Jr, Kim Y, Kirkwood K. 2004. p38 MAPK regulates IL-1 β induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest* 33(2): 213–233.
- 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.
- 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(9): 679–683.
- Rial N, Choi K, Nguyen T, Snyder B, Slepian M. 2012. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B): a novel cause for diabetes, coronary artery disease and cancer initiation and promotion? *Med Hypotheses* 78(1): 29–32.
- Rossa C, Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood K. 2006. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1 β and TNF- α -induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res* 26(10): 719–729.
- Rossa CJr, Liu M, Bronson P, Kirkwood K. 2007. Transcriptional activation of MMP13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. *J Endotoxin Res* 13(2): 85–93.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez E, Rodríguez J, Carvajal G, Egido J. 2006. Renal and vascular hypertension induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(2): 159–166.
- Sánchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz 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.
- 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.
- Santos C, Akashi E, Dionísio 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(1): 130–139.
- Santos C, Morandini A, Dionísio T, Faria F, Lima M, Figueiredo C, Colombini-Ishikirama B, Sipert C, Maciel R, Akashi A, Souza G, Garlet G, Rodini C, Amaral S, Becari C, Salgado M, Oliveira E, Matus I, Didier D, Greene A. 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.
- Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-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-Neto C. 2007. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regul Pept* 140(1-2): 27–31.
- Sun Y, Shu R, Li C, Zhang M. 2010. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-Like Receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 81(10): 1488–1496.
- Suzuki Y, Ruiz M, Gomez C, Tomino Y, Egido J. 2003. Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? *Nephrol Dial Transplant* 18(8): 1423–1426.
- Taylor G, Manz M, Borgnakke W. 2004. Diabetes, periodontal diseases, dental caries, and tooth loss: a review of the literature. *Compend Contin Educ Dent* 25(3): 179–192.
- Touyz R, Schiffrin E. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52(4): 639–672.
- Touyz R. 2004. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37(8): 1263–1273.
- Tsan M, Gao B. 2004. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76(3): 514–519.
- Villa P. 2015. Enfoque salubrista de la enfermedad periodontal. *Rev Iberoamer Ci* 2(4): 179–189.
- Wallach D, Varfolomeev E, Malinin N, Goltsev Y, Kovalenko A, Boldin M. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331–367.
- 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.
- Yaghooti H, Firoozrai M, Fallah S, Khorramizadeh M. 2011. Angiotensin II induces NFκB, JNK and p38 MAPK activation in monocytic cells and increases matrix metalloproteinase-9 expression in a PKC- and rho kinase-dependent manner. *Braz J Med Biol Res* 44(3): 193–139.

Recibido: 01/09/2020
Aceptado: 27/10/2020