



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

POSTGRADO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

**EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES AT1
DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA ENFERMEDAD
PERIODONTAL INDUCIDA POR INYECCIONES DE
LIPOPOLISACÁRIDOS EN RATAS.**

**Autor: Odontóloga
María Gabriela Matos Uzcátegui.**

**Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela para optar por el título de Doctor en Ciencias,
mención Farmacología**

**Tutora: Dra. María del Rosario Garrido
Octubre 2012**

**A MIS PADRES PEDRO Y YOLANDA
A MI ESPOSO ALEXIS
A MI HIJA ARIADNA**

AGRADECIMIENTOS

Agradecerle a Dios por siempre acompañarme y guiarme por los caminos de la vida, quien me dio la fe, fortaleza, salud y esperanza para terminar este trabajo.

A mis padres PEDRO y YOLANDA, motor y pilar fundamental de mi vida, que con su apoyo incondicional, amor, y comprensión me han ayudado a alcanzar otra meta, gracias por haber estado cuando más lo necesitaba al darme palabras de aliento y por sembrar en mí el interés por el conocimiento. Mi triunfo es de ustedes. ¡GRACIAS!

A mi esposo ALEXIS por ser siempre tan paciente y comprensivo, gracias por estar y no dejarme caer, gracias por respetar mis decisiones y, espero algún día retribuirle el tiempo y el amor que has tenido por mí, gracias por esperarme alegre y cariñoso todos los días.

A mi hija ARIADNA que nació en la realización de esta tesis y vino a mi vida a llenarme de mucha alegría en los momentos difíciles y quien me prestó el tiempo que le pertenecía para terminar.

A mi tutora, Dra. MARIA DEL ROSARIO GARRIDO, gracias por la oportunidad ofrecida, sin su valioso apoyo, enseñanzas, dedicación y confianza, esta tesis no hubiera sido posible, gracias por sus sabios consejos de vida y por su gran calidad humana. ¡Siempre agradecida!

A la Dra. ANITA STERN por su receptividad y su valiosa orientación. Mil gracias por todo su apoyo.

A la Dra. MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN por su incansable labor frente a la coordinación del Post-Grado y por todas sus enseñanzas y buenos consejos.

A la Dra. YAIRA MATHISON gracias por su amistad y todo su apoyo.

Al Dr. MARCO ÁLVAREZ, la Sra. LOURDES PERDOMO, de la sección de Microscopia Electrónica, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina Universidad Central de Venezuela por su apoyo, amistad, enseñanzas y colaboración en la elaboración de esta tesis.

El Dr. JESÚS DEL CASTILLO y FREDDY GONZÁLEZ del Bioterio del IVIC por la colaboración para realizar esta tesis.

A mis amigos: ELSA, MARIELLA, MAIDER, CARLOS, JOSÉ ANTONIO, ANA MARIA Y JUAN MANUEL, GAZZZEN, LETICIA, ELODIE, BANY con quienes trabaje gratamente y vivimos momentos inolvidables de mucho crecimiento personal y profesional gracias por todo su apoyo y ayuda.

A mi querida Universidad Central de Venezuela, a la facultad de Odontología donde me forme como Odontóloga y ahora a la facultad de Farmacia por abrirme las puertas para la realización de mi Doctorado.

A Misión Ciencia (FONACIT-MPPCT) No. 2007001585 y CDCH PI- 06-7368-2008-1 y CDCH PG-007349-2001 etapas 1 y 2 por los financiamientos otorgados para la realización de esta tesis.

A todos mil ¡GRACIAS!

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN	
1. Enfermedad Periodontal	
1.1. Aspectos Generales.....	1
1.2. Patogénesis de la Enfermedad periodontal.....	5
1.3. Etiología microbiana.....	5
1.3.1. Factores de virulencia.....	8
1.4. Sistema Inmune.....	12
1.4.1. Receptores similares a Toll.....	16
1.4.2. NFkB.....	21
1.5. Resorción ósea	
1.5.1. Generalidades.....	23
1.5.2. Sistema RANK/RANKL/OPG.....	25
2. Especies reactivas de oxígeno y Enfermedad periodontal.....	30
2.1. Enzimas antioxidantes.....	34
2.2. Óxido nítrico.....	37
3. Sistema renina angiotensina.....	38
3.1. ANG II y ERO.....	46
OBJETIVOS.....	48

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y protocolos de experimentación.....	50
Inducción de la periodontitis.....	50
Obtención y procesamiento de la mucosa.....	52
Determinación de la variación de peso corporal.....	53
Determinación de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca.....	53
Recuento de leucocitos.....	54
Recuento diferencial de leucocitos.....	55
Estudios histológicos.....	55
Tinción de Tricrómico de Masson.....	56
Tinción de Von Kossa.....	57
Determinación del número de osteoclastos.....	57
Determinación de la movilidad dentaria.....	59
Determinación de la variación peso corporal.....	59
Determinación de la actividad de la NOS.....	59
Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes:	
Determinación de la actividad de la CAT.....	60
Determinación de la actividad de la SOD.....	60
Determinación de la actividad de la GPX.....	61
Determinación del malondialdehído como expresión de la peroxidación lipídica.....	62
Evaluar el papel de la NAD(P)H oxidasa y la producción de ERO en la periodontitis inducida por LPS en la rata.....	62
Determinación de la proteína C reactiva.....	63

Determinación de los marcadores de inflamación.....	64
Inmunofluorescencia.....	66
Determinación de proteínas totales.....	68
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68
RESULTADOS.....	69
DISCUSIÓN.....	108
ERO.....	115
CITOCINAS.....	130
QUIMIOCINAS.....	151
SISTEMA RANK/RANKL/OPG.....	160
TLRs.....	166
p38 MAPK Y NFkB.....	170
BIBLIOGRAFÍA.....	190

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Periodonto.....	4
Figura 2. Estructura del lipopolisacárido.....	9
Figura 3. Vía de señalización de los receptores TLRs.....	19
Figura 4. Vías de activación del Sistema RANK/RANKL/OPG.....	28
Figura 5. Inducción de la periodontitis y esquema de tratamiento.....	51
Figura 6. Definición del área de estudio, para la proyección de los cortes histológicos.....	58
Figura 7. Representación esquemática del flujo de trabajo del ensayo a través del Bio-Plex.....	66
Figura 8. Variación del peso corporal.....	70
Figura 9. Presión arterial media.....	71
Figura 10. Recuento de leucocitos.....	73
Figura 11. Registros fotográficos de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas. Aspectos macroscópicos.....	74
Figura 12. Aspecto microscópico donde se representa el área de pérdida e histograma de Tinción de Hematoxilina y eosina.....	75
Figura 13. Registros histológicos. Tinción con Tricrómico de Masson.....	77
Figura 14. Registros histológicos. Tinción de Von-Kossa.....	78
Figura 15. Aspecto microscópico de la presencia de osteoclastos y osteoblastos.....	80
Figura 16. Recuento de osteoclastos.....	80
Figura 17. Actividad de la NOS.....	82
Figura 18. Actividad de CAT, SOD, GPx a los 7 días de tratamiento.....	84
Figura 19. Actividad de CAT, SOD, GPx a los 14 días de tratamiento.....	84

Figura 20. Concentración de malondialdehído como expresión de la peroxidación lipídica.....	85
Figura 21. Efecto de la administración de Apocinina sobre la actividad de CAT, SOD y GPx.....	86
Figura 22. Efecto de la administración del Tempol sobre la actividad de CAT, SOD y GPx.....	87
Figura 23. Determinación de la proteína C reactiva.....	88
Figura 24. Concentración de IL-1 α en saliva.....	90
Figura 25. Concentración de IL-1 β en saliva.....	90
Figura 26. Concentración de IL-6 en saliva.....	91
Figura 27. Concentración de TNF- α en saliva.....	91
Figura 28. Concentración de IL-4 en saliva.....	92
Figura 29. Concentración de IL-10 en saliva.....	92
Figura 30. Concentración de IL-18 en saliva.....	93
Figura 31. Concentración de IL-12 en saliva.....	93
Figura 32. Concentración de IL-17 en saliva.....	94
Figura 33. Concentración de MIP-3 α en saliva.....	94
Figura 34. Concentración de RANTES en saliva.....	95
Figura 35. Inmunofluorescencia del receptor AT1.....	98
Figura 36. Densidad óptica relativa de los receptores AT1.....	98
Figura 37. Inmunofluorescencia del RANKL.....	99
Figura 38. Densidad óptica relativa del RANKL.....	99
Figura 39. Inmunofluorescencia del receptor señuelo OPG.....	100
Figura 40. Densidad óptica relativa del receptor señuelo OPG.....	100

Figura 41.	Relación de las densidades ópticas relativas de RANKL/OPG.....	101
Figura 42.	Inmunofluorescencia del receptor RANK.....	102
Figura 43.	Densidad óptica relativa del receptor RANK.....	102
Figura 44.	Inmunofluorescencia del receptor TLR4.....	103
Figura 45.	Densidad óptica relativa del receptor TLR4.....	103
Figura 46.	Inmunofluorescencia de p38 MAPK.....	104
Figura 47.	Inmunofluorescencia de p-p38 MAPK.....	104
Figura 48.	Densidades ópticas relativas de p-p38/p38 total.....	105
Figura 49.	Inmunofluorescencia de NFkB.....	106
Figura 50.	Inmunofluorescencia de p-NFkB.....	106
Figura 51.	Densidades ópticas relativas de p-NFkB/NFkB.....	107

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology, INC.....	67
Tabla II.	Variación del peso corporal.....	70
Tabla III.	Recuento diferencial de leucocitos.....	73
Tabla IV.	Variación de la densidad de los histogramas en todos los grupos con la tinción de Tricrómico de Masson.....	77
Tabla V.	Variación de la densidad de los histogramas en todos los grupos con la tinción de Von-Kossa.....	78
Tabla VI.	Grado de movilidad dentaria.....	81
Tabla VII.	Valores de las enzimas antioxidantes en los cuatro grupos de experimentación.....	83
Tabla VIII.	Valores de las citocinas en los cuatro grupos experimentales.....	89
Tabla IX.	Valores de la determinación de los receptores AT1, RANK, OPG y TLR4, así como la del RANKL, p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFkB y p-NFkB mediante inmunofluorescencia.....	97

ABREVIATURAS

AAP	Academia Americanana de Periodontología
ANGII	Angiotensina II
AP-1	Proteína activadora 1
APO	Apocinina
AT1R	Receptor AT1 de la Angiotensina II
CAT	Catalasa
CC-5 o RANTES	Quimocina CC5
CD14	Células presentadoras de antígeno provenientes de células dendríticas 14
CD83+	Células presentadoras de antígeno provenientes de células dendríticas 83
CMLV	Células de músculo liso vascular
CuZn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre
DAMPs	Danger associated molecular patterns
ECA	Enzima convertidora de Angiotensina
eNOS	Sintasa del Oxido Nítrico endotelial
EP	Enfermedad periodontal
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ET-1	Endotelina 1
FC	Frecuencia Cardíaca
FGC	Fluido gingival crevicular
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH:GSSG	Glutación reducido/glutación oxidasa
G α i	Sub-unidad α inhibidora de la proteína G
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HOCL	Ácido hipoclorico
Hsp27	Proteína de choque térmico 27
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
I κ B	Proteína inhibidora de NF κ B
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INF	Interferon
iNOS	Sintasa de oxido nítrico inducible
JNK	c-Jun N-terminal kinases
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina
LPB	Proteína soluble unidora de LPS
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	Proteín quinasas activadas por mitogenos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDA	Malondialdehído
MIP-3 α /CCL20	Macrophage inflammatory protein-1 alfa
MMPs	Metaloproteinasas
mNOS	Sintasa del oxido nítrico mitocondrial
Mn-SOD	Superoxido dismutasa dependiente de magnesio

MPO	Mieloperoxidasa
MyD88, TRIF	Proteínas adaptadoras
NAD(P)Hox	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato en su forma reducida
Neu-1	Neuraminidasa 1
NFATc1	Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático 1
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
nNOS	Sintasa del oxido nítrico neuronal
NOS	Sintasa de la oxido nitrico
NOX4	Sub unidad 4 de la NAD(P)Hox
O ₂	Molécula de oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OAF	Factor activador de osteoclastos
ODNs	Oligodesoxinucleotidos señuelos
ON	Oxido Nítrico
OPG	Osteoprotegerina
p38	p38 mitogen-activated protein kinases
P450	Citocromo P450
p50/p65	Sub unidades de NFkB
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAM	Presión arterial media
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PAS	Presión arterial sistólica
PCR	Proteína C reactiva
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Protein Kinasa C
PMN	Polimorfonucleares
PPAR-gamma	Receptor activador del proliferador de peroxisoma gamma
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa-B
RANKL	Ligando de unión al receptor activador del factor nuclear kappa-B
RANTES/CCL5	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
SODs	Superóxido dismutasa
SRA	Sistema Renina Angiotensina
STAT-3	Transductores de señal y activadores de la transducción 3
STAT-5	Transductores de señal y activadores de la transducción 5
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante- beta 1
Th1	T helper cells 1
Th2	T helper cells 2
THM	Tsakuba hypertensive mouse
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
TIRA o MAL	Proteínas adaptadoras
TLRs	Receptores similares a Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- alfa
TNF-β	Factor de necrosis tumoral- beta
TRAM y SARM	Proteínas adaptadoras
TRAP+	Fosfatasa ácida tartrato resistente
Treg	Células T regulatorias
VAL	Valsartán
VCAM-1	Moléculas de adhesión vascular 1

RESUMEN

La Enfermedad Periodontal (EP) es una condición inflamatoria progresiva que afecta los tejidos que soportan y rodean a los dientes. Las endotoxinas bacterianas como los lipopolisacáridos (LPS), inducen una cascada inflamatoria causando resorción ósea mediante la producción y modulación de la red de citoquinas del tejido periodontal, del sistema RANK-RANKL-OPG y de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Siendo la vía final la activación del factor de transcripción NFκB para el control de la infección.

Se sabe que el Sistema Renina Angiotensina (SRA) esta involucrado en la inflamación. Estas acciones pro-inflamatorias de la Ang II son producidas por la activación de NFκB mediante los receptores AT₁, y por la generación de ERO.

Nuestro objetivo fue determinar si la inhibición del receptor AT1 con el uso del valsartán reduciría la respuesta inmunitaria innata inflamatoria en un modelo de EP inducida por las inyecciones de LPS en la encía de las ratas. Nuestros resultados demuestran que el Valsartán disminuyó la leucocitosis sistémica, la movilidad dentaria, atenuó la pérdida de peso corporal de las ratas, disminuyó la formación de enzimas antioxidantes y NOS, redujo la producción y liberación de citocinas pro inflamatorias y aumentó las citocinas antiinflamatorias, disminuyó la activación de p-p38, p-NFκB y la expresión de los receptores TLR4. El Valsartán también revirtió los efectos del LPS sobre la resorción ósea ya que disminuyó el número de osteoclastos, la expresión de los receptores RANK/RANKL/OPG y la relación RANKL/OPG y aumentó los depósitos de calcio y colágeno.

Los mecanismos por los cuales el Valsartán reduce los efectos inflamatorios producidos por el LPS no están claras, pero la interferencia del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa con apocinina y el Tempol, indica que el Valsartán puede interferir con los pasos para el reconocimiento de LPS y su asociación con TLR4. Concluyéndose que las ERO participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el AT1R. Este estudio ayuda a dilucidar el papel del SRA en procesos inflamatorios. Además contribuye con sus resultados a ofrecer una alternativa terapéutica en el tratamiento de la EP.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad Periodontal

1.4. Aspectos Generales

Las enfermedades gingivales y periodontales en sus diferentes manifestaciones han hecho padecer a la humanidad desde principios de la historia. Estudios de la paleopatología indican que la enfermedad periodontal destructiva afectó al hombre antiguo en culturas tan diversas como el antiguo Egipto y la América precolombina. Los documentos históricos más antiguos que tratan de temas médicos revelan el conocimiento de la enfermedad periodontal y la necesidad de tratarla (Gerald y Carranza, 1993).

En el año 2001, la Academia Americana de Periodontología (AAP) define a la periodontitis crónica (*peri* = alrededor, *odont* = diente, *itis* = inflamación), como una patología de naturaleza infecciosa, crónica, inflamatoria y destructiva, la cual es considerada la más común de las enfermedades periodontales. En los Estados Unidos, 48% de los adultos entre 35 y 44 años de edad han padecido gingivitis y 15% de los adultos mayores de 30 años tienen enfermedad periodontal destructiva (Nguyen y Martin, 2008). En Venezuela, esta enfermedad representa la segunda causa de pérdida dentaria, después de las caries, y ambas se consideran problemas de Salud Pública (Fundacredesa, 1987).

El término enfermedad periodontal (EP) se refiere en estricto rigor a todas las enfermedades que pueden afectar al periodonto definiéndose éste como el tejido de protección y de inserción o apoyo del diente; el periodonto se compone de la

enciá, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar. La función del periodonto es muy importante, pues el hecho de que un diente esté firmemente sujeto es básico para su buen funcionamiento ya que las fuerzas de la masticación son bastante notables. Además, el periodonto tiene una función sensitiva, ya que capta las sensaciones de presión que afectan al diente, produciéndose un estímulo a través de las inervaciones del mismo y una respuesta refleja como mecanismo de defensa (Baelum, 2003).

La encía o gíngiva recubre al hueso alveolar y termina por unirse directamente al diente, de hecho, se podría considerar una parte de la mucosa bucal que se ha especializado y se ha hecho más fibrosa para facilitar la unión a los dientes y para resistir las presiones de los alimentos durante la masticación (Lindhe y Karring, 2000).

El espacio virtual entre el diente y la encía mantiene y libera un líquido seroso denominado fluido gingival crevicular (FGC). Este FGC es un exudado inflamatorio con un alto contenido en sustancias de defensa inmune contra agentes infecciosos que pudieran colonizar el periodonto y cuya principal función es el arrastre de detritos y microbios. El FGC secretado se une a la secreción de las glándulas salivales para formar la saliva total (Lindhe y Karring, 2000).

El ligamento periodontal es la estructura de tejido conectivo blando, muy vascularizado y celular que rodea la raíz y la conecta con el hueso. Continúa con el tejido conectivo de la encía y es un tejido formado por fibras de diferentes

tipos, unas más elásticas y otras más rígidas según su función ya que gracias a estas fibras, el diente está firmemente unido al hueso pero no completamente pegado. El hecho de que el diente no esté anquilosado en el hueso le confiere propiedades mecánicas excelentes, con un cierto grado de movilidad, que lo hace más resistente y eficaz para las fuerzas de la masticación (Lindhe y Karring, 2000).

El cemento radicular ancla las fibras del ligamento periodontal a la raíz. Es el tejido mesenquimatoso calcificado que forma la cubierta externa de la raíz anatómica (desde la unión amelocementaria hasta el ápice) y tapiza el ápice del conducto radicular (Lindhe y Karring, 2000).

El hueso alveolar es la parte de los huesos maxilares que se encarga de acoger a los dientes los cuales se incluyen en los espacios llamados alvéolos. La razón de ser del hueso alveolar son los dientes, es decir, que cuando no hay dientes el hueso alveolar va desapareciendo por atrofia. El diente, se une al hueso mediante fibras que son principalmente las del ligamento periodontal. El hueso alveolar no es una excepción a nivel de la fisiología ósea, aún en un estado de equilibrio se produce continuamente osteogénesis, por parte de los osteoblastos, y resorción ósea, por parte de los osteoclastos (Lindhe y Karring, 2000) (Figura 1).

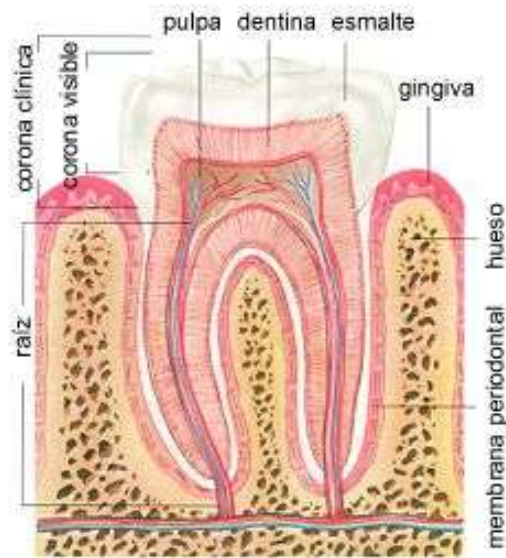


Figura 1. Periodonto.
Fuente: abadendentistas.com

1.2. Patogénesis de la Enfermedad periodontal

La patogénesis de la EP es un proceso secuencial que se inicia con la infección del surco gingival por bacterias gramnegativas anaerobias (estrictas o facultativas), seguida por la formación del saco periodontal, debida a la migración apical del epitelio del surco, la destrucción del tejido conectivo y la pérdida de hueso alveolar (Nguyen y Martin, 2008; Cochran, 2008). Aunque su etiología es infecciosa, el curso y la virulencia de la enfermedad dependen de la interacción entre la microbiota residente y la respuesta inducida del hospedador, la cual juega un papel preponderante en la periodontitis crónica (Van Dyke y Dave, 2005; Van Dyke, 2008).

1.3. Etiología microbiana

La etiología microbiana de la EP ha estado en discusión desde 1890, cuando se realizó la observación de microorganismos asociados a la pulpa dental inflamada

(Skucaitè y col., 2009). Es reconocido, que la presencia de placa es requisito fundamental para que se origine un problema gingival y la eliminación de ésta es básica para la remisión de la afección. Actualmente, y pese a que se ha establecido plenamente el origen bacteriano de la EP, sigue persistiendo la duda sobre que bacteria o bacterias causan la alteración periodontal (Marsh y Martin, 2000).

A medida que la placa dental subgingival se acumula, se induce un cambio en su microflora, que se transforma de predominantemente grampositiva a predominantemente gramnegativa (Skucaitè y col., 2009). Las endotoxinas de las bacterias gramnegativas, más otros metabolitos bacterianos en la placa dental, inducen una cascada inflamatoria que causa pérdida en la altura de la cresta ósea (Page y col., 1997). La asociación entre la microflora gramnegativa y la pérdida ósea es de suma importancia puesto que la pérdida de la cresta ósea alveolar es un evento característico en la progresión de la EP que involucra un desequilibrio entre la formación y la resorción óseas (Fleisch, 1997).

Se han encontrado más de 500 especies de bacterias en infecciones orales, sin embargo solo unas cuantas son consideradas patógenas y la mayoría de ellas de baja virulencia, esto es consistente con la naturaleza lentamente progresiva de la EP (Skucaitè y col., 2009). Entre los patógenos implicados en el desarrollo de la EP, han sido señalados bacterias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella loescheii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*,

Peptostreptococos, *Treponema sp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y son consideradas como indicadores de riesgo para la progresión de dicha enfermedad (Van Dyke y Dave, 2005; Skucaiè y col., 2009).

La naturaleza específica de la microbiota de la placa dental es fundamental en la etiología y patogénesis de la EP. No obstante, investigaciones realizadas por diversos autores (Genco 2000), establecen que existe una serie de factores de riesgo que pueden predisponer a los individuos a desarrollar esta enfermedad, tales como sexo, raza, edad, hábito de fumar, inadecuada higiene bucal, desnutrición, estrés, y el nivel socioeconómico de los individuos. Asimismo, algunas enfermedades sistémicas, como la Diabetes Mellitus, estados de inmunosupresión (SIDA, leucemias) y otras enfermedades como Tumores, Síndrome de Down, Síndrome de Papillón Lefevré, Síndrome de Chediak-Higashi, la enfermedad de Addison, también favorecen el desarrollo de esta enfermedad ya que disminuyen la capacidad del hospedador para combatir la infección, agravando la pérdida ósea (Van Dyke y Dave, 2005).

Adicionalmente, la EP se considera también un factor de riesgo potencial para el desarrollo de eventos coronarios como el infarto de miocardio, la cardiopatía isquémica, eventos cardiovasculares y la arteroesclerosis coronaria lo cual ha sido sustentado por varios postulados en los cuales el proceso inflamatorio característico de ambas entidades pudiera explicar el nexo (Bermúdez y col., 2003).

1.3.1. Factores de virulencia

El papel de las bacterias en la patogénesis de la EP está basado en los factores de virulencia que son capaces de alterar el sistema de defensa del hospedero, por la habilidad de atacar las células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular, por la acción de proteasas, collagenasas, endotoxinas, inhibidores quimiotácticos, sustancias metabólicas tóxicas, proteínas inmunosupresoras, etc. (Gajardo y col., 2005).

Los factores de virulencia bacterianos incluyen componentes estructurales y productos liberados. Entre las estrategias que contribuyen a la patogenicidad bacteriana está la habilidad de reunirse en co-agregados y formar biopelículas (múltiples capas de células microbianas pegadas para constituir comunidades microbianas altamente resistentes, tanto a los fagocitos como a los antibióticos) (Siqueira y Rôças, 2007). Las bacterias periodontopatogénicas poseen materiales bioactivos tales como peptidoglicanos, proteínas de la membrana externa, lipopolisacáridos (LPS), cápsulas y fimbrias en su superficie celular, estos materiales inducen excesiva producción de citocinas y pueden asimismo, modular la red de citocinas del tejido periodontal (Wang y Ohura, 2002).

Aunque los LPS de las bacterias Gram- comprenden diversos grupos de sustancias, las moléculas de LPS están localizadas en la cara exterior de la membrana externa bacteriana y consisten en un polisacárido hidrofílico subdividido en una cadena polisacárida (O-polisacárido, O-antígeno), el núcleo oligosacárido el cual se une directamente al lípido A, normalmente contiene

azúcares tales como heptosa y ácido 3-deoxi-D-mannooctulosónico (también conocido como ceto-deoxioctulosonato o KDO por sus siglas en inglés) y un componente glicolípido, hidrofóbico, denominado Lípido A. El lípido A está constituido por una glucosamina fosforilada unida a múltiples ácidos grasos. Estas cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos anclan el LPS a la membrana bacteriana, mientras que el resto se proyecta desde la superficie celular. La molécula de LPS es virtualmente no tóxica cuando está incorporada a la membrana bacteriana, sin embargo cuando la célula bacteriana es lisada por el sistema inmune, fragmentos de membrana que contiene el lípido A son expuestos a la célula huésped dando lugar a un amplio rango de eventos biológicos; si el mismo es liberado a la circulación, ocasiona fiebre, diarrea, y hasta shock endotóxico fatal (shock séptico). (Wang y Ohura, 2002; Raetz y Whitfield, 2002; Siqueira y Rôças, 2007; Wang y Quinn, 2010; Bascones y col., 2009) (Figura 2).

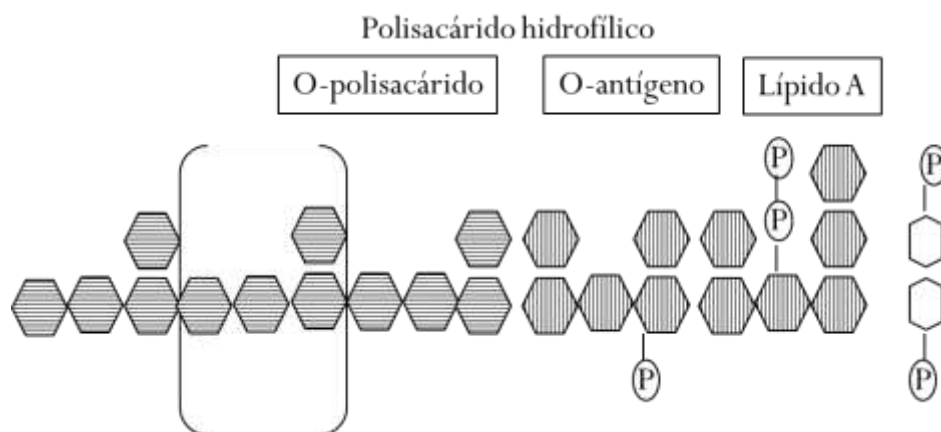


FIGURA 2. Estructura del lipopolisacárido.
Fuente: pathmicro.med.sc.edu

Los LPS bacterianos han sido considerados como un componente patogénico importante en el inicio y desarrollo de la EP. Se ha demostrado que LPS de bacterias gramnegativas tales como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, están asociados con la enfermedad periodontal tanto en humanos como en ratas (Ramamurthy y col., 1985), estimulando la resorción ósea *in vitro* (Amano y col., 1997) e *in vivo* (Orcel y col., 1993).

Una de las células blanco del LPS es el fibroblasto gingival, el cual juega un importante papel en el remodelado de los tejidos blandos periodontales. El fibroblasto, bajo el estímulo del LPS sintetiza moléculas que incluyen metaloproteinasas (MMPs) de la matriz extracelular (Cury y col., 1988) y la expresión de moléculas de adhesión celular en los tejidos gingivales, además de diversas citocinas, las cuales a su vez disparan las respuestas involucradas en los procesos inmuno-inflamatorios (Wang y Ohura, 2002). El LPS puede igualmente, inducir la activación de macrófagos y éstos excretar enzimas lisosómicas, óxido nítrico (ON), radicales de oxígeno y quimiocinas, que contribuyen a la inflamación y a la resorción ósea (Page y col., 1997; Wang y Ohura, 2002; Siqueira y Rôças, 2007).

Asimismo, el LPS bacteriano ha demostrado inhibir la migración de los fibroblastos gingivales humanos y la adhesión al cemento mineralizado y desmineralizado (Siqueira y Rôças, 2007). El LPS también inhibe la unión de los fibroblastos al colágeno tipo I. Puesto que la migración y adhesión de las células del tejido conectivo son eventos importantes en el proceso de cicatrización

periodontal, las acciones del LPS en estos procesos podrían contribuir a la pérdida del tejido conectivo en el periodonto enfermo (Pitaru y col., 1987).

El LPS estimula al eje monocito/linfocito y esto resulta en la secreción de citocinas catabólicas y mediadores inflamatorios, siendo los más importantes la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral-beta (TNF- β), la interleucina-6 (IL-6), y la prostanglandina E₂ (PGE₂) (Dumitrescu, 2006; Graves, 2008). Estos mediadores inflamatorios, en especial la IL-1 y el TNF- β , disparan la producción de MMPs por parte de los fibroblastos y los macrófagos, lo que genera la destrucción del colágeno, glicosaminoglicanos y hueso periodontales, y en consecuencia se produce pérdida de la inserción, formación del saco y resorción ósea (Beklen y col., 2007).

Todo esto se traduce en cambios vasculares y celulares en los tejidos periodontales, con la migración de células fagocíticas y formación de un infiltrado inflamatorio con el reclutamiento de células inmunes activadas (linfocitos T y B) e incremento en el número de neutrófilos y monocitos/macrófagos, dentro del tejido conectivo gingival (Vernal y col., 2005), llevando a una mayor destrucción de la matriz extracelular. Con ello se produce una mayor liberación y participación de mediadores inflamatorios, ocasionando la destrucción completa del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, con pérdida definitiva del diente.

1.4. Sistema Inmune

Se describen dos ejes inmunológicos como responsables de la defensa de las estructuras periodontales frente a la agresión bacteriana: un eje localizado a nivel del tejido epitelial conformado por neutrófilos-complemento-anticuerpos, y un segundo localizado a nivel del tejido conectivo constituido por macrófagos-citocinas-linfocitos (Miyasaki, 1991). Los neutrófilos son parte del sistema inmune innato, que constituyen la primera línea de defensa del hospedero frente a la infección. Aún cuando un importante número de estas células migran hacia el surco gingival, la mayoría de las células permanecen en el tejido conectivo perivascular formando parte del infiltrado inflamatorio local.

La EP que conduce a inflamación de la gíngiva y destrucción de los tejidos periodontales involucra componentes tanto bacterianos como del hospedador. La respuesta inmune a los patógenos microbianos depende de componentes del sistema inmune tanto innato como adaptativo (Sarah y col., 2006).

Los estímulos dañinos (DAMPs: danger-associated molecular patterns) y los asociados a patógenos (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) activan células del Sistema Inmune Innato y del tejido afectado, tales como macrófagos, monocitos, mastocitos y granulocitos. Estas células son la fuente principal de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), quienes a su vez reclutan leucocitos al sitio del daño, activan diversas cascadas de señalización y respuestas que eventualmente

conllevar la inducción de respuestas de la inmunidad adaptativa (Gaestel y col., 2009).

El sistema inmune en el periodonto está constituido por múltiple tipos celulares, incluyendo las células epiteliales, células presentadoras de antígeno provenientes de células dendríticas 83 (CD83+), células de Langerhans en la mucosa bucal, los macrófagos tisulares, neutrófilos y células dendríticas en la lámina propia gingival/periodontal. Estos diversos tipos celulares pueden directa o indirectamente participar en la presentación de antígenos para sensibilizar a las células B y T que constituyen el sistema innato de la respuesta inmune (Teng, 2006a).

Las citocinas son proteínas solubles que se unen a receptores específicos en células blanco e inician cascadas de señalización intracelulares que resultan en una alteración de la regulación de genes. Son efectivas a bajas concentraciones, son producidas transitoriamente en los tejidos y actúan primariamente en los tejidos donde son producidas. Las citocinas son capaces de inducir su propia expresión de modo autocrino o paracrino y poseen efectos pleiotrópicos en un gran número de células. Las citocinas juegan un papel importante en la inflamación, incluyendo la EP (Castro y col., 2003).

La IL-1, ha sido la citocina más estudiada hasta la fecha, fue primeramente descrita como factor activador de osteoclastos (OAF) (Wilton y col., 1992) y después identificada como IL-1 β , posteriormente se identificó la IL-1 α . Ambas

isoformas poseen efectos biológicos tales como resorción ósea, fiebre, inducción de la síntesis de prostaglandinas y un incremento en la respuesta de las células T a los antígenos. La IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria que induce la expresión generalizada de genes, incluyendo la ciclooxigenasa-2 y de la óxido nítrico sintasa inducida (iNOS), lo que puede contribuir a la activación de los osteoclastos y la resorción ósea (Castro y col., 2003).

El papel de otras citocinas, prostanoïdes y enzimas líticas en la patogénesis periodontal también ha sido investigado. El TNF- α , es una citocina pro-inflamatoria que induce la resorción ósea e induce un incremento en la PE₂ y de MMPs. Al igual que la IL-1 β , el TNF- α es producido por diversas células en el periodonto induciendo la regulación hacia arriba de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales, estimulan la producción de quimiocinas (las cuales reclutan leucocitos hacia los sitios de inflamación) e inducen la expresión de otros mediadores inflamatorios que potencian la respuesta inflamatoria (Graves y Cochran, 2003).

En homeostasis, existe un grado de balance entre actividad pro y anti inflamatoria con células T específicas, antagonistas de receptores tales como la IL-1R α , formas solubles inhibitorias de IL-1 y del receptor de TNF- α e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), todos ellos con efectos protectores, postulándose la presencia de una red de citocinas participando en la respuesta inflamatoria donde la EP podría deberse a la desregulación de dichos factores (Wilton y col., 1992).

La activación de la inmunidad innata es un pre-requisito para el inicio de la inmunidad adaptativa, pero también puede conducir a la inflamación destructiva (crónica) si el daño original persiste. La importancia de las citocinas en la EP se hace evidente no solo porque actúan como iniciadores y reguladores de la respuesta innata y la inmunidad adaptativa, sino que ellas median también el daño tisular lo que conduce a una pérdida de función y enfermedad clínica, que a su vez ocasiona una síntesis y secreción inapropiada de citocinas con efectos concomitantes sobre la función y recambio de las células periodontales; más aún, muchas de las células no inmunes del periodonto como queratinocitos y fibroblastos, sintetizan citocinas en respuesta a bacterias y éstas influyen el recambio de componentes de la matriz extracelular y de las fibras del ligamento periodontal (Baker, 2000). Para ello y previamente es necesario que receptores de alta afinidad sean capaces de reconocer determinados constituyentes de las bacterias o virus a través de los PAMPs como por ejemplo a los LPS bacterianos, o bien citocinas endógenas o señales de daño DAMPs. La vía de señalización de este tipo mejor definida es la activada por una familia de receptores transmembrana, que parecen funcionar exclusivamente como receptores de señalización y que fueron primeramente descritos en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y denominados receptores Toll, siendo los responsables del reconocimiento de varias vías de PAMPs expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos (Gaestel y col., 2009).

La PCR es una proteína plasmática, que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación (reactante de fase aguda). El rol fisiológico de esta proteína es

unirse a la fosfocolina expresada en la superficie de las células moribundas o muertas y a algunos tipos de bacterias, con el fin de activar el sistema del complemento, por la vía del complejo C1Q (Thompson y col., 1999).

1.4.1. Receptores similares a Toll

En los mamíferos, se ha descrito una familia de proteínas denominadas receptores similares a Toll (TLRs) de los cuales han sido identificados entre 10 y 15 tipos de receptores, que inducen diversas respuestas ante el estímulo de diferentes componentes bacterianos (Du y col., 2000; Chuang y Ulevitch, 2000; Tabeta y col., 2004).

La proteína Toll de *Drosophila* y los TLRs presentes en plantas y mamíferos son proteínas transmembrana tipo I que presentan un dominio extracelular con segmentos repetidos ricos en leucina (LRRs) y un dominio citoplasmático muy conservado con homología con el dominio citoplasmático del receptor de la interleucina I, denominado dominio TIR (Undeerhill y Ozinski, 2002; O'Neill, 2002).

Los receptores similares a Toll, especialmente el TLR4 es activado por la unión del LPS bacteriano a través de otras dos proteínas; el LPS es unido por la proteína soluble unidora de LPS (LPB), la cual a su vez se une a la células presentadoras de antígeno provenientes de células dendríticas (CD14), proteína que puede estar libre en el plasma o unida periféricamente a la membrana mediante una cola de glicosil fosfatidilinositol (Tsan y Gao 2004). El

descubrimiento de que el complejo LPS:LPB:CD14 ejerce su señalización vía los TLRs fue realizado en ratones que no responden genéticamente al LPS, el gen responsable de ello resultó ser el gen que codifica para TRL4, subsecuentemente se encontró que el TLR4 une al complejo LPS:LPB:CD14 mediante una región rica en leucina en el dominio extracelular del CD14. El CD14 une LPS y lo libera hacia el complejo TLR4/MD2. La molécula MD2 es una proteína asociada al dominio extracelular del TLR4 y aumenta la afinidad de este complejo por el LPS (Moreno y Sánchez-Ibarrola, 2003). Cuando el TLRs4 une al complejo CD14:LPB:LPS envía señales al núcleo que activan al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) que a su vez activa la transcripción de genes involucrados en la defensa contra la infección (Kawai y Akira 2005).

Los TLR4 pueden disparar diferentes respuestas celulares a través del uso diferencial de proteínas adaptadoras (de las cuales hasta el momento se conocen 5: MyD88, TRIF, TIRAP o MAL, TRAM y SARM) (Beutler y col., 2004). Por ejemplo, la activación del TLR4 por los LPS, puede actuar vía las proteínas adaptadoras, MyD88 y TIRAP para la producción de TNF- α y las IL- 1- 6- 8- 12, o bien interactuar con TRAM y TRIF en ausencia de MyD88 para liberar interferon alfa/beta y factor regulatorio de interferón 3 (IFN- α/β e IRF-3) (Sasai y col., 2005).

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 proinflamatorias IL-1, IL-8, TNF- α , IL-12 y moléculas afines tales como la CD80, CD86 y CD40 (Beinke y Ley 2004) (Figura 3).

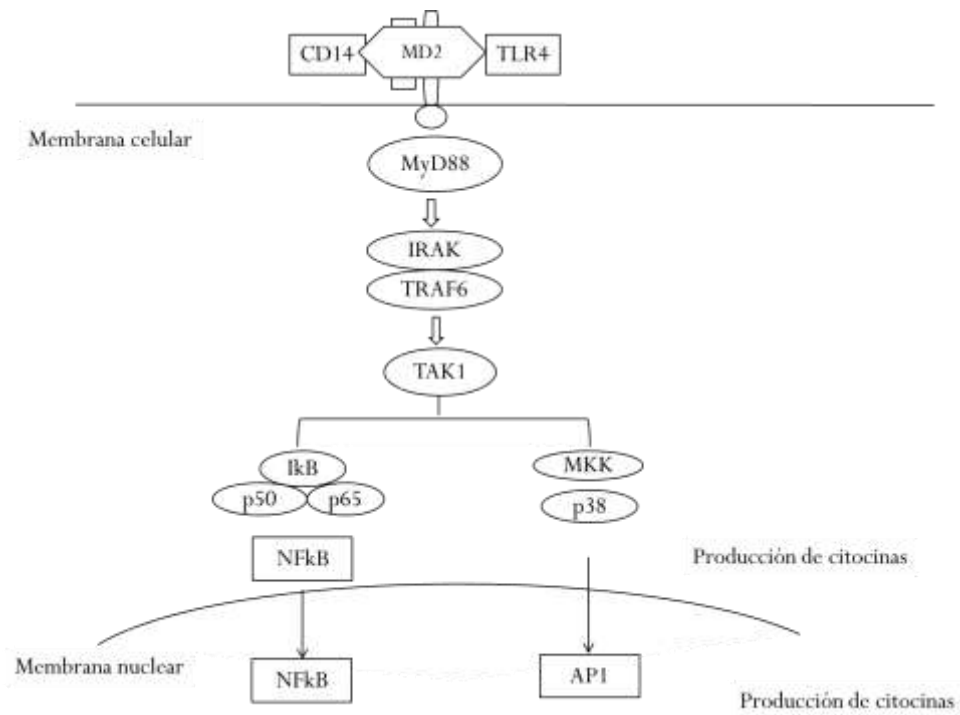


Figura 3. Vía de señalización de los receptores TLR.

Fuente: www.scribd.com > Presentations > School Work

Estudios in vitro con células epiteliales gingivales han demostrado la expresión de TLRs -1, -2 y -6 (Asai y col., 2001, 2003). Por otra parte, Hatakeyama y col., en el 2003 reportaron la expresión de TLRs 2 y 4 en tejidos gingivales sanos de humanos. Asimismo, se ha demostrado que los fibroblastos gingivales humanos expresan los dos tipos de TLRs y que se encuentran incrementados en la inflamación (Uehara y col., 2002). Estudios realizados por diversos autores en

muestras gingivales obtenidas de pacientes con gingivitis y periodontitis crónica demostraron la expresión tanto del TLR2 como del TLR4 en los pacientes controles sanos así como un incremento de su expresión en los pacientes con gingivitis y periodontitis crónica, variando dicha expresión según el predominio de flora gram + y gram – (Mori y col., 2003; Sarah y col., 2006).

Por lo tanto, la desregulación de los procesos inflamatorios lleva a la producción masiva de mediadores inflamatorios resultando en “ruptura” tisular, activación de osteoclastos y la subsecuente resorción ósea en el periodonto sugiriendo que una exacerbación de los mecanismos inflamatorios mediados por los TLRs podrían constituirse en un factor negativo. Así, se ha demostrado que ratones deficientes en el TLR4, sufrieron menor pérdida ósea alveolar que su contraparte salvaje cuando fueron expuestos a infección apical con una mezcla de bacterias anaeróbicas (Socransky y Haffajee, 1992). A su vez, Burns y col., (2006) demuestran un incremento de resistencia a la infección, menor resorción ósea y menor producción de citocinas en ratones deficientes en TLR2 comparado con ratones deficientes en TLR4 en respuesta a *P. gingivalis*.

Estudios recientes han revelado que la estimulación de los TLR4 por LPS induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelularmente, los cuales son necesarios para la formación de un complejo entre la molécula adaptadora TRAF 6 y la kinasa1 regulada por señales de apoptosis y la subsecuente activación de la respuesta inmune innata (Matsuzawa y col., 2005). Recientemente, Yang y col., (2008), demostraron que el derivado protéico

purificado de la tuberculina de *Mycobacterium*, activa señales pro inflamatorias dependientes de TLR2 en monocitos y macrófagos, vía la generación de ERO. Así, se ha demostrado que varios homólogos de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) actúan como moléculas señalizadoras “aguas abajo” de los TLRs. Más aún, Park y col., (2004), demostraron una interacción directa entre TLR4 y la sub unidad 4 de la NAD(P)Hox (NOX4) en la generación de ERO y la activación del NFkB. Igualmente, se ha demostrado que la NOX2 asociada a neutrófilos es esencial en la activación mediada por el TLR4 de la expresión de genes, inducida por el NFkB (Grandvaux y col., 2007), evidenciando un papel para las ERO derivadas de la actividad de las NOX en la comunicación célula-célula a favor de una respuesta inmune eficiente, a través de la modulación de la señalización celular.

1.4.2. NFkB

El NFkB es una proteína de membrana de tipo I expresada en la superficie de los osteoclastos, y de las células dendríticas, forma parte de una familia de factores de transcripción esenciales para la expresión de una amplia variedad de genes responsables por la respuesta inmune, entre ellos citocinas pro inflamatorias ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1 y 6), quimiocinas como MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) y RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted)], moléculas de adhesión ([E-selectina y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)], moléculas efectoras que poseen actividad antimicrobiana directa y enzimas que generan intermediarios reactivos (como la ciclooxigenasa y la iNOS), así como substratos como el angiotensinógeno, también son transduccionalmete inducidos por el NFkB (Zhang y Ghosh 2001),

éstas colectivamente regulan el reclutamiento de células inmunes al sitio de la infección y disparan los mecanismos de inflamación (Guijarro y Egido 2001). A su vez, el TNF- α y la IL-1 mediante estimulación de sus receptores respectivos, activan al NF κ B vía la PKC (protein kinasa C), lo cual induce una amplificación de la respuesta y extiende la duración de la respuesta inmune innata de defensa (O'Neill y Dinarello 2000). Este factor se encuentra en forma de heterodímero inactivo en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras (I κ B). Cuando la célula es estimulada, la proteína inhibidora se fosforila; esto sirve de señal para su degradación proteolítica, el dímero resultante (p50/p65) se trasloca al núcleo e induce la transcripción de genes que poseen en su promotor elementos de respuesta κ B (Barnes y Karin, 1977). Subsecuentemente, durante la fase adaptativa de la respuesta inmune, el NF κ B está involucrado en la activación de los linfocitos T y B. La desregulación del NF κ B puede llevar a la sobreproducción constitutiva de citocinas pro inflamatorias, lo cual está asociado con un número de patologías inflamatorias crónicas, incluyendo la artritis reumatoidea y la enfermedad de Crohn (Girardini y col., 2003)

La activación del NF κ B también puede ser inducida por endotoxinas bacterianas y recientemente, ha sido demostrado que los LPS bacterianos también pueden activar al NF κ B de macrófagos y la consiguiente transcripción de citocinas de modo independiente de la PKC (Wallach y col., 1999). Como la IL-1 y el TNF regulan positivamente su propia producción a través del sistema NF κ B, es posible que los efectos aditivos de la producción de citocinas mediada por las endotoxinas y la procedente del brote respiratorio de los leucocitos polimorfonucleares en respuesta a los mismos organismos, conduzca a una

substantial inflamación periodontal y a la subsecuente destrucción tisular (Chapple, 1996).

1.5. Resorción ósea

1.5.1. Generalidades

La inflamación y la pérdida del hueso alveolar son los signos distintivos de la enfermedad periodontal, la cuestión es cómo la primera conduce a la segunda. Así, la patogénesis de las enfermedades infecciosas es regulada por una compleja interacción entre factores derivados de los microorganismos y antígenos que estimulan una reacción inflamatoria local y la respuesta del sistema inmune del huésped (Cochran, 2008). La efectividad de ésta depende de influencias internas y externas, las cuales actúan sobre la EP. Por ejemplo, el control genético de las citocinas parece modular la respuesta del hospedador a las bacterias bucales e influenciar la susceptibilidad a la EP y sus manifestaciones clínicas (Hart y Kornman, 1997). La infección bacteriana por sí sola es insuficiente para causar periodontitis.

El hueso es un tejido metabólicamente activo y altamente organizado que consiste de una fase mineral de hidroxiapatita (65%) y de una matriz orgánica (35%). La matriz orgánica ósea está constituida por un componente orgánico (25% del peso del tejido óseo) formado por fibras de colágeno, un componente inorgánico (70% del peso del tejido óseo) en forma de hidroxiapatita del calcio y 5% de agua (Cochran, 2008).

La resorción ósea involucra una serie de fases celulares dirigidas hacia la disolución de los constituyentes minerales o inorgánicos y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea por parte de los osteoclastos y controlada por los osteoblastos. Aunque los reguladores moleculares de las distintas fases de vida y actividad de los osteoclastos no han sido completamente dilucidados, por décadas varios sistemas de citocinas han sido sugeridos como importantes reguladores de la resorción ósea (Sodek y McKee, 2000), el proceso de resorción esta controlado por una compleja interaccion entre células osteoclásticas y osteoblásticas (Hill y Orth, 1998; Lafati, 2003).

1.5.2. Sistema RANK/RANKL/OPG

En la actualidad un nuevo sistema de citocinas recientemente identificado como nuevos miembros de la superfamilia del TNF, han sido propuestos como esenciales para la biología osteoclástica. El llamado Sistema RANK/RANKL/OPG es la vía común a través de la cual actúan hormonas y factores locales para regular la interacción osteoblasto, osteoclasto (Lafati, 2003).

Los componentes de este sistema de citocinas consisten de un receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK), un ligando de unión al receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL), el cual se expresa en la superficie de los osteoblastos y de las células T, un Factor de Diferenciación de Osteoclastos (ODF), un receptor soluble denominado osteoprotegerina (OPG) (Blaque y James, 2003; Hofbauer y Heufelder, 2001).

El receptor RANK es un péptido que se expresa en osteoclastos maduros y preosteoclastos, cuya activación da lugar a cambios en el citoesqueleto y actividad de los osteoclastos (Lafati, 2003; Khosla, 2001).

El ligando encargado de activar al receptor RANK es RANKL que es una molécula que se expresa anclada a la membrana del osteoblasto, aunque aparece también en células inmaduras mesenquimales de la médula ósea. Mediante la unión a RANK estimula la diferenciación de los osteoclastos, su activación y la inhibición de su apoptosis.

La OPG funciona como un factor soluble o receptor señuelo no anclado, segregado por los osteoblastos. Actúa inhibiendo al RANKL y evitando la unión de este con el RANK, inhibiendo así la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, adicionalmente bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce su apoptosis (Khosla, 2001).

El papel de las citocinas sigue siendo controvertido, explicando la interacción de las células de la médula ósea con las células de la línea osteoblástica, éstas parecen incrementar la activación osteoclástica sin embargo, el TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1) reduciría la pérdida ósea, incrementando la apoptosis de los osteoclastos (Lawrence y col., 2001, Khosla 2001).

La mayoría de las patologías óseas corresponden a un desbalance en los procesos celulares acoplados de la remodelación ósea provocados por la pérdida de los niveles fisiológicos de los factores regulatorios locales, que provoca una alteración en el número y actividad de los osteoclastos y resulta en una alta tasa de resorción ósea que excede la capacidad compensatoria de los osteoblastos (Hofbauer y Heufelder, 2001).

Se ha demostrado la participación del complejo de citocinas RANK/RANKL/OPG en diversas patologías que comprometen el tejido óseo. En enfermedades de carácter crónico, tal como la artritis reumatoide, en la destrucción ósea asociada a metástasis de lesiones cancerosas, así como en modelos experimentales en animales, donde hay destrucción ósea, se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ participan directamente, mediante la expresión y liberación de RANKL, e indirectamente, mediante la liberación de citocinas específicas, IL-1 y TNF que inducen la producción de RANKL por las células del linaje osteoblástico (Kong y col., 2000; Teng y col., 2000; Taubman y Kawai, 2001). Ha sido demostrado que RANKL es suficiente para la completa diferenciación de células precursoras osteoclásticas y para la activación de los osteoclastos maduros (Lacey y col., 1998; Burgess y col., 1999).

Aunque la EP es una de las enfermedades humanas comúnmente asociadas a la pérdida de hueso, el mecanismo de formación de osteoclastos y la destrucción de hueso durante esta enfermedad aún son pobremente comprendidos, se sabe que participa tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Taubman y

col. 2005) y se conoce que las citocinas proinflamatorias que están involucradas en esta patología tales como IL-1 β , TNF- β , PGE₂, e IL-6 estimulan la resorción de hueso (Rasmussen y col., 2000; Bickel y col., 2001).

Taubman y Kawai (2001) y Doucet (2006), propusieron que los linfocitos T activados expresarían un perfil de citocinas que activarían a los macrófagos y osteoblastos periodontales, induciendo en estos últimos la expresión de RANKL (vía indirecta de activación), activándose la vía final común RANKL/RANK/OPG que regularía la diferenciación de las células osteoprogenitoras osteoclásticas y la activación de los osteoclastos maduros (Figura 4).

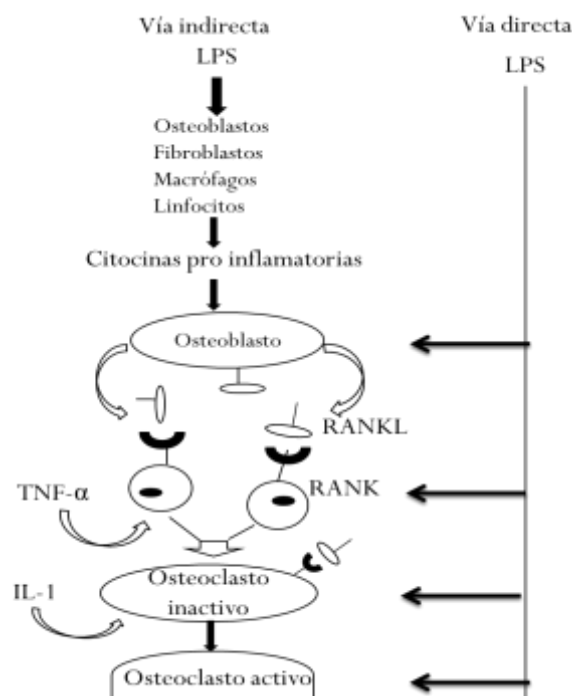


Figura 4. Vías de activación del Sistema RANK/RANKL/OPG.

Fuente: Modificado de Taubman y Kawai 2001

En la actualidad existen pocos estudios que hayan evaluado el rol de RANKL en la EP. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína RANKL está presente en el FGC de pacientes adultos afectados por periodontitis crónica en niveles significativamente mayores a los observados en individuos periodontalmente sanos (Vernal y col., 2004). Mogi y col (2004) encontraron mayores niveles de RANKL, menores niveles de OPG y el incremento de la relación RANKL/OPG en FGC de individuos con periodontitis, en comparación con sujetos sin EP. Sin embargo a nivel clínico, no ha podido establecerse una relación directa entre los niveles de RANKL y la pérdida de hueso alveolar.

Estudios en ratas con osteoporosis demuestran un aumento en la expresión de RANKL en relación a ratas sin osteoporosis. Dado que, RANKL es la señal final común para la completa diferenciación de los precursores celulares hematopoyéticos totipotenciales en osteoclastos multinucleados y la activación de ellos como células osteodestructivas (Kong y col., 1999a y b; Takahashi y col., 1999) y ha sido demostrado que TNF- β , IL-1- β , IL-6 y PGE₂ aumentan los niveles tanto del ARNm como de la proteína de RANKL (Nakashima y col., 2000), podría correlacionarse la presencia de mayores niveles de esta citocina osteoclastogénica en tejidos periodontales con la destrucción ósea alveolar y dar una explicación biológica comprensible a la pérdida de dientes consecutiva a la periodontitis.

2. Especies Reactivas de Oxígeno y Enfermedad periodontal

Como se ha venido mencionando, la destrucción de los tejidos de soporte del diente, se considera desencadenada por la presencia de bacterias específicas y sus productos. La EP es iniciada por la biopelícula subgingival, sin embargo la respuesta del hospedero es esencial en la progresión de la enfermedad, ésta incluye: liberación y activación de proteasas, liberación de citocinas, derivados del ácido araquidónico y la producción ERO entre otros (Novak y Donley, 2002; Chapple y col., 2007). Las ERO se pueden producir por múltiples estímulos, tales como factores de crecimiento, hormonas, citocinas, radiación ultravioleta, incremento de la osmolaridad y otros estímulos estresantes. Actualmente se consideran a las ERO como segundos mensajeros intracelulares que se originan de la estimulación de una mezcla de receptores de membrana y que son capaces de activar proteínas kinasas intracelulares, muchas de las cuales promueven múltiples respuestas celulares como la inflamación, el crecimiento, la diferenciación. Estas cascadas activan factores de transcripción con papeles funcionales importantes en la fisiología y fisiopatología de la EP.

Existe evidencia acerca del posible papel de las ERO en el daño periodontal. Las vías –dependientes de oxígeno- de la función fagocítica, dan lugar a la producción de radicales libres, los cuales pueden ser definidos como cualquier radical capaz de poseer existencia independiente y que contiene uno o más electrones no apareados (Halliwell, 1991). El término especies reactivas de oxígeno incluye moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y la molécula de oxígeno (O_2), los cuales si bien no son radicales por naturaleza, son capaces de formar radicales tanto intra como

extracelularmente. Las ERO causan daño tisular por diferentes mecanismos tales como peroxidación lipídica, daño al ADN, oxidación de enzimas, estimulación de la liberación de citocinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos y daño a proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Estudios en cultivos de células epiteliales gingivales han mostrado que los PMN (polimorfonucleares) pueden provocar la lisis de éstas a través de la acción de la MPO (mieloperoxidasa), una enzima leucocitaria, generadora de ERO (Altman y col., 1992). La actividad de esta enzima se ha encontrado igualmente incrementada en el FGC en la gingivitis y periodontitis (Cao y Smith, 1989).

De esta manera, la EROs podrían actuar como intermediarios importantes en la formación y activación de nuevos osteoclastos así como en el proceso de resorción ósea. En este sentido, Ross y col., (1990) encontraron que la síntesis de ERO por el sistema xantina oxidasa/xantina incrementó la resorción ósea en cultivos de hueso largo fetal de rata. Asimismo, algunos investigadores han reportado que estas ERO pueden dañar el colágeno óseo, haciéndolo más susceptible a la degradación por las proteinasas del osteoclasto (Giannopoulou y col., 2008) así como activar las MMPs de la matriz (Ramamurthy y col. 1990).

Los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos (y en menor extensión los eosinófilos, linfocitos y fibroblastos), son ejemplos de células que producen anión superóxido como agente antimicrobiano vía la acción de la NAD(P)Hox. El singlete de oxígeno (O_2) es capaz de atacar blancos biológicos de importancia

periodontal así como de dismutar espontáneamente en solución acuosa y formar el H_2O_2 y el anion superóxido los cuales a su vez pueden ocasionar daño tisular. Se ha determinado la presencia del anion superóxido en el espacio del borde en cepillo de los osteoclastos, involucrando a este radical en la degradación de la matriz ósea en la interface hueso-osteoclasto (Key y col., 1994).

Existen evidencias que apuntan hacia la participación de estos compuestos en la EP. Así, en pacientes con periodontitis rápidamente progresiva, se ha demostrado que los PMN neutrófilos, están funcionalmente activados y que producen elevados niveles de O_2 (Shapira y col., 1991). Este mismo efecto fue observado en pacientes con periodontitis juvenil localizada y generalizada y en pacientes con periodontitis del adulto (Gustafsson y Asman, 1996).

El O_2 también puede ser convertido en el OH por reacción con el peróxido de hidrógeno. El radical OH, extremadamente reactivo, estimula la clásica reacción en cadena de radicales libres que conduce a la llamada peroxidación lipídica, uno de cuyos productos finales incluye prostanoides involucrados en la resorción osteoclástica del hueso (Wiswedel, 2009).

El peróxido de hidrógeno puede ser producido por las bacterias periodontales, por las células fagocíticas vía la NAD(P)Hox, y por dismutación del anión superóxido. A su vez se ha propuesto que el H_2O_2 podría actuar a través de la oxidación del NFkB, con la subsecuente inducción de la transcripción de

diversas citocinas pro inflamatorias de importancia en la patogénesis de la EP incluyendo las IL 2, 6, 8, IFN-1 y el TNF- α (Martinez 2008).

Las ERO pueden ser producidas en la célula de los mamíferos por un grupo de enzimas entre las cuales podemos encontrar a la xantina oxidasa, la ciclo oxigenasa, el citocromo P450, la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la NAD(P)Hox. En los últimos años, se ha venido haciendo evidente que la fuente más importante de ERO la constituye las NAD(P)Hox, éstas enzimas son transportadores de electrones que aceptan electrones del NAD(P)H dentro de la célula y los transportan a través de la membrana para finalmente donarlos al oxígeno, esta reacción genera el anión superóxido (O_2^-) y los demás ERO corriente abajo. Aunque las NAD(P)Hox fueron originalmente consideradas como enzimas expresadas solo en las células fagocíticas involucradas en la defensa del huésped y en la inmunidad innata, evidencia reciente indica que hay toda una familia de NAD(P)Hox, designadas como la familia NOX, la cual consiste en 7 isoformas denominadas NOX 1 a 5 y DUOX 1 y 2. Los miembros de esta familia se expresan en muchos tejidos y median diversas funciones biológicas. La NAD(P)H fagocítica más común en la EP es la NOX2 (Giannopoulou y col., 2008). La importancia de esta enzima ha podido ser determinada en enfermedades tales como la Enfermedad Granulomatosa Crónica, la cual es un raro desorden genético causado por la deficiencia de NOX2 y donde la incapacidad de neutrófilos y macrófagos para inducir el estallido respiratorio matando a las bacterias invasoras, es causa de severas y recurrentes infecciones. En esta patología no es infrecuente encontrar casos de periodontitis severa tanto en niños (Charon y col. 1985), como adultos (Cohen y col 1985). La

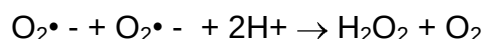
NOX1 está presente en las células vasculares y funciona en la defensa del huésped y en el crecimiento celular, la NOX4 tiene una amplia distribución con particular abundancia en el riñón y huesos (Griendling, 2006).

2.1. Enzimas antioxidantes

Dado el carácter aeróbico de las células y tejidos, estas ERO se generan en condiciones fisiológicas, las concentraciones de las mismas están gobernadas por el balance entre su producción y su eliminación siendo esto crucial para el funcionamiento normal de células y tejidos. Si el balance entre la formación y la eliminación de ERO se altera a favor de lo primero, estos metabolitos inducen reacciones en cadena, capaces de dañar a las moléculas de importancia biológica (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). En particular el ataque a los lípidos provoca su peroxidación, lo que a su vez conduce a la formación de nuevas especies radicales y metabolitos tóxicos, por lo que se desencadena una cascada de eventos que amplifican el daño. De esta forma, se encuentran implicados en numerosas afecciones y procesos, incluyendo la inflamación (Weiss y col., 2001). Los elementos del sistema antioxidante están constituidos por las enzimas antioxidantes, encargadas del atrapamiento y metabolismo de las ERO, las cuales están ubicuamente distribuidas en el organismo y que incluyen las superóxido dismutasas (SODs), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR); las proteínas acarreadoras de metales como la ceruplasmina, lactoferrina y transferrina entre otras, así como compuestos antioxidantes como el glutatión, vitamina C y ácido úrico (hidrosolubles) y los antioxidantes liposolubles la vitamina E, los

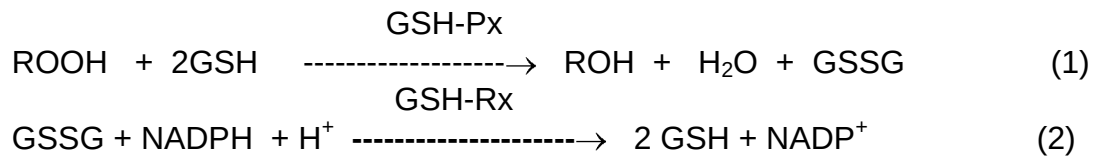
carotenoides y la bilirrubina los cuales son importantes en la protección de membranas celulares y lipoproteínas plasmáticas (Alfonso y col., 2007).

Las SODs son metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido para dar oxígeno molecular y H_2O_2 éste último a su vez es eliminado por la GPx o por la CAT (Biri y col., 2007).



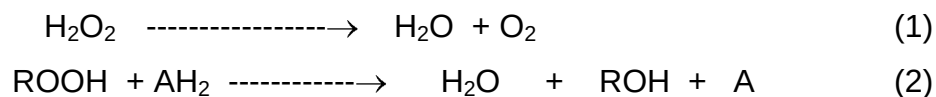
Las SODs están presentes en tres isoformas; la Cu/Zn-SOD o SOD 1 se encuentra en el citoplasma celular, mientras que la EC-SOD o SOD 3 es extracelular, ambas isoformas utilizan cobre y zinc como cofactores. El manganeso es el cofactor para la SOD 2, la cual está localizada en la mitocondria (Wassmann y col., 2004; Alfonso y col., 2007).

El glutatión reducido juega un papel importante en el estado redox celular. La GPx es una enzima antioxidante que contiene selenio que reduce de modo efectivo el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos a agua y alcoholes y a su vez oxida el glutatión a disulfuro de glutatión (Wassmann y col., 2004). El mantenimiento de una relación estable entre el glutatión reducido y el glutatión oxidado (GSH:GSSG), es esencial para la supervivencia celular y determina que tan eficientemente, las células se recuperan de un daño oxidativo. Asimismo constituye un factor importante en la activación de factores de transcripción redox sensitivos pro inflamatorios como el NFkB regulando la respuesta del sistema inmune innato (Haddad, 2002; Grant y col., 2010). Los niveles de NAD(P)H son regenerados por la acción de las enzimas málica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



Se ha demostrado que el FGC contiene cantidades inusualmente altas de GSH y que estos niveles son menores en pacientes con periodontitis que en los controles reflejando una estrategia de defensa innata en las superficies epiteliales expuestas y vulnerables (Chapple y col., 2002; Grant y col., 2010).

La catalasa es una enzima antioxidante intracelular localizada principalmente en los peroxisomas y en alguna extensión en el citosol, la cual cataliza la reacción del H_2O_2 a agua y oxígeno molecular. La enzima también tiene actividad de peroxidasa y reacciona con peróxidos orgánicos y donantes de hidrógeno para dar agua y alcoholes orgánicos. La CAT es muy efectiva en altos niveles de estrés oxidativo y protege a la célula del peróxido de hidrógeno producido dentro de ella. La enzima es especialmente importante en casos de limitado contenido de glutatión o de actividad reducida de la GPx y juega un papel significativo en el desarrollo de la tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Wassmann y col., 2004; Prego y col., 1997).



Estudios realizados en pacientes con periodontitis han reportado una reducción de la capacidad total antioxidante en el FGC (Brock y col., 2004), siendo esto confirmado por estudios de asociación en gran escala donde se demostró que

pacientes con periodontitis tenían una capacidad antioxidante total plasmática disminuída (Chapple y col., 2007, Linden y col., 2009).

2.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un mediador fundamental de la función y la comunicación celular. Formado a partir de L-arginina por la sintasa del óxido nítrico (NOS) (Moncada y col., 1991), existen tres isoformas de esta enzima, la NOS neuronal (nNOS), la NOS inducible (iNOS) y la NOS endotelial (eNOS) (Manukhina y col., 2006). Ahora bien, el ON parece ser un mediador adicional de los efectos de las citocinas sobre la actividad de las células óseas.

Con respecto a su papel en la patogénesis de la EP, Lohinai y col., (1998) reportaron en un modelo de periodontitis inducido por ligadura, un incremento en la producción local de ON y de la destrucción ósea, que fue bloqueado por la mercaptoetilguanidina, un inhibidor selectivo de la NOS y agente antioxidante, el cual protege contra la extravasación y destrucción ósea asociadas con tal incremento de ON (Lohinai y col., 1998).

3. Sistema Renina Angiotensina

La angiotensina II (ANG II) es el componente más importante del Sistema Renina Angiotensina (SRA), la cascada del SRA comienza con el clivaje del angiotensinógeno por la acción de la renina para formar angiotensina I (ANG I), sobre la cual actúa la enzima convertidora de angiotensina (ECA) dando origen a la ANG II (Von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006). El SRA juega un papel

importante en el control de la presión arterial, del balance de agua y electrolitos y del tono vascular, participando en el desarrollo y la fisiopatología de la hipertensión arterial y de las enfermedades cardiovasculares (Weiss y col., 2001) y renales (Ruíz-Ortega y col., 2006).

En la última década, datos crecientes apuntan a un cambio en el clásico punto de vista sobre la ANG II, de hormona vasoactiva a una verdadera citocina (Egido, 1996) participando en las respuestas inmunes e inflamatorias. El papel de la ANG II en la regulación de las respuestas antiinflamatorias ha sido establecido de modo temprano en la evolución y precede a sus funciones en el control cardiovascular. En los invertebrados, la ANG II regula la respuesta inmune innata, es decir, la respuesta inflamatoria inicial ante una infección (Salzet y col., 2001). En los mamíferos, el papel del SRA como un modulador inmunológico fue sugerido por la presencia de renina y ANG II en macrófagos (Friedland y col., 1977). Posteriormente, otras células del sistema inmune como neutrófilos y mastocitos mostraron poseer la vía enzimática para convertir ANG I en ANG II (Reilly y col., 1982) y se demostró la presencia de sitios de unión para la ANG II en leucocitos mononucleares (Shimada y Yazaki, 1978).

Las acciones de la ANG II se traducen en señales a través de receptores específicos localizados en la superficie celular, de los cuales se han descrito hasta el momento 2 subtipos: AT1 y AT2. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembranales acoplados a

proteínas G (De Gasparo y col., 2000; Von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006; Pérez-Díaz y col., 2006).

La ANG II está involucrada en diversas etapas del proceso inflamatorio como: incremento de la permeabilidad vascular, regula el reclutamiento de células pro inflamatorias al sitio del daño modulando la regulación de las moléculas de adhesión y la quimiotaxis, y la diferenciación y modulación de células inmunocompetentes, las células mononucleares responden al estímulo de la ANG II (proliferación celular y quimotaxis), y regula la expresión de otros agentes pro inflamatorios tales como factores de crecimiento, citocinas, quimocinas y moléculas de adhesión las cuales participan en el crecimiento celular, la apoptosis y la inflamación. La ANG II induce estas respuestas celulares a través de diversas vías de señalización tales como movilización del calcio, generación de radicales libres, activación de proteínas kinasas y de factores de transcripciones nucleares, comunes a las citocinas clásicas (Egido 1996; Suzuki y col., 2003a y b).

El concepto clásico de un SRA circulante ha sido modificado por la evidencia substancial de la presencia de los componentes esenciales del SRA en una gran variedad de tejidos incluyendo el cerebro, gónadas, hueso, músculo esquelético, tejido adiposo, páncreas y cordón umbilical entre otros (Leung 2004, Paul y col., 2006, Souza y col., 2007)

Así, existen numerosos reportes en la literatura sobre la mediación de la ANG II en procesos inflamatorios, en patologías claramente inflamatorias como la artritis reumatoide (Price y col., 2007), la aterosclerosis (Phillips y Kagiya, 2002), en procesos de inflamación vascular subyacentes a hipertensión y otras patologías (Cheng y col., 2005), en procesos de daños gástricos inducidos por estrés (Bergonzio y col., 2004), en patologías renales (Esteban y col., 2004; Ruiz-Ortega y col., 2006), y a nivel cerebral (Benicky y col., 2009).

Recientemente, Santos y col., (2009) demostraron la presencia de todos los elementos del SRA en tejidos gingivales. Así, los autores fueron capaces de detectar la presencia de ARNm para renina, angiotensinógeno, ECA, y los receptores de angiotensina II (AT1a, AT1b, y AT2). Asimismo, encontraron en cultivos de fibroblastos gingivales la expresión de renina, angiotensinógeno y receptores AT1a, la presencia de renina fue evidente en el endotelio vascular y la misma fue intensamente expresada en tejidos gingivales afectados. Los mismos autores reportan la formación de ANG I, y utilizando ANG I como sustrato, demostraron la conversión de este decapeptido en sus metabolitos ANG 1-9, ANG II y ANG 1-7.

Igualmente, diversos autores han reportado acciones de la ANG II en tejidos periodontales; Lundergan y col., (1999) demostraron que la ANG II incrementa el calcio citoplasmático, el número de células y el ADN total en células de ligamento periodontal humano *in vitro*. La ANG II induce un incremento del Ca^{+2} intracelular y la liberación de PGE_2 en cultivos de fibroblastos humanos (Segawa

y col., 2003). Asimismo, Ohuchi y col., (2004), demostraron la presencia de receptores AT₁ así como la inducción por la ANG II, de la proliferación de fibroblastos gingivales de conejos en cultivo, siendo éste un efecto mediado por los receptores AT₁. Del mismo modo, Souza y col., (2007) demostraron en un modelo de pulpitis inducida en rata, una regulación de los receptores AT₁ y AT₂ inducida por la ANG II.

La migración de los monocitos y neutrófilos desde la circulación a los tejidos es un proceso esencial en la inflamación y en el que se involucran múltiples mediadores inflamatorios que median la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales, la transmigración a través del endotelio y la migración al tejido inflamado siguiendo un estímulo quimiotáctico (Egido y Alcázar, 1999).

Se ha reportado que la ANG II induce la adhesión de monocitos y neutrófilos a las células endoteliales y mesangiales a través del incremento en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y P-selectina (Krejcy y col., 1996; Piqueras y col., 2000). Este sistema de adhesión-reclutamiento de células inflamatorias se perpetúa a través de las propias células inflamatorias que son capaces de sintetizar ANG II, aumentar los niveles de angiotensinógeno y la actividad de la ECA. Adicionalmente, durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos, hay un aumento en la expresión de los receptores AT₂, indicando que la ANG II activa a las células inflamatorias que a su vez activan todos los componentes del SRA e incrementan la generación local de

Ang II, contribuyendo así a mantener los fenómenos inflamatorios (Ruiz-Ortega y col., 2001).

Durante la inflamación, las células y tejidos destruidos son sustituidos bien por el crecimiento de nuevas células parenquimatosas nativas, bien por tejidos fibroblásticos cicatriciales, la ANG II estimula la proliferación e hipertrofia de las células infiltrantes, efecto que se ve reflejado en leucocitos, células endoteliales y células del músculo liso en el caso de patologías tales como diabetes, hipertensión arterial y artritis reumatoide (Ruiz-Ortega y col., 2001; Price y col., 2007). La ANG II es un poderoso mitógeno para muchos tipos celulares regulando el crecimiento celular, proliferación, hipertrofia e hiperplasia en células tales como células renales y células del músculo liso vascular, por efecto directo vía receptores AT₁, a través de la síntesis endógena de diversos factores de crecimiento por activación de las ERKs (Poteínas quinasas reguladas por señales extracelulares)(Magnusson y Mosher 1998), diversas quinasas y procesos redox (Rodríguez-Vita y col., 2005), o indirectamente al aumentar la producción de factores tales como el TGF- β , y ET-1 (Endotelina-1, entre otros. En los fibroblastos, la ANG II a través del TGF- β 1 influye en la producción de matriz extracelular por los fibroblastos, sobre todo de colágeno y fibronectina (Magnusson y Mosher, 1998; Touyz y Schiffrin, 2000).

Además de inducir vasoconstricción, proliferación y fibrosis, la ANG II tiene acciones pro inflamatorias ya que en macrófagos, la estimulación de la ANG II incrementa la expresión de los genes del TNF- α y de la IL-6, aumenta la

liberación de IL-6 e IL-8 en CMLV (células de músculo liso vascular) y monocitos en cultivo, células renales (Ruiz-Ortega y col., 2006a), y en cultivos de adipocitos humanos entre otros, a través de mecanismos que involucran la activación del factor de transcripción NFkB y de la producción de ERO (Skurk y col., 2004; Wolf y col., 2002). *In vitro* se ha demostrado que la inhibición de la ECA y el antagonismo de los receptores AT₁ producen potentes efectos inhibitorios sobre la producción de citocinas inducidas por LPS (Peeters y col., 1998).

Si bien los efectos pro inflamatorios de la ANG II en diversos tejidos y sistemas han sido firmemente establecidos por numerosos autores, los mecanismos y las vías de señalización en muchos casos no están dilucidados. Dado que los TLRs constituyen una vía central en la respuesta inflamatoria en patologías que involucran activación por LPS tales como artritis reumatoidea (Price y col 2007), aterosclerosis (Weiss y col., 2001), uveítis inducida por LPS (Ilieva y col., 2006) y enfermedades renales (Ruíz- Ortega y col., 2006) entre otros, diversos autores han explorado la posible dependencia de las vías de activación de los receptores TLR en los efectos pro inflamatorios de la ANG II.

Así, Wolf y col., (2002), demostraron *in vitro* e *in vivo* que la ANG II indujo una regulación hacia arriba de los TLR4 en células mesangiales renales, en estas células, la ANG II fue capaz incrementar la transcripción de quimiocinas inducidas por la activación de NFkB inducida por LPS. Del mismo modo, reportaron que la ANG II es capaz de estimular la expresión de los TLR4 en CMLV *in vitro* e *in vivo* y que el pretratamiento de estas células con inhibidores

de los TLR4 disminuyó los efectos de la ANG II en la generación de mediadores pro inflamatorios.

Existe una íntima relación entre el SRA y el factor de transcripción NFkB. Así, se demostró *in vitro* como la ANG II activa el NFkB en CMLV y en células mesangiales (Hernández-Presa y col., 1997). Otros estudios *in vivo* han demostrado como 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., 2001). En aorta de ratas normales y en células del músculo liso vascular de ratones con knock-out 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., 2001).

Algunos datos experimentales indican que la ruta AT2/NFkB participa en el reclutamiento de células inflamatorias en el riñón, mediante la regulación de quimiocinas como MCP-1 y RANTES (Ruiz-Ortega y col., 2006). Sin embargo, son numerosos los reportes que señalan que la ruta AT1/NFkB controla la respuesta inflamatoria vascular, regulando genes como la molécula de adhesión VCAM-1, la quimiocina MCP-1 y la citocina pro inflamatoria IL-6.

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

3.1. ANG II y ERO

El estrés oxidativo ha sido implicado en la regulación de tirosín quinasas y fosfatasas, en la expresión de genes inflamatorios, en la función endotelial, en el crecimiento de las CMLV y en la formación de la matriz extracelular (Metha y Griendling, 2006). En la década de los 90's, el grupo de Griendling y colaboradores reportaron por primera vez la activación de la NADPHox por la ANG II en CMLV (Griendling 2006).

El grado de estrés oxidativo del endotelio está en función del balance entre el ON y los radicales O_2^- . El ON es un potente captor de radicales libres y, aparte de sus conocidas propiedades vasodilatadoras, inhibe la proliferación y migración de las CMLV y la agregación plaquetaria (Harrison 1997), si bien en altas concentraciones el propio ON puede generar peroxinitrito, un potente oxidante. La principal fuente de radicales O_2^- procede de las oxidasas fagocíticas y no fagocíticas, siendo la NAD(P)Hox la más estudiada (Weiss y col., 2001). De hecho, se ha demostrado correlación entre el incremento en la actividad funcional de la NAD(P)Hox y la enfermedad coronaria de forma independiente a otros factores de riesgo cardiovascular (Guzik y col., 2000).

Existen evidencias que indican que la activación del receptor AT_1 , estimula a la NAD(P)Hox no fagocítica induciendo la producción del radical ion superóxido en varios tipos de células vasculares, incluyendo CMLV, célula endoteliales, fibroblastos y también en los cardiomiocitos.

La administración de bloqueantes del receptor AT1 de la ANG II ha demostrado efectos antiinflamatorios en procesos tales como la inflamación vascular subyacente a la artritis reumatoide (Price y col., 2007), la aterosclerosis (Phillips y Kagiya, 2002), en procesos de inflamación vascular subyacentes a hipertensión y otras patologías (Cheng y col., 2005). Es por ello que en el presente trabajo, nos propusimos el estudio del efecto del bloqueo del receptor AT1 de la ANG II en un modelo experimental de periodontitis inducida por la administración local de LPS en la rata, modelo éste que induce una activación del sistema innato de inmunidad y una significativa reacción inflamatoria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Evaluar el efecto de los receptores AT1 de la Angiotensina II sobre la Enfermedad Periodontal inducida con inyecciones con lipopolisacáridos en la rata.

Todas las determinaciones se realizaron en animales con EP inducida por LPS y control, que se trataron crónicamente o no, con un antagonista de los receptores AT1 (VALSARTÁN) (VAL).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Validación del modelo animal de Enfermedad Periodontal

1.1.- Evaluar el modelo animal de EP a través del recuento total y diferencial de leucocitos, movilidad dentaria, peso corporal, presión arterial media y frecuencia cardíaca en los animales con EP inducida con LPS comparados con el grupo control a los 7 y 14 días de tratamiento.

1.2.- Determinar la pérdida ósea y cambios histológicos en los animales con EP inducida con LPS mediante:

1.2.1.- Tinción de Von Kossa

1.2.2.- Tinción de Tricrómico de Masson

1.2.3- Determinar el número de osteoclastos en los animales con EP inducida con LPS

2.- Determinar los efectos sobre la actividad de la NOS en la EP inducida por LPS en la rata.

3.- Determinar los efectos sobre la producción de ERO inducida por el tratamiento con LPS.

3.1. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GPX en la EP inducida por LPS en la rata.

4.- Evaluar el papel de la NAD(P)Hox en la producción de EROs en la periodontitis inducida por LPS en la rata.

4.1. Evaluar el efecto de la inhibición de NAD(P)H oxidasa con Apocinina en la EP inducida por LPS en la rata.

4.2. Evaluar el efecto del Tempol: un atrapador de anion superoxido que mimetiza la acción de la SOD en la EP inducida por LPS en la rata.

5.- Determinación de malondialdehído (MDA) como indicador de la peroxidación lipídica en la EP inducida por LPS en la rata.

6.- Determinación de la proteína C reactiva (PCR) en la EP inducida por LPS en la rata.

7.- Determinar el efecto sobre mediadores inflamatorios y quimiocinas en la EP inducida por LPS en la rata.

8.- Determinación de los receptores AT1, RANK, OPG y TLR4, así como la del RANKL, p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFkB y p-NFkB mediante inmunofluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN

Como animales de experimentación se utilizaron ratas macho, de la cepa Sprague-Dawley, de 280-300 g de peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (U.C.V., Caracas), mantenidos bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento.

INDUCCIÓN DE LA PERIODONTITIS.

La periodontitis se indujo mediante inyecciones repetidas en el tejido gingival de endotoxina de acuerdo al método de Ramamurthy y col., (1985). La inflamación periodontal es inducida 24 horas antes del inicio del tratamiento con el antagonista de los receptores AT1 (Valsartan) (VAL). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/kg) e inyectadas directamente en la encía vestibular entre el primer y segundo molar con 10 μ L (1 mg/mL) de LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*), purificado cromatográficamente (Sigma, St. Louis), cada dos días para un total de 4 inyecciones en un período de 7 días de tratamiento, y de 8 inyecciones para el grupo de 14 días de tratamiento. Las ratas control recibieron 4 y 8 inyecciones de solución salina durante el mismo período de tiempo, las ratas fueron distribuidas en los siguientes grupos: (1) CONTROL, (2) LPS, (3) VALSARTAN (VAL), (4) LPS+VAL (L+V), siendo estos grupos conformados por 5 ratas por grupo para hacer un total de 20 ratas por período de tratamiento. EL valsartán fue administrado vía oral (10mg/Kg). Al tiempo estipulado, las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/Kg) y eutanizadas por decapitación (Figura 5).

Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
LPS		LPS		LPS		LPS	
	TTO	TTO	TTO	TTO	TTO	TTO	TTO

Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15
LPS		LPS		LPS		LPS	
	TTO	TTO	TTO	TTO	TTO	TTO	TTO

CONTROL	LPS	VAL	LPS+VAL
Inyecciones con solución salina	Inyecciones con 10 μ L (1 mg/ml) de LPS de <i>E. coli</i>	Inyecciones con solución salina + tratamiento con VAL (10mg/Kg).	Inyecciones con 10 μ L (1 mg/ml) de LPS de <i>E. coli</i> , + tratamiento con Val (10mg/kg).

Figura 5.- Inducción de la periodontitis y esquema de tratamiento

Los maxilares inferiores fueron disecados y fijados en solución de formalina neutra al 10% por 24 h y desmineralizados con Osteomoll® (Merck), seguido de deshidratación. Los especímenes fueron embebidos en parafina y seccionados a lo largo de los molares en un plano mesiodistal, para el posterior análisis histológico. Los tejidos gingivales de las arcadas inferiores de cada rata fueron escindidos y recogidos juntos por grupo experimental. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio y previa aprobación del comité de bioética de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUCOSA.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, procediéndose a abrir la cavidad bucal para aislar las encías 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.

Para la medición de las enzimas antioxidantes los trozos de mucosa fueron colocados en 2 volúmenes de una solución fría (PBS 0,01 M, EDTA 1mM, aprotinina al 0,05% y ortovanadato de sodio (Na_3VO_4 100 mM)), sonicados en un aparato Ultrasonic Proccesor y centrifugados en una centrífuga Eppendorf mini spin por 10 min a 10.000 rpm. El sobrenadante recolectado fue utilizado como muestra.

Para la medición de la sintasa del oxido nítrico se tomaron trozos pequeños de tejido gingival se colocaron en buffer HEPES frío 50 mM + EDTA 1mM, se sonicaron en un aparato Ultrasonic Proccesor y centrifugados en una centrífuga Eppendorf tipo mini spin por 10 min a 10.000 rpm. El sobrenadante recolectado fue utilizado como muestra.

Para los experimentos de inmunofluorescencia; se sacrificaron los animales, se extrajo el tejido y se realizaron cortes de aproximadamente 3 micras con un micrótopo (MICROTOME PLUS, Triangle Biomedical Science TBS), colocando las muestras sobre portaobjetos; y congelándolas a -20C^0 hasta el día en que se realizo la inmunofluorescencia.

Para la determinación de proteína C reactiva (PCR), el malondialdehído (MDA) y las citocinas se recolectó saliva, para lo cual las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60mg/Kg) y utilizando una micropipeta se recolectó un aproximado de 500µL de saliva tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento, ésta fue congelada a -20C⁰ hasta el momento en que se realizaron los ensayos.

DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE PESO CORPORAL

Para observar si los diversos tratamientos influyeron en el estado sistémico general, los animales fueron pesados el día 0 del experimento y previamente a ser sacrificados es decir, al día 7 y al día 14 de tratamiento.

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) Y DE LA FRECUENCIA CARDÍACA (FC)

Para la determinación de la PA, Presión Arterial Sistólica (PAS) y Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardíaca (FC) se utilizó un método indirecto no invasivo mediante el empleo de un pletismógrafo digital de cola (Estorage pressure meter, modelo LES02, marca Panlab Harvard apparatus). Para ello, las ratas fueron colocadas en un cepo para la determinación no invasiva de los parámetros cardiovasculares. Estos fueron determinados a la misma hora el día 0 del experimento y previamente a ser sacrificados es decir al día 7 y al día 14 de tratamiento. La Presión Arterial Media (PAM) fue calculada de acuerdo a la fórmula: $PAD + 1/3(PAS - PAD)$.

RECUESTO DE LEUCOCITOS.

En el momento en que se sacrificaron los animales por decapitación se tomaron muestras de sangre periférica (2mL aproximadamente) y se colocaron en tubos estériles para extracción de sangre al vacío, con EDTA-K2 (Etilen Diamino Tetracético Acid dipotásica, 1,2 a 2,0 mg/mL de sangre). Posteriormente se colocaron en un tubo eppendorf 20µL de sangre y 380µL de reactivo de Turk para un volumen total de 400µL, se mezcló cuidadosamente, se dejaron en reposo un período no mayor de una hora y se procedió a llenar la cámara de recuento (Cámara de Neubauer), llevándola al microscópio (objetivo 10X) y realizándose el conteo de los 4 cuadrados exteriores, de 1mm de lado cada uno. El número de leucocitos fue calculado tomando la suma de las células contadas multiplicado por 25 y el recuento de leucocitos fue expresado como células/mm³.

RECUESTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

Para el recuento diferencial de leucocitos se realizaron los frotis sanguíneos, se tiñeron con Giemsa se esperó 5 minutos, se lavaron y se secaron, luego se colocaron en aceite de cedro para ser observados al microscópio con un objetivo de 40X, el recuento diferencial de leucocitos fue expresado como el porcentaje de cada tipo de glóbulo blanco.

ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Se evaluó tanto cualitativa como cuantitativamente la pérdida ósea. Para ello después de cumplido el protocolo de la inducción de la EP los animales fueron sacrificados y los maxilares extraídos e inmediatamente colocados en una solución de formol buffer al 10%. Una vez fijados se pasaron por concentraciones crecientes de alcohol isopropílico y luego por xilol por varias horas para así lograr la deshidratación del tejido. Posteriormente las muestras fueron incluidas en bloques de parafina y se realizaron cortes con la ayuda de un micrótopo (MICROTOME PLUS, Triangle Biomedical Science TBS), a fin de obtener secciones de 3µm. A continuación, el tejido fue desparafinado mediante lavados sucesivos con xilol y concentraciones decrecientes de etanol. Para la observación y registro de los cortes de tejido se empleó un microscopio NIKON con cámara digital Olympus conectado a computadora. Las imágenes fueron digitalizadas y los análisis morfométricos realizados según el programa Image J (versión 1.36), lo cual permitió la obtención de resultados cuantitativos (estadísticos) a partir de la imagen. Las imágenes procesadas fueron cuantificadas a través de histogramas de densidad. Para la cuantificación de las variaciones densitométricas se calculó el % de variación del N° de píxeles presentes entre control y tratado.

TINCIÓN CON TRICROMICO DE MASSON

Las fibras de colágeno son los elementos mas frecuentemente hallados en el tejido conjuntivo. Tienen una función básica de soporte y son sintetizadas por múltiples elementos celulares del organismo, entre los que destacan los fibroblastos. Desde el punto de vista histológico las fibras de colágena, se pueden estudiar mediante técnicas convencionales de coloración que se

agrupan bajo la denominación de coloraciones tricrómicas, que combinan diferentes colorantes y tiñen principalmente el colágeno tipo I, que forma las gruesas fibras de colágeno existentes en los espacios extracelulares y estromas de todos los órganos.

El Tricrómico de Masson combina la hematoxilina férrica, la fucsina ácida de Biebrich, tiñendo las fibras colágenas en general de color verde. Las secciones fijadas en formalina y parafinizadas fueron tratadas con una solución de Bouin por una hora en estufa a 56°C, se dejaron enfriar por 10 min y se lavaron con agua destilada hasta que desapareció el color amarillo. Se tiñó con hematoxilina férrica durante 10 min., y luego se lavaron con agua destilada y posteriormente fueron teñidos con solución ácida de escarlata-fucsina de Biebrich durante 2-5 min.

TINCIÓN DE VON KOSSA

La tinción de Von-Kossa se utiliza para observar los depósitos de calcio. Para lo cual las muestras fueron desparafinadas e hidratadas con agua. Se incubaron las secciones con 5% de solución de nitrato de plata en la oscuridad durante 1 hora, seguidamente se enjuagaron y se colocaron en solución de tiosulfato de sodio durante 5 minutos, se revelaron con solución para revelado fotográfico, hasta que los cortes tornaron al color marrón, se enjuagaron con agua destilada. Se contrastaron durante 5 minutos luego se enjuagaron con agua destilada y se deshidrataron en alcohol y xileno, y por último se montaron en cubreobjetos. La tinción de Von Kossa permite ver las sales de calcio en negro o marrón-negro, los núcleos en rojo, y el citoplasma en rosa.

DETERMINACIÓN DEL NUMERO DE OSTEOCLASTOS

Para la determinación del recuento de osteoclastos se utilizó el kit de fosfatasa ácida de Sigma-Aldrich el cual se utiliza para la demostración citológica de la actividad de la fosfatasa ácida en tejido, ésta se basa en el uso de Baftol AS-BI fosfato y sal de Fast Garnet GBC, este último componente de diazonio fue seleccionado porque se acopla rápidamente con un pH ácido, formando depósitos de tinte altamente insolubles, el ácido tartárico se utiliza para demostrar la presencia de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP+). La actividad de la fosfatasa ácida se manifiesta como gránulos de color apurpurados o rojo oscuro en el citoplasma de la mayoría de los osteoclastos. El recuento de osteoclastos se realizó mediante la evaluación microscópica Confocal Olympus utilizando un lente de inmersión de aceite (900X) y contando en la zona a estudiar el número de osteoclastos presentes y se expresó como número de osteoclastos / área.

Para la definición del área de estudio, sobre la proyección de los cortes histológicos se trazó el segmento AB tangente a los ápices de las raíces mesial y distal. Desde el punto medio de AB, se trazó hacia el punto medio de la furcación el segmento CD. Éste a su vez se dividió en tres segmentos iguales por los puntos E y F por los que se trazaron dos líneas paralelas a AB, las que dividieron al espacio interradicular en los tercios cervical, medio y apical. El segmento CD, determinó el punto G en su intersección con la cresta del hueso interradicular. La pérdida ósea se determinó sobre el segmento CD según la siguiente relación: $PO = CG/CD \times 100$ (FIGURA 6).

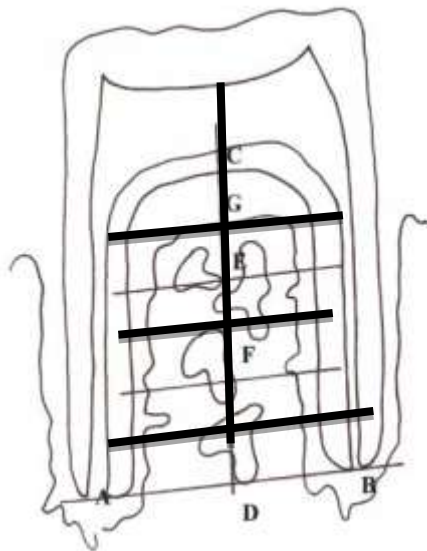


FIGURA 6. Definición del área de estudio, sobre la proyección de los cortes histológicos.

DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD DENTAL

La movilidad dental, como reflejo de la severidad de la periodontitis (pérdida de colágeno en los tejidos periodontales más pérdida de hueso alveolar), fue determinada usando un forceps para mover cada diente, de acuerdo al siguiente sistema de anotación: 0= ningún movimiento; 1= movimiento ligero (vestíbulo-palatino); 2=movimiento moderado (vestíbulo-palatino y mesio-distal); 3= movimiento severo (movilidad vertical dentro y fuera del alvéolo)

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NOS

La actividad de la NOS se determinó mediante la cuantificación de la conversión de arginina radiomarcada a [3H]-citrulina, utilizando una modificación del método descrito por Bredt y Snyder (1990). El tejido gingival fue mantenido en buffer HEPES 50mM, pH 7,1 + EDTA 1mM hasta el momento del ensayo. Las

muestras fueron preincubadas por 30 minutos a 37°C en buffer HEPES 50mM, pH 7,1 conteniendo ditioneitol (DTT) 1mM, β -NADPH 0,5 mM; CaCl_2 1,25mM y 10 $\mu\text{g/mL}$ de calmodulina 3H-arginina 0,12 μM y arginina 0,3 μM , y posteriormente sometidas a un período de incubación de 10 minutos. La reacción fue detenida agregando buffer HEPES 20 mM, pH 5,5; EDTA 4 mM, frío y calentando durante 5 min., a 90°C. Los tejidos fueron sonicados, centrifugados a 12.000 rpm durante 4 minutos y el sobrenadante colocado sobre una columna de Dowex 50, forma Na^+ (BioRad). La [3H]-citrulina fue eluída con 2 mL de agua y cuantificada mediante espectroscopia de centelleo líquido. La identificación de la [3H]-citrulina se realizó utilizando cromatografía de papel mediante comparación del tiempo de retención con un patrón de citrulina no radiomarcada. Los resultados se expresaron como picomoles de [3H]-citrulina formados/hora/mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CAT.

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984), midiendo la disminución de la absorbancia del H_2O_2 debido a su degradación por la CAT presente en la muestra. Para ello, se añadió 25 μL de homogenizado del tejido gingival a 725 μL de la mezcla de incubación conteniendo 10 mM H_2O_2 en un buffer fosfato 10 mM a pH 7, monitoreando el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 60, 120 y 180 segundos, utilizando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$, donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A_1 y A_2 son las

absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresan como k/mg de proteína.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA SOD TOTAL

La actividad de la SOD total se midió por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley y Spitz, 1984). Para ello se añadió 33 μL del tejido de interés homogenizado y diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7), al cual se añadió 166 μL de la mezcla de incubación (xantina 0,03 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150mM, albúmina 0,1% y NaHCO_3 400 mM), manteniéndose a 27 °C. La reacción se inicia con la adición de 10 μL de la enzima xantina oxidasa. Se incluirán controles constituidos por tejido sin enzima, así como de enzima sin tejido (100% de reducción). Los tubos se incubaron por 30 minutos, seguidos de la adición de 60 μL de cloruro de cobre (II) 0,8 mM midiéndose la absorbancia a 595 nM. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50 % la formación de los cristales de formazán.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GPX

La actividad de la GPx fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé (1984), mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. El glutatión reducido es empleado por la GPx para reducir el peróxido de hidrógeno, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión

oxidado y NAD(P)H, y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. Los resultados se expresan promediando los cambios de absorbancia por minuto, multiplicando este promedio por 0,16 (este factor se obtiene tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H a 340 nm es de $6.22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde $1 \text{ U} = \mu\text{mol de NAD(P)H oxidado/min}$).

DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHÍDO

Como indicador de estrés oxidativo se midió la concentración de MDA, el cual es un dialdehído de 3 carbonos altamente reactivo producido a partir de los hidroperóxidos lipídicos, por lo que constituye un indicador importante de peroxidación lipídica. Para su medición se tomaron 100 μL de saliva y se utilizó el método de Buege y Aust (1978), que se fundamenta en la reacción de una molécula de MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico a un pH entre 2 y 3. El aducto formado exhibe una absorción primaria máxima a 532-535 nm y una secundaria más leve a 245 y 305 nm. Un volumen de la preparación de membranas (0,1-2 mg de proteínas/mL), se trató con 6 volúmenes de ácido fosfórico 1% P/V en HCl 0,1N y con dos volúmenes de ácido tiobarbitúrico (0,6%P/V en HCl 0,1 N), se mezcló y se incubó en agua hirviendo por 45 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se procedió a realizar una extracción con n-butanol. En la fase alcohólica se encuentra el complejo coloreado que se lee a 535 nm. En paralelo se prepara un blanco de reactivos y una curva estándar de malondialdehído (0-500 μM). Los resultados se expresaron como micromoles de malondialdehído presente en la muestra por mg de proteínas.

EVALUAR EL PAPEL DE LA NAD(P)H OXIDASA EN LA PRODUCCIÓN DE ERO EN LA PERIODONTITIS INDUCIDA POR LPS EN LA RATA.

Para la evaluación del efecto de la administración de apocinina y tempol sobre las enzimas antioxidantes se dividieron las ratas en 6 grupos: el grupo I que recibió inyecciones de solución salina interdiarias por 7 días, el grupo II que recibió inyecciones interdiarias de LPS, el grupo III que recibió una dosis diaria de 33µg/kg/día de Apocicina (APO) por vía intraperitoneal por 7 días, el grupo IV que recibió una dosis interdiaria de LPS y una dosis diaria de APO, el grupo V que recibió Tempol (20 mg/kg/día) por vía intraperitoneal durante 7 días y el grupo VI que recibió el tratamiento combinado de LPS+Tempol durante 7 días. Las determinaciones de las enzimas se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos.

DETERMINACION DE LA PROTEINA C REACTIVA

Se realizó la determinación de PCR a través de un estuche comercial (DRG® C-Reactive Protein (CRP) ELISA (EIA-1952) el cual esta 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 0,5 M H_2SO_4 y los valores de absorbancia se determinaron a 450 nm. La curva estándar se obtuvo representando los valores de absorbancia frente a los valores referenciales correspondientes. La concentración de PCR en muestras se determinó por interpolación a partir de la curva estándar, y se expresó en $\mu\text{g/mL}$.

DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN

Un completo perfil inflamatorio fue determinado a través de un inmunoensayo utilizado el sistema de análisis multiplex. Para la determinación de las citocinas se utilizaron un $N= 5$ para cada grupo experimental de 7 y de 14 días de tratamiento y se determinó un grupo de once (11) citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, MIP-3 α , RANTES, TNF- α (Bio-Plex Pro Assays Cytokine 23-plex, Bio-Rad, Hercules, CA).

Este sistema está basado en la tecnología xMAP, la cual permite la multideterminación de citoquinas presentes en una sola muestra a través de la unión específica del analito a esferas de poliestireno marcadas con un amplio espectro de fluorescencias que pueden ser identificadas y cuantificadas por un láser acoplado al equipo Bio-PLEX (BioRad®).

Este ensayo emplea el método inmunoenzimático de sándwich estándar (Figura 7), usando placas de 96 pozos para la captura de anticuerpos que están acoplados a esferas fluorescentes, los cuales reaccionan con la muestra que contiene la proteína de interés. Después de la incubación, se realizan una serie de lavados para remover los analitos no unidos, y un anticuerpo de detección biotinilado específico para un epítipo diferente del analito es adicionado a las esferas. Esto resulta en la formación de un sándwich de anticuerpos alrededor del analito específico. Para la detección, se adiciona un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, el cual se une a los anticuerpos biotinilados. El contenido de cada pozo es cargado en el lector Bio-Plex, el cual identifica y cuantifica cada reacción específica en función del color y la intensidad de la señal fluorescente. Esta intensidad será proporcional a la concentración de la proteína a analizar y será medida por espectrofotometría a 450nm. Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10-20 μg de proteínas/10 μL , por lo cual fueron expresadas en pg/mg proteína.

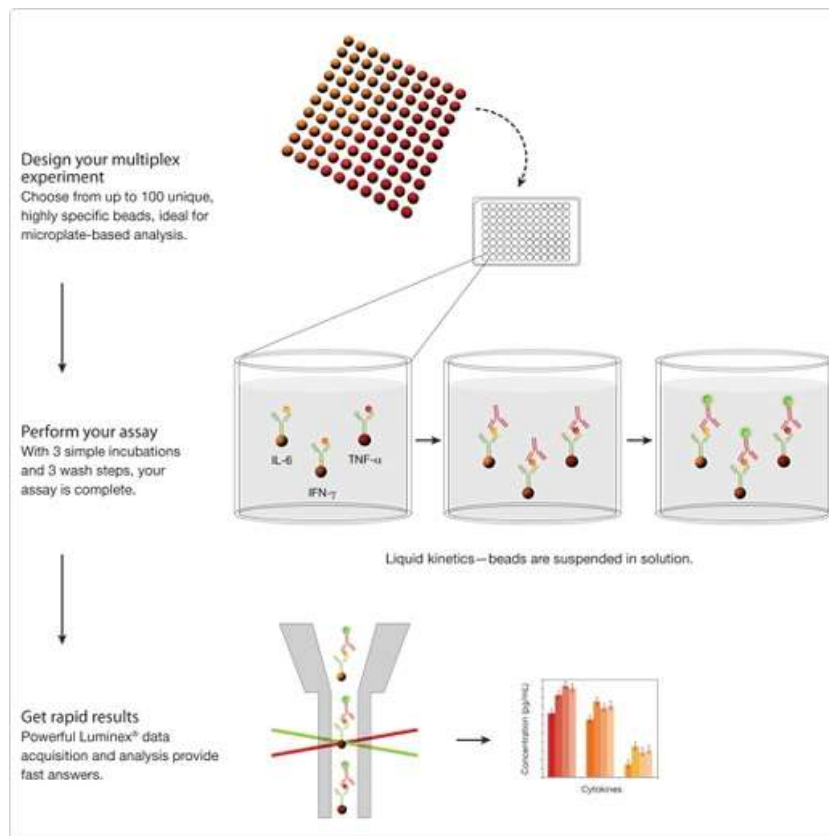


Figura 7. Representación esquemática del flujo de trabajo del ensayo a través del Bio-Plex.

INMUNOFLUORESCENCIA

La determinación de la expresión de proteínas se realizó mediante inmunofluorescencia para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Después de realizados los cortes y colocados en los cubreobjetos se lavaron con PBS (10 mM pH=7), se permeabilizaron con metanol a -10°C por 10 min., luego se eliminó la auto fluorescencia mediante la incubación en NH_4Cl (100mM) 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 (Tabla I) con PBS, 1% BSA y posteriormente se lavaron con PBS tres veces durante 10 minutos, se incubaron durante 1 hora

con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo (FITC longitud de onda 475-500nm) (Tabla I), que reconoció específicamente a cada uno de los anticuerpos primarios utilizados con PBS 1 % BSA. Se lavó con PBS tres veces por 10 min. Se realizó la tinción de los núcleos celulares incubando las muestras con DAPI (longitud de onda 375-400 nm)(Tabla I) se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos y se procedió a realizar el montaje con glicerol 80%. Las imágenes se capturaron en un microscopio Confocal Olympus y se analizaron con el software Image J (National Institute of Health, USA)

Tabla I. Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology, INC.

Anticuerpo Primario	Dilución utilizada	Anticuerpo Secundario	Dilución utilizada
AT1 (N-10):sc-1173	1:200	Mouse anti-goat IgG-FITC:sc-2356	1:200
OPG (H-249):sc-11383	1:200	Mouse anti-rabbit IgG-FITC:sc-2359	1:200
RANKL (C-20):sc-7627	1:200	Mouse anti-goat IgG-FITC:sc-2356	1:200
p-p38(Tyr 182):sc-101759	1:200	Mouse anti-rabbit IgG-FITC:sc-2359	1:200
p-38 (A-12):sc-7972	1:200	Goat anti mouse IgG _{2a} -FITC: sc-2079	1:200
NFkB (A):sc-109	1:200	Mouse anti-rabbit IgG-FITC:sc-2359	1:200
p-NFkB (Ser 536):sc-33020	1:200	Mouse anti-rabbit IgG-FITC:sc-2359	1:200
TLR4 (C-18): sc-8694	1:200	Mouse anti-goat IgG-FITC:sc-2356	1:200
RANK (H-300):sc-9072	1:200	Mouse anti-rabbit IgG-FITC:sc-2359	1:200
DAPI sc-3598			

DETERMINACIÓN LAS PROTEINAS TISULARES

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951) utilizando BSA como patrón. Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10-20 μg de proteínas/10 μl .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media ($X \pm \text{EEM}$) y fueron graficados y analizados a través del 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 $p < 0,05$ serán considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Determinación de la variación del peso corporal

Como puede observarse en la figura 8 y en la Tabla V, todos los animales en estudio ganaron peso en ambos períodos de tratamiento. Los animales tratados con VAL presentaron una ganancia de peso similar a la del grupo control (C:8,53±0,12; VAL:7,77±0,14) (n=17) a los 7 días y (C:16,61±0,32; VAL:16,67±0,31) (n=18) a los 14 días de tratamiento. En el grupo tratado con LPS observamos tanto a los 7 como a los 14 días, una ganancia de peso estadísticamente menor que la correspondiente al grupo control (LPS:4,30±0,14 a los 7 días de tratamiento n=17 y 13,33±0,23 a los 14 días de tratamiento n=18). Los animales tratados con LPS+VAL, mostraron sin embargo una ganancia de peso que aunque menor, no difiere significativamente de la del grupo control (7,47±0,24 a los 7 días de tratamiento n=17 y 15,44±0,41 a los 14 días de tratamiento n=18).

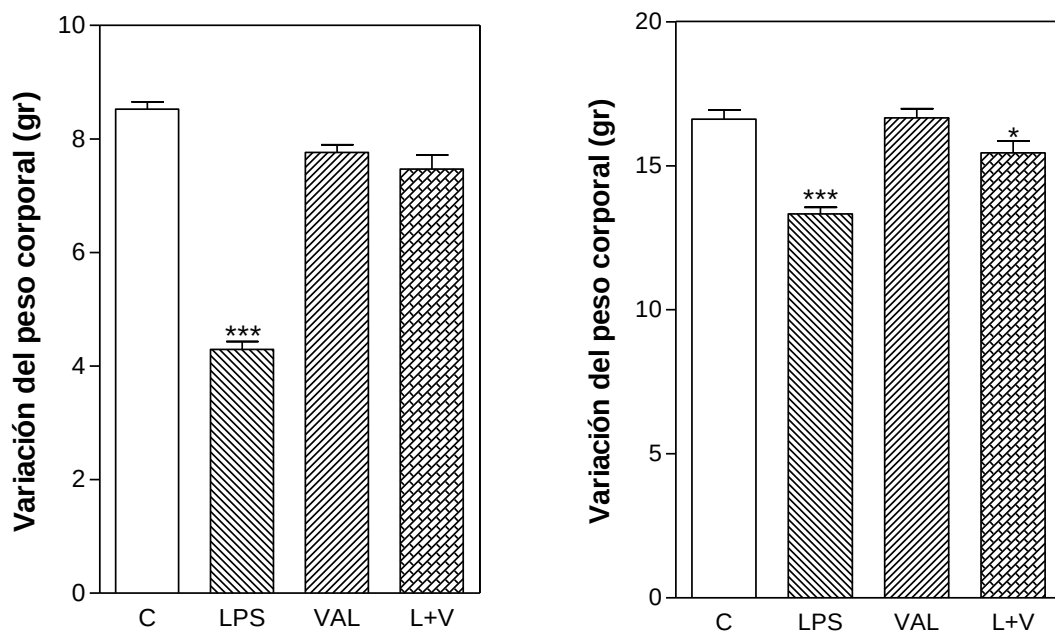


Figura 8. Variación del peso corporal en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento. Incremento del peso en gramos. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M.***p<0,001 respecto al grupo control.*p<0,05 respecto al grupo VAL.

Tabla II. Variación del peso corporal en los cuatro grupos experimentales. Incremento de peso en gramos (%).

	CONTROL	LPS	VAL	LPS+VAL
	Ganancia en g / (%)			
7 días	9 (100%)	4 (55, 6%)	8 (1, 12%)	7 (1, 28%)
14 días	17 (100%)	13 (23, 53%)	17 (0%)	15 (11, 77%)

Determinación de la presión arterial media (PAM).

En la figura 9, se observa que el tratamiento con el LPS no produjo modificaciones significativas en la PAM de las ratas en ambos tiempos de tratamiento. El tratamiento con valsartán tampoco produjo cambios en relación a la PAM en ninguno de los grupos experimentales mostrando que el valsartán no alteró la presión arterial en los animales normotensos. Valores de la presión arterial media basal (C:102,8±3,90; LPS:107,1±2,91; VAL: 102,9±3,32; L+V:103,1±2,64) (n=10), valores de la presión arterial media a los 7 días de tratamiento (C:103,4±2,80; LPS:104,88±4,33; VAL:109,5±6,32; L+V:104,8±3,56) (n=10), valores de la presión arterial media a los 14 días de tratamiento (C:106±1,88; LPS:102±5,10; VAL:105,4±4,63; L+V:102,6±1,21) (n=5).

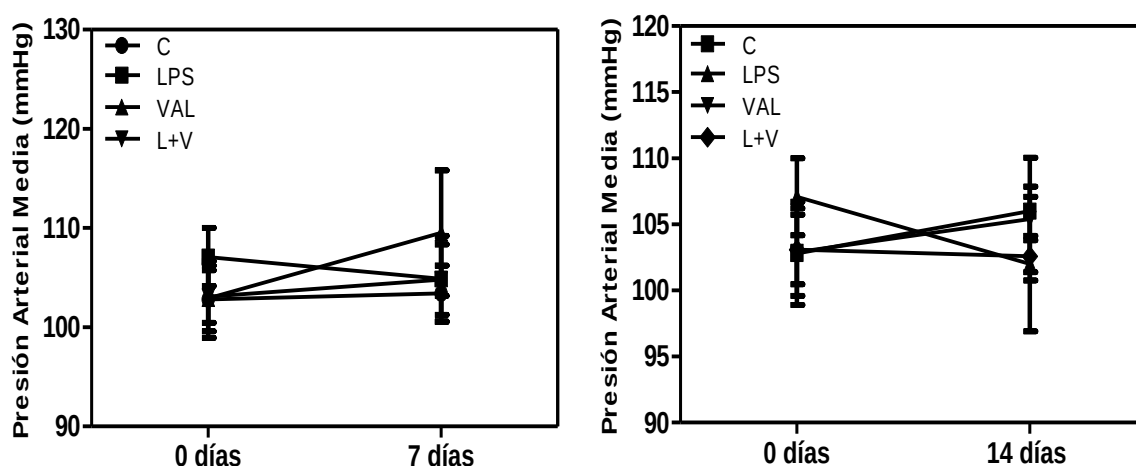


Figura 9. Presión arterial media (PAM) en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento. Cada barra representa la media ± E.E.M.

Recuento de leucocitos y recuento diferencial de leucocitos

Los animales no mostraron signos aparentes de enfermedad sistémica a lo largo de ambos períodos de tratamiento aunque se pudo evidenciar en el grupo a los cuales se indujo EP mediante LPS, una pronunciada leucocitosis cuando comparados con el grupo control, tanto a los 7 (C: $8023 \pm 364,78$; LPS: $13262 \pm 175,97$) ($n=13$), como a los 14 días, (C: $7706 \pm 201,19$; LPS: $15912 \pm 166,11$) ($n=16$), (Figura 10). La efectividad del tratamiento con el VAL en la reducción del número de leucocitos contados en sangre periférica, queda evidenciada ya que el incremento de los valores de leucocitos sobre el grupo control, observado en el grupo con EP inducida por LPS, es revertido por el tratamiento con el antagonista de los receptores AT1 de la Angiotensina a los 7 días (Val: $8123 \pm 261,81$, $n=13$; L+V: $8813 \pm 135,14$; $n=12$) y 14 días de tratamiento (VAL: $7709 \pm 208,08$, $n=16$; L+V: $8275 \pm 182,06$, $n=16$). La leucocitosis observada fue a expensas principalmente de un incremento de los neutrófilos en el grupo tratado con LPS (Tabla III).

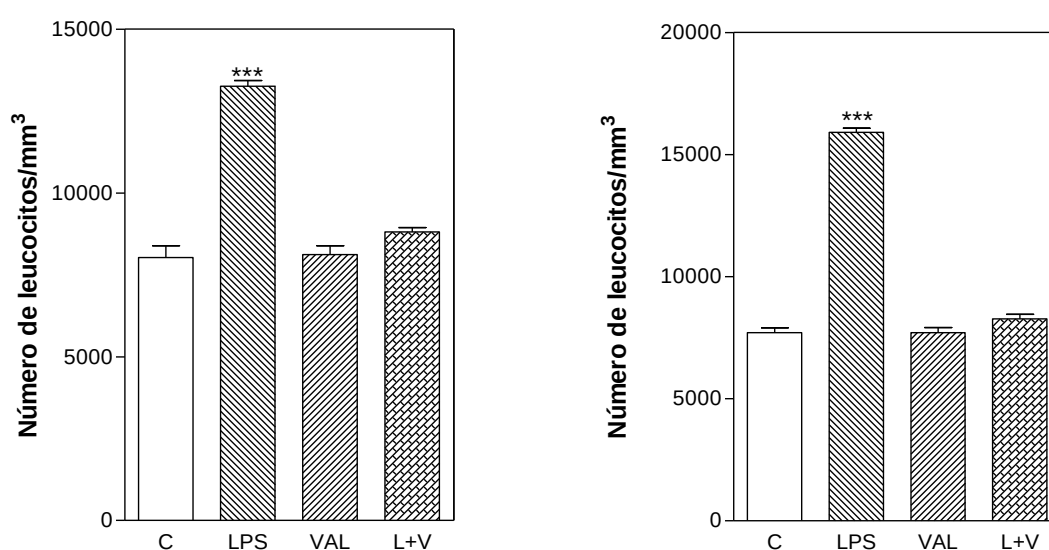


Figura 10. Recuento de leucocitos en los grupos de 7 (panel izquierdo) y 14 días (panel derecho) de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control.

Tabla III. Recuento diferencial de leucocitos en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento.

7 días				
Parámetro	CONTROL	LPS	VAL	L+V
Neutrófilos (%)	23	31	23	26
Linfocitos (%)	76	68	75	73
Otros (%)	2	1	2	1

14 días				
Parámetro	CONTROL	LPS	VAL	L+V
Neutrófilos (%)	22	33	22	29
Linfocitos (%)	77	64	77	70
Otros (%)	1	1	1	1

Análisis histológico de la pérdida ósea

La Figura 11, muestra el aspecto macroscópico de las mandíbulas de rata en los cuatro grupos experimentales, a los 7 y 14 días de tratamiento, la flecha señala el área donde se induce la EP la cual se manifiesta por la retracción del hueso en el grupo LPS comparado con el grupo control, se observa que este efecto se ve revertido en el grupo LPS+VAL en ambos períodos de tratamiento.

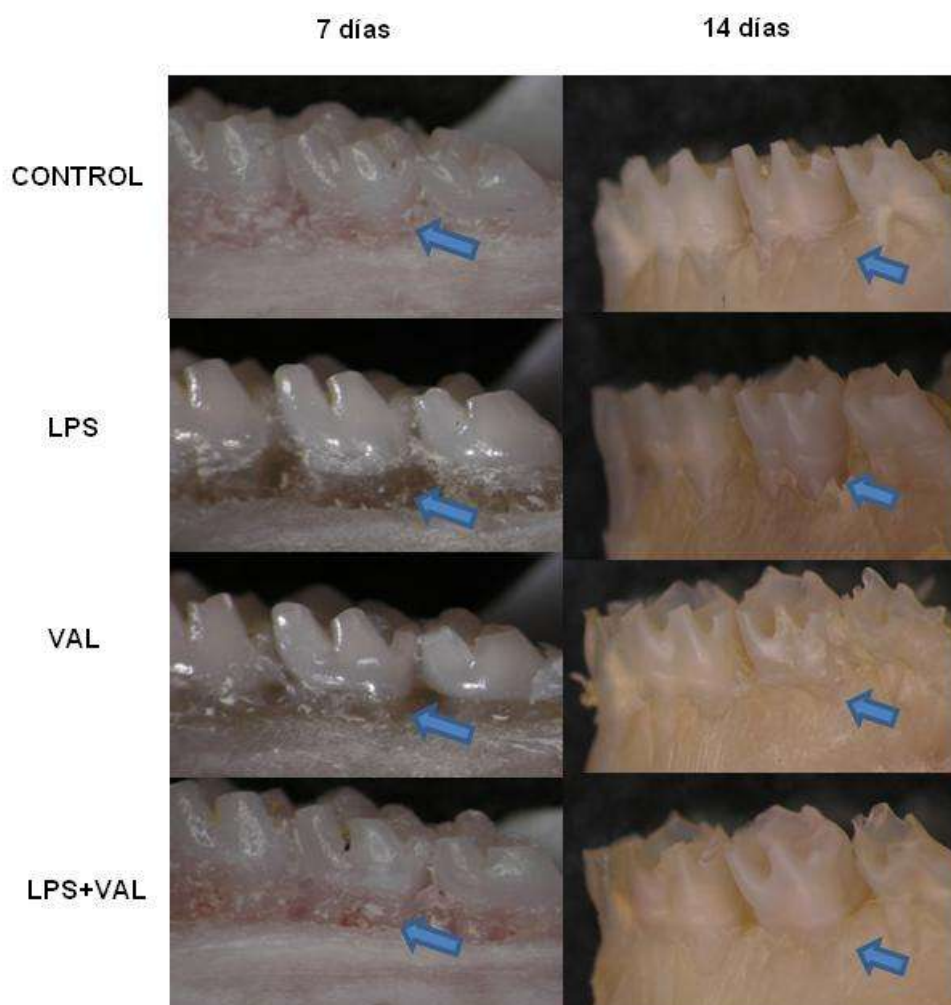


Figura 11. Registros fotográficos de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas. Aspectos macroscópicos de un maxilar de los cuatro grupos experimentales en los dos tiempos de tratamiento.

Como se observa en la figura 12, el análisis histopatológico de la región entre el primero y segundo molar, de los animales a los que se les indujo la EP experimental con inyecciones con LPS durante 7 días, mostró acentuada destrucción del hueso alveolar, destacándose el desplazamiento hacia la derecha en la escala de grises, comparado con el grupo control. Los valores de pérdida ósea en la periodontitis inducida por LPS (en % respecto al control), fueron de 47,83% a los 7 días de tratamiento y de 20.33% a los 14 días de inducción con LPS. Estos valores fueron drásticamente reducidos en el grupo LPS+VAL mostrando una clara preservación del proceso alveolar.

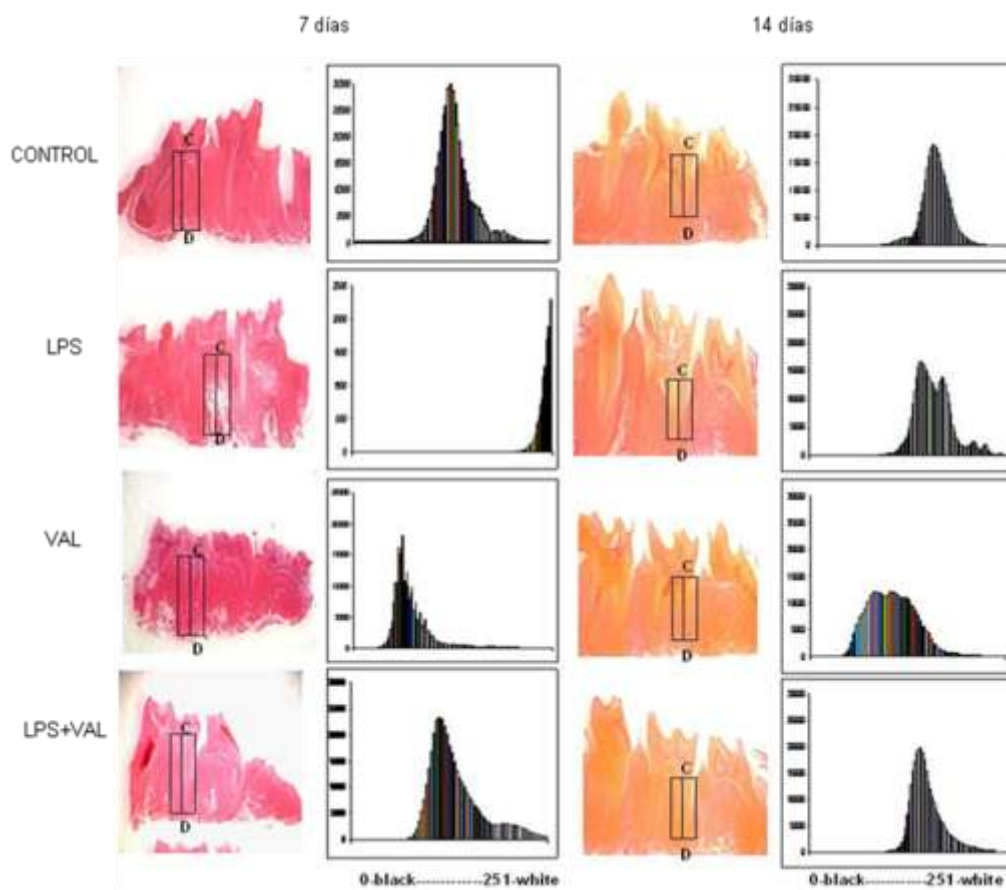


Figura 12. Aspecto microscópico donde se representa el área de pérdida e histograma resaltando la pérdida ósea en el maxilar de las ratas a los 7 y 14 días de tratamiento. Tinción de Hematoxilina y eosina.

La Figura 13 muestra la tinción de tricrómico de Masson, la cual resalta la presencia de fibras colágenas en color verde. Observamos en ambas figuras, una disminución de la intensidad de coloración de un 53,96% y 54,20% en el grupo LPS tratados por 7 y 14 días respectivamente comparado con el grupo control, indicando una disminución de los depósitos de calcio. Este efecto se ve revertido en el grupo LPS+VAL, 24,39% y 27,70% en ambos períodos de tratamiento (Tabla IV). Por otro lado la figura 14 muestra la tinción de Von-Kossa, la cual permite distinguir el ribete de osteoide en rojo intenso y el hueso mineralizado en color negro. Observamos una disminución de la intensidad de coloración de un 28,50% y 49,14% en el grupo LPS tratados por 7 y 14 días respectivamente comparado con el grupo control, indicando una disminución del colágeno. Este efecto se ve revertido en el grupo LPS+VAL en un 5,51% y 27,03% en ambos períodos de tratamiento (Tabla V).

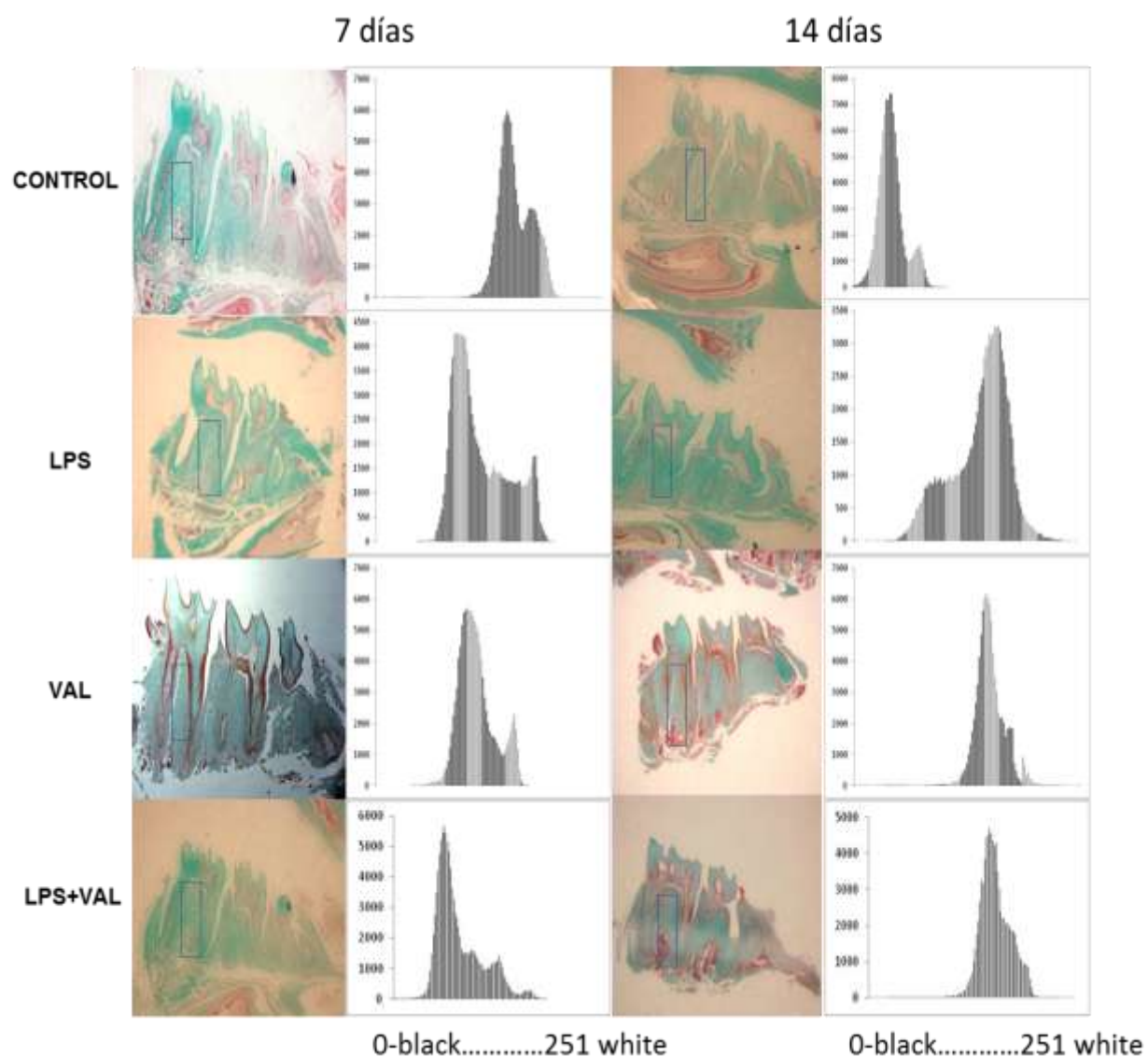


Figura 13. Registros histológicos de diferentes tinciones en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento. Tinción con Tricrómico de Masson (fibras colágeno tipo IV).

Tabla IV. Variación de la densidad de los histogramas en todos los grupos con la tinción de Tricrómico de Masson.

	CONTROL	LPS	VAL	L+V
	Valores absolutos (%)			
7 días	4038(100%)	1859 (53,96%)	3980 (1,43%)	3053 (24,39%)
14 días	3317 (100%)	1519 (54,20%)	3256 (1,83%)	2398 (27,70%)

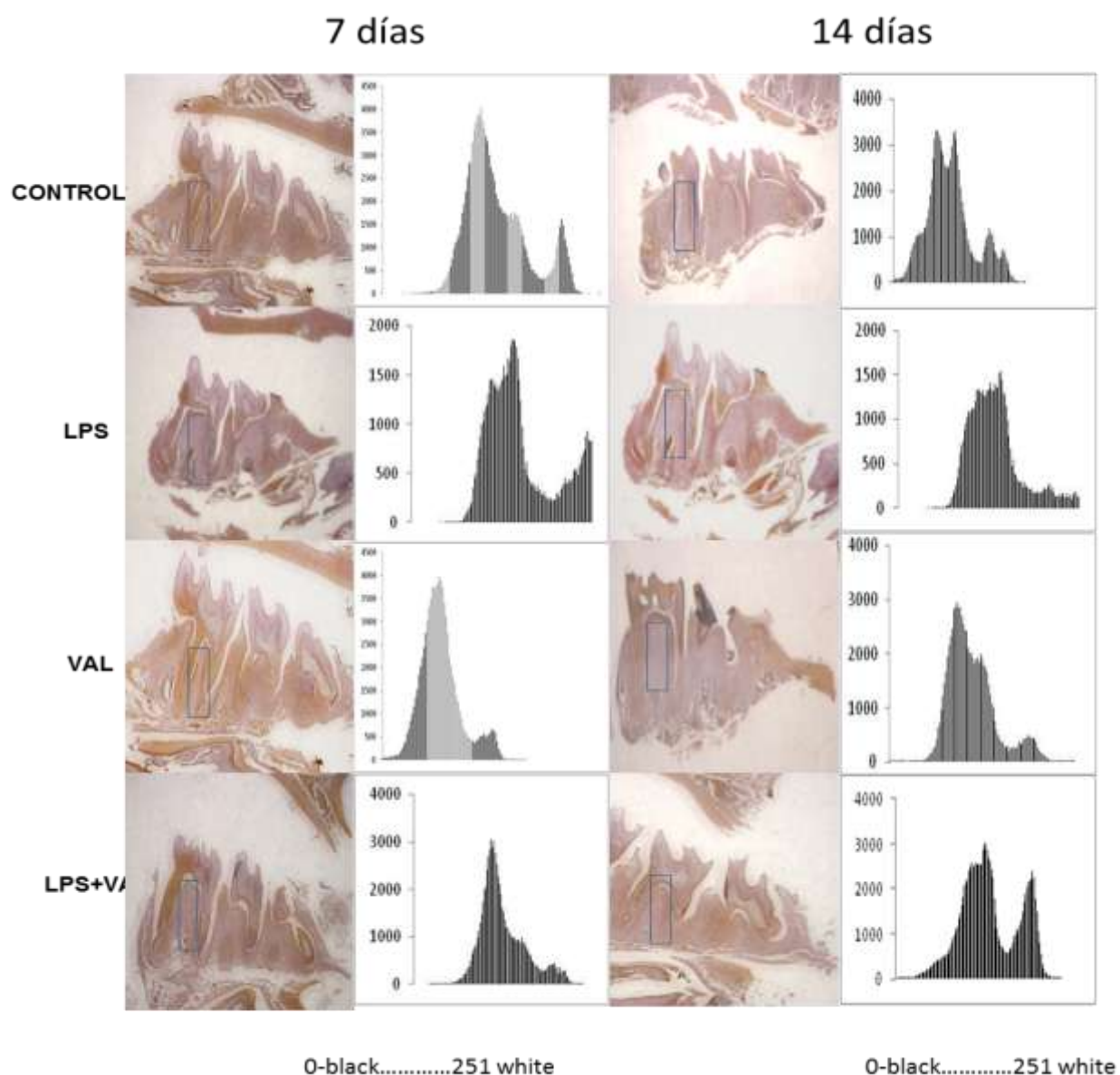


Figura 14. Registros histológicos de diferentes tinciones en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento. Tinción de Von-Kossa (fosfatos de calcio)

Tabla V. Variación de la densidad de los histogramas en todos los grupos con la tinción de Von-Kossa.

	CONTROL	LPS	VAL	L+V
	Valores absolutos (%)			
7 días	5989 (100%)	4282 (28,50%)	5721 (4,47%)	5659 (5,51%)
14 días	6426 (100%)	3268 (49,14%)	6189 (3,68%)	4689 (27,03%)

Recuento de osteoclastos

Las figuras 15 y 16 muestran el aspecto microscópico y el recuento de osteoclastos realizado mediante la prueba citoquímica para la detección de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP⁺) como marcador específico de osteoclastos y pre-osteoclastos, con el fin de cuantificar la osteoclastogénesis. Podemos observar, tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento un incremento del marcaje positivo de esta enzima en el grupo tratado con LPS a los 7 y a los 14 días de tratamiento cuando comparados con su control indicativo de actividad osteoclástica, observándose que en ambos casos, el marcaje disminuyó en intensidad en el grupo tratado con LPS+VAL. Esto fue corroborado cuando se realizó el recuento del número de osteoclastos, observándose que hay un aumento significativo de éstos en el grupo tratado con LPS a los 7 días (LPS:5,21±0,30; n=14) y que este aumento se hizo más evidente en el grupo de 14 días de tratamiento (6,17±0,30; n=12) (Figura 16) comparado con el grupo control (C:1,56±0,176; [7 días, n=9] y 1,60±0,16 [14 días, n=10]). Efecto que se vió disminuido con el tratamiento con el VAL a los 7 días de tratamiento (VAL:1,50±0,17; n=10; L+V:2,54±0,14; n=13) y revertido a los 14 días (VAL:1,78±0,15; n=9; L+V:2,36±0,15; n=11).

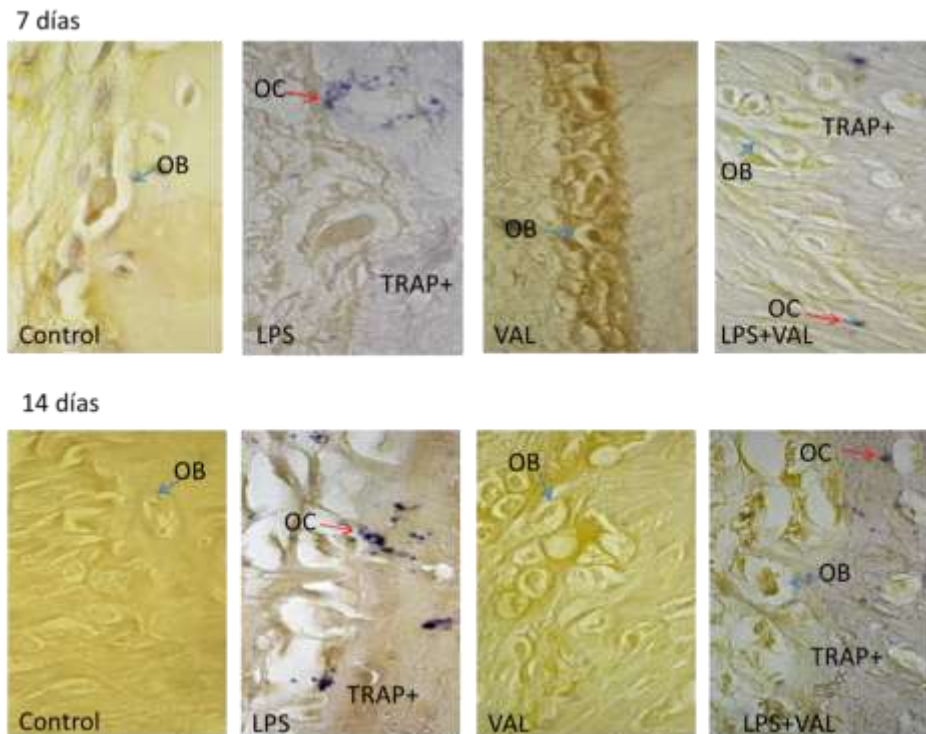


Figura 15. Aspecto microscópico de muestras de tejido gingival mostrando la presencia de osteoclastos y osteoblastos en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento respectivamente. Tinción por la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP⁺) como marcador específico de osteoclastos y osteoblastos.

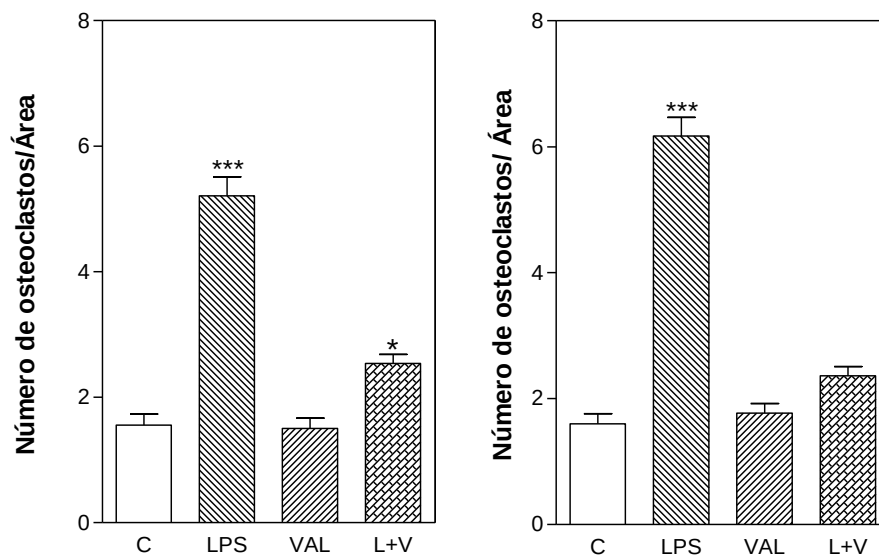


Figura 16. Recuento de osteoclastos en los grupos de 7 (panel izquierdo) y 14 días de tratamiento (panel derecho). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control. * $p < 0,05$ respecto al grupo VAL.

Determinación de la movilidad dentaria.

La tabla VI muestra un incremento en la movilidad dentaria en las ratas inyectadas con LPS, presentando un grado de 1 y 2 en el grupo de 7 días de tratamiento y de un grado de 2 y 3 en el grupo de 14 días de tratamiento, en comparación con la casi nula movilidad exhibida por las ratas en el grupo control en el caso de los 7 y 14 días de tratamiento donde presentaron grado 0. En ambos casos la movilidad dentaria disminuyó con el tratamiento LPS+VAL en ambos tiempos de tratamiento.

Tabla VI. Grado de movilidad dentaria en los cuatro grupos de experimentación tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento.

Grupo 7 días n=10	Grado 0 n (%)	Grado 1 n (%)	Grado 2 n (%)	Grado 3 n (%)
Control	7 (70%)	3(30%)	0 (0%)	0 (0%)
LPS	0 (0%)	2(20%)	8(80%)	0(0%)
VAL	6(60%)	4(40%)	0(0%)	0(0%)
L+V	0(0%)	8(80%)	2(20%)	0(0%)
Grupo 14 días n=10	Grado 0 n (%)	Grado 1 n (%)	Grado 2 n (%)	Grado 3 n (%)
Control	7 (70%)	3(30%)	0 (0%)	0 (0%)
LPS	0 (0%)	0(0%)	4(40%)	6(60%)
VAL	5(50%)	5(50%)	0(0%)	0(0%)
L+V	0(0%)	0(0%)	8(80%)	2(20%)

Actividad de la NOS en ratas con periodontitis inducida por inyecciones locales de LPS.

Al evaluar la actividad de la NOS (Figura 17), observamos que el tratamiento con LPS produjo un aumento significativo en dicha actividad con relación al grupo control efecto que fue prevenido mediante el tratamiento con VAL. (C:17,52±0,46; n=4; LPS:29,33±0,60; n=7; VAL:17,90±0,35; n=7; L+V:20,01±0,37; n=4),

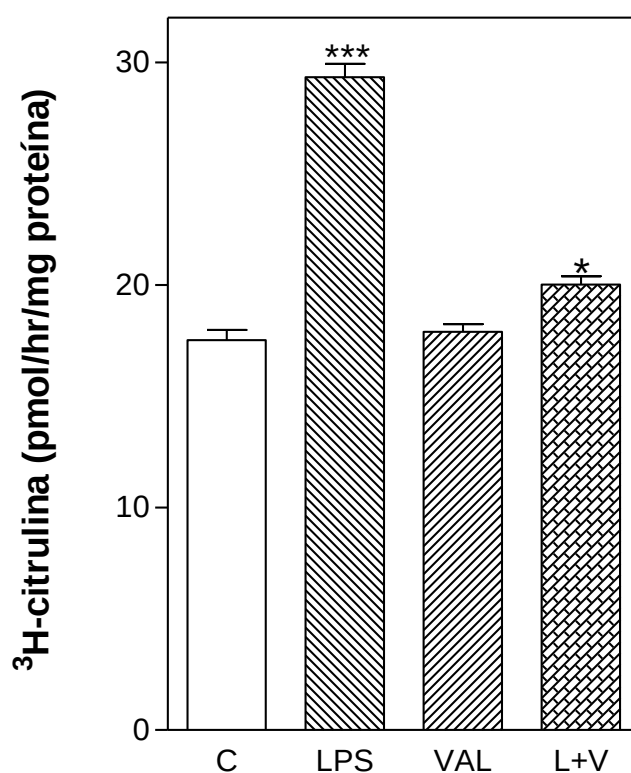


Figura 17. Actividad de la NOS en el grupo tratado por 7 días. Cada barra representa la media ± E.E.M. ***p<0,001 respecto al grupo control. *p<0,05 respecto al grupo VAL.

Actividad de las enzimas antioxidantes en ratas con periodontitis inducida por inyecciones locales de LPS.

Por otro lado al evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y la GPx se observa un incremento significativo en el grupo de las ratas con periodontitis inducida con el tratamiento con LPS comparada con el grupo control. En todos los casos este efecto fue revertido mediante el tratamiento con el antagonista del receptor AT1 (Val) tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento (Figuras 18 y 19).

Tabla VII. Valores de las enzimas antioxidantes en los cuatro grupos de experimentación a los 7 y 14 días de tratamiento

7 días	C	LPS	VAL	L+V
SOD	12,55±0,23 n=13	19,28±0,20 n=15	13,17±0,13 n=14	13,47±0,15 n=14
CAT	0,045±0,0018 n=31	0,067±0,0009 n=25	0,044±0,002 n=21	0,039±0,002 n=23
GPx	18,26±0,12 n=24	30,53±0,14 n=23	18,69±0,19 n=22	19,28±0,22 n=22
14 días				
SOD	15,04±0,28 n=7	20,69±0,60 n=8	14,64±0,65 n=8	16,84±0,28 n=8
CAT	0,041±0,001 n=12	0,071±0,001 n=13	0,040±0,004 n=10	0,047±0,003 n=12
GPx	28,18±0,20 n=8	46,89±0,30 n=8	28,22±0,24 n=8	28,97±0,98 n=8

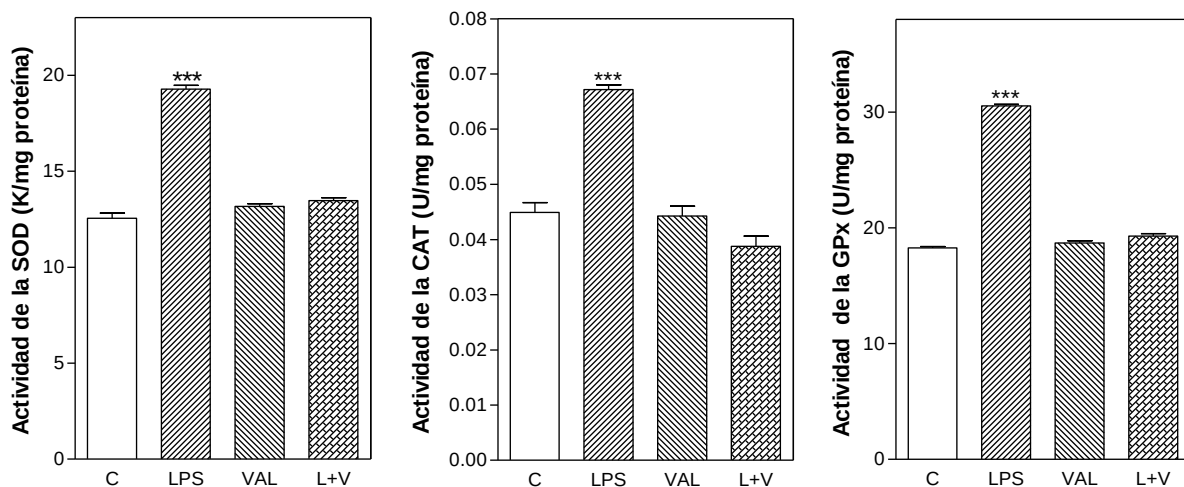


Figura 18. Actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en los grupos de 7 días de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p<0,001 respecto al grupo control.

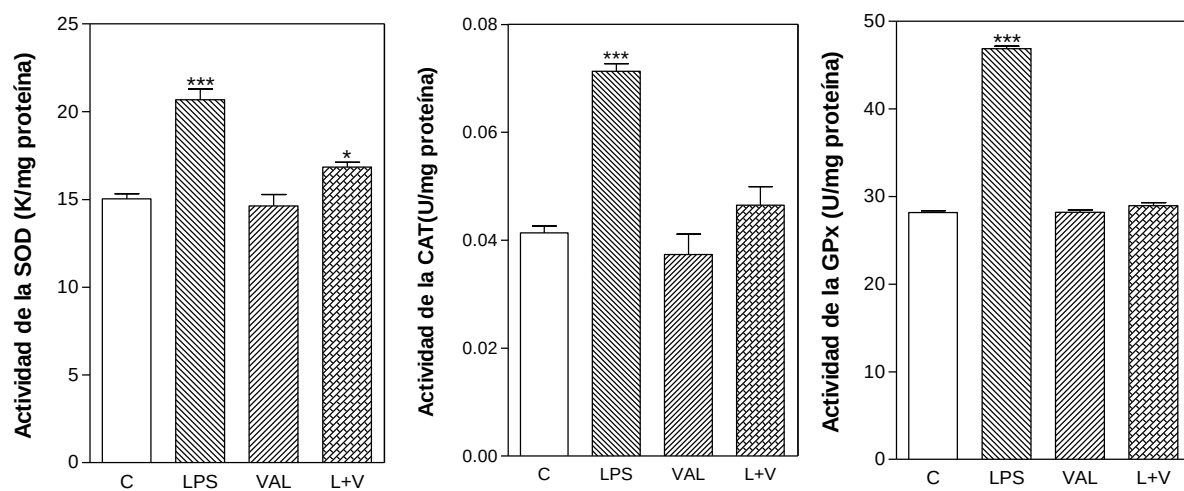


Figura 19. Actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en los grupos de 14 días de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p<0,01 respecto al grupo control. **p<0,001; * p<0,05 respecto al grupo VAL.

Concentración de malondialdehído como expresión de la peroxidación lipídica

Se determinó la concentración del MDA como indicador de estrés oxidativo observándose que en ambos tiempos de tratamiento hubo un aumento significativo del MDA en el grupo tratado con LPS (LPS:41,29±0,75 n=6 a los 7 días y 70,88±0,54 n=5 a los 14 días de tratamiento) con relación al grupo control (C: 29,29±0,37 y Val:28,2±0,76 n=8 a los 7 días de tratamiento y 29,73±0,42 n=6 y VAL: 29,55±0,55 a los 14 días de tratamiento) efecto que disminuyó con el uso del VAL (L+V:32,40±2,38 n=4 a los 7 días y 31,23±0,60 n=8 a los 14 días de tratamiento) (Figura 20).

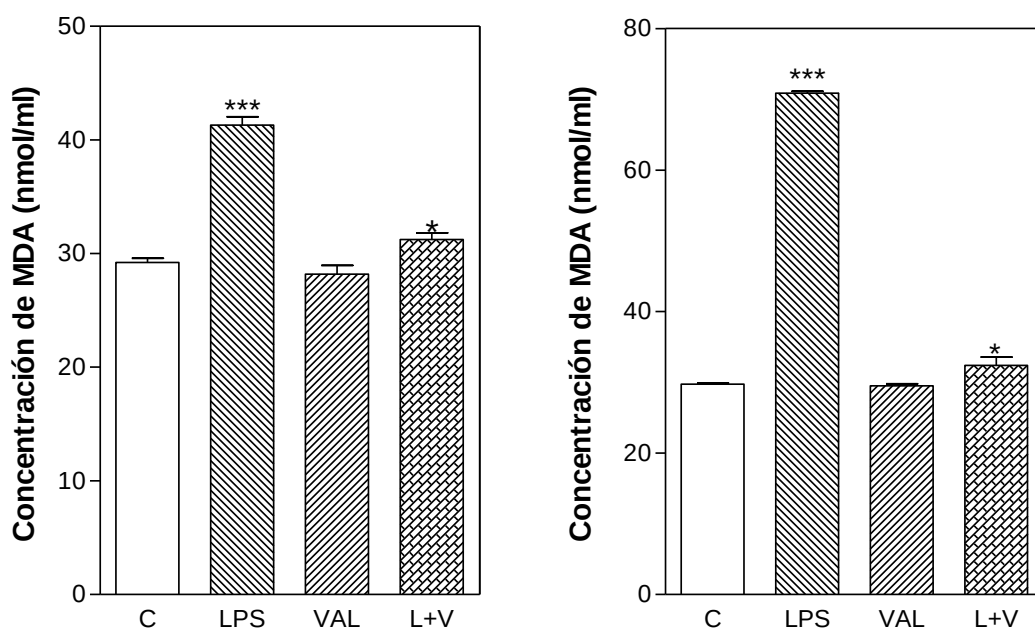


Figura 20. Concentración de malondialdehído en los grupos de 7 (panel izquierdo) y 14 días (panel derecho) de tratamiento. Cada barra representa la media ± E.E.M ***p<0,001 respecto al grupo control ;*p<0,05 respecto al grupo VAL.

Efecto del pretratamiento con Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) un inhibidor de la NAD(P)Hox sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.

Como se observa en la Figura 21, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx se encuentran significativamente aumentadas en las ratas con periodontitis inducida por inyecciones de LPS (SOD: $20,17 \pm 0,27$; CAT: $0,087 \pm 0,001$; GPx: $31,87 \pm 0,40$) (n=5) comparados con el grupo control (SOD: $12,41 \pm 0,1$; CAT: $0,05$; GPx: $14,00 \pm 0,34$) (n=5). El tratamiento crónico con Apocinina revirtió completamente el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes ocurrido en las ratas con periodontitis inducida por inyecciones de LPS (APO: SOD: $12,99 \pm 0,87$; CAT: $0,06 \pm 0,001$; GPx: $15,24 \pm 0,50$) (n=4), (L+A: SOD: $12,71 \pm 0,15$; CAT: $0,01 \pm 0,002$; GPx: $16,20 \pm 0,17$) (n=6).

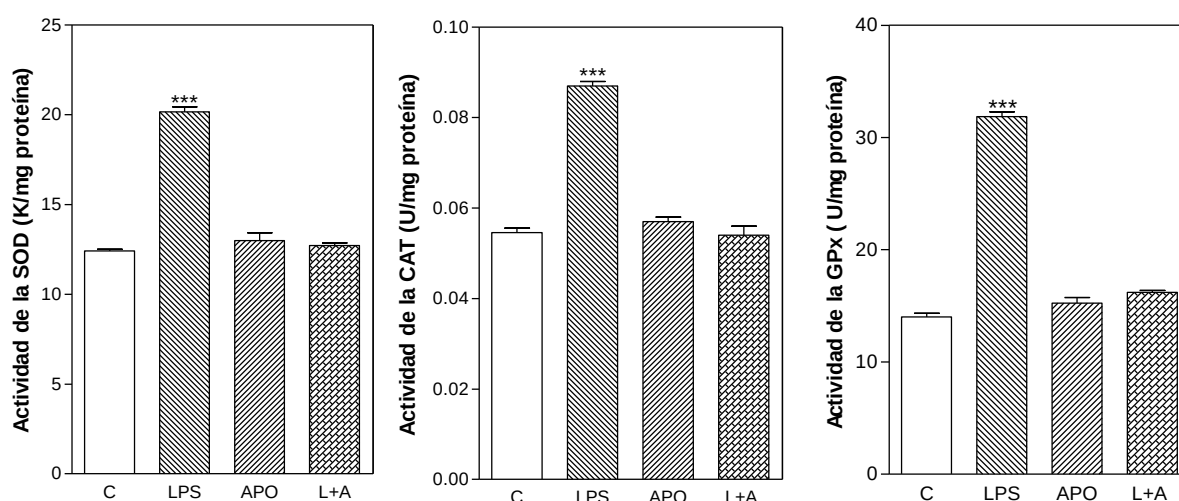


Figura 21. Efecto de la administración de Apocinina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx en los grupos de 7 días de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p<0,001 respecto al grupo control.

Efecto del pretratamiento con Tempol, un mimético de la SOD sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx se encuentran significativamente incrementada en las ratas con periodontitis inducida por inyecciones de LPS (SOD:20,39±0,27; CAT:0,087±0,001; GPx:31,87±0,40) (n=5) cuando comparados con el grupo control (SOD:12,22±0,27; n=6; CAT:0,05±0,001; n=5; GPx:14,00±0,34; n=5). La figura 22 muestra como el tratamiento crónico con TEMPOL, revirtió a valores control, el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por el LPS (TEM:CAT:0,05±0,001; CAT:13,34±0,32; GPx: 14,80±0,13 (n=5) y (L+T:SOD:12,83±0,28; n=6; CAT:0,06±0,001; n=6; GPx:15,96±0,22; n=5).

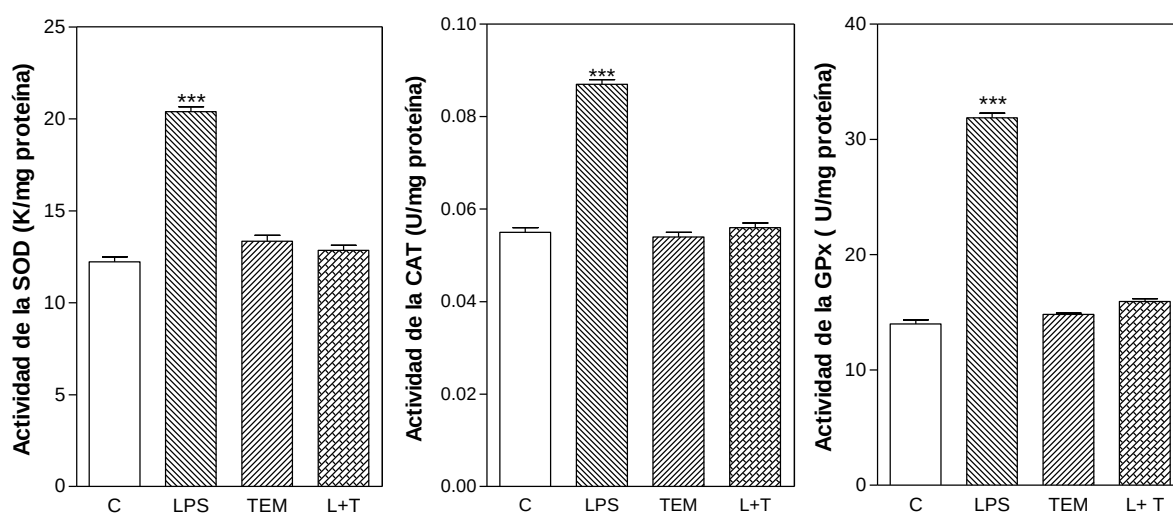


Figura 22. Efecto de la administración del Tempol (20 mg/kg/día) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en los grupos de 7 días de tratamiento. Cada barra representa la media ± E.E.M.. ***p<0,001 respecto al grupo control.

Determinación de la Proteína C-reactiva

En la figura 23 se observa como la PCR que es un reactante de fase aguda, se encuentra en niveles significativamente elevados en la saliva del grupo LPS ($1,61 \pm 0,02$ y $3,23 \pm 0,10$) ($n=10$) comparados con el grupo control (C: $0,63 \pm 0,0$ y $0,59 \pm 0,03$; $n=10$)(VAL: $0,62 \pm 0,01$ y $0,61 \pm 0,03$) ($n=9$), tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento. Observamos que este efecto se revierte en los grupos tratados con LPS+VAL efecto que se observa tanto para el grupo de 7 como el grupo de 14 días de tratamiento ($0,8 \pm 0,02$ y $1,49 \pm 0,10$) ($n=9$).

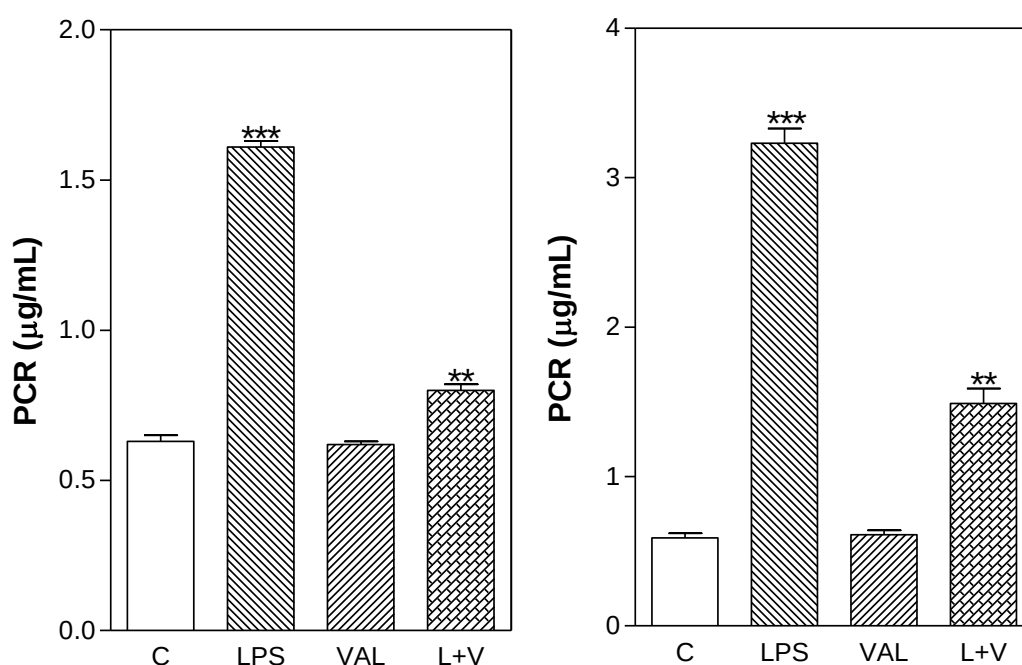


Figura 23. Determinación de la concentración de la PCR en la saliva de la rata en los grupos de 7 (panel izquierdo) y 14 días (panel derecho) de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control. ** $p < 0,01$ respecto al grupo VAL.

Determinación de citocinas y quimiocinas

Al evaluar las citocinas y quimiocinas (Figuras 24 a 34), se puede observar que en todos los casos, el grupo al que se le administró LPS, mostró un incremento de estas citocinas con relación al control, llegando a ser estadísticamente significativo para todas las citocinas y quimiocinas. Por otro lado observamos un efecto opuesto para la IL-4 (Figura 28) donde el LPS disminuyó de forma significativa los niveles de esta citocina con relación al control. En todos los casos el efecto fue parcial o totalmente revertido con el uso del antagonista del receptor AT1.

Tabla VIII. Valores de las citocinas en los cuatro grupos experimentales.

Citocina	C n=4	LPS n=4	VAL n=4	L+V n=4
IL-1 α (7 días)	0,46 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,03
IL-1 α (14 días)	2,55 $\pm$ 0,05	3,19 $\pm$ 0,02	2,5 $\pm$ 0,06	2,64 $\pm$ 0,02
IL-1 β (7 días)	0,95 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,02
IL-1 β (14 días)	1,40 $\pm$ 0,04	2,24 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,03	1,48 $\pm$ 0,03
IL-6 (14 días)	2,90 $\pm$ 0,28	4,85 $\pm$ 0,22	2,6 $\pm$ 0,25	3,13 $\pm$ 0,25
TNF- α (14 días)	0,37 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,04
IL-4 (7 días)	0,13 $\pm$ 0,002	0,072 $\pm$ 0,003	0,13 $\pm$ 0,004	0,12 $\pm$ 0,004
IL-4 (14 días)	1,30 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,03	1,18 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,03
IL-10 (14 días)	3,27 $\pm$ 0,07	7,47 $\pm$ 0,17	3,77 $\pm$ 0,28	3,41 $\pm$ 0,06
IL-18 (14 días)	3,41 $\pm$ 0,11	5,56 $\pm$ 0,05	3,23 $\pm$ 0,28	3,64 $\pm$ 0,17
IL-12 (14 días)	0,36 $\pm$ 0,003	0,46 $\pm$ 0,003	0,36 $\pm$ 0,002	0,39 $\pm$ 0,01
IL-17 (7 días)	0,054 $\pm$ 0,004	0,24 $\pm$ 0,006	0,066 $\pm$ 0,004	0,064 $\pm$ 0,002
IL-17 (14 días)	0,39 $\pm$ 0,005	0,56 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,04
MIP-3 α (7 días)	0,07 $\pm$ 0,001	0,17 $\pm$ 0,005	0,07 $\pm$ 0,003	0,09 $\pm$ 0,004
MIP-3 α (14 días)	0,67 $\pm$ 0,006	0,35 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,03
RANTES (7 días)	0,25 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,03
RANTES (14 días)	1,7 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,06	1,7 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,05

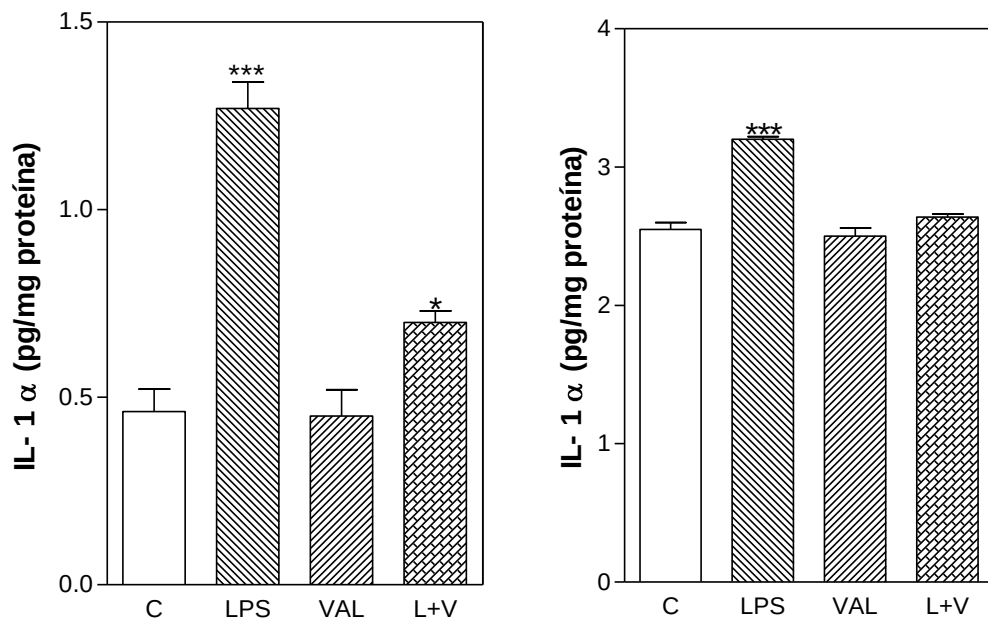


Figura 24. Concentración de IL-1 α en saliva en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p<0,001 respecto al control. *p<0,05 respecto al grupo VAL.

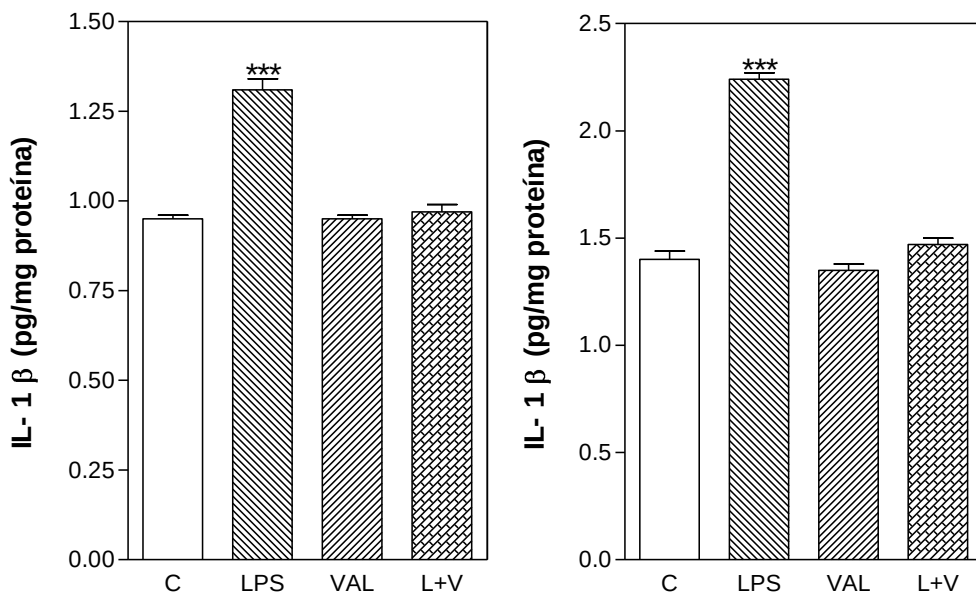


Figura 25. Concentración de IL-1 β en saliva en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. .***p<0,001 respecto al control.

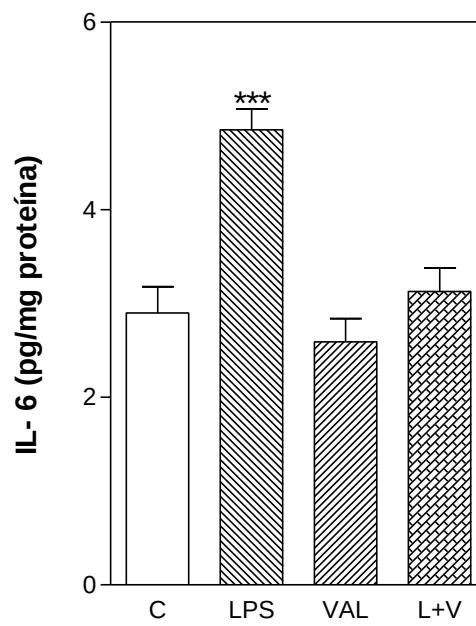


Figura 26. Concentración de IL-6 en saliva en el grupo tratado por 14 días. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

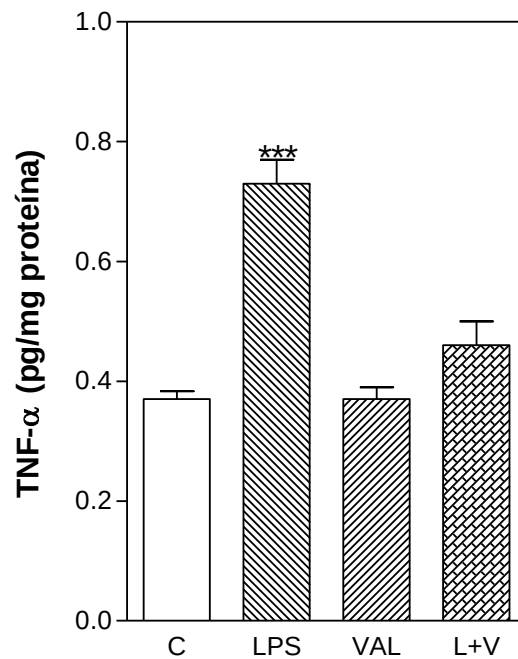


Figura 27. Concentración de TNF- α en saliva en el grupo tratado por 14 días. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ con respecto al control.

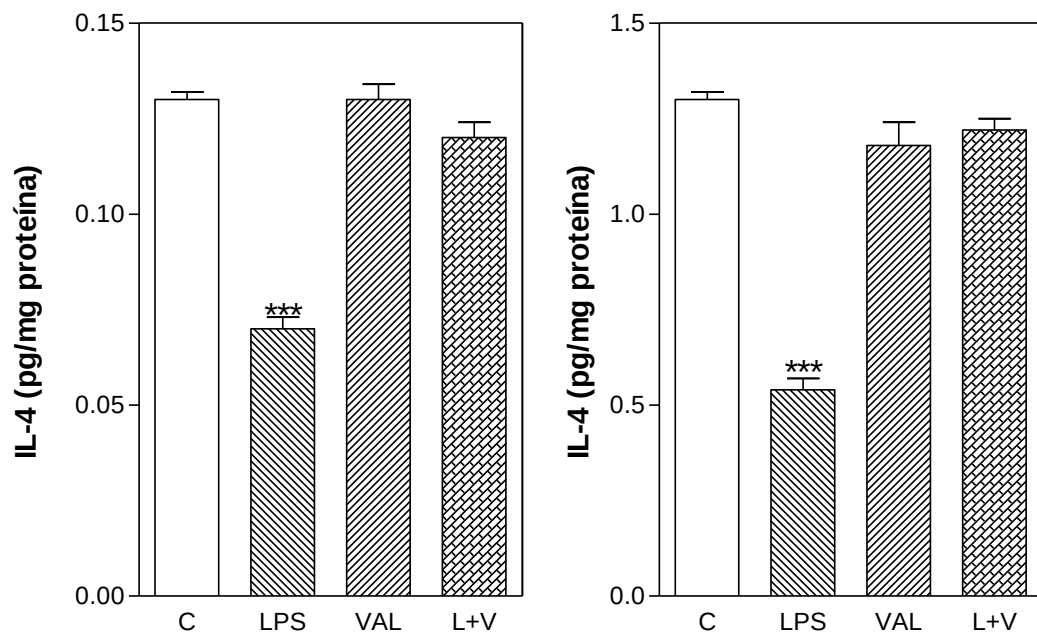


Figura 28. Concentración de IL-4 en saliva en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

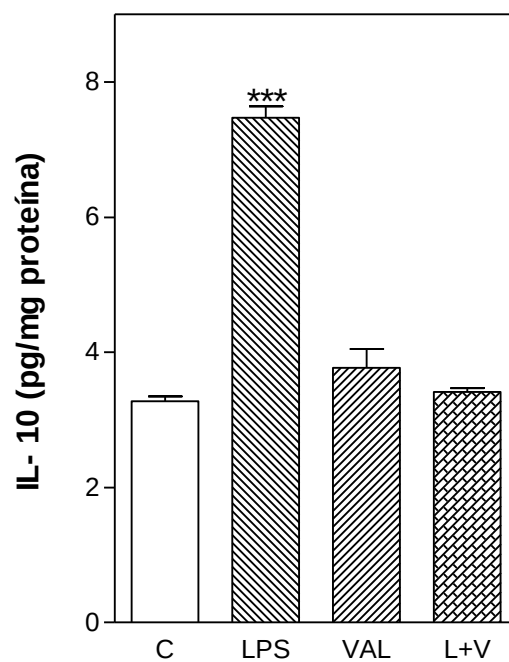


Figura 29. Concentración de IL-10 en saliva en el grupo tratado por 14 días de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

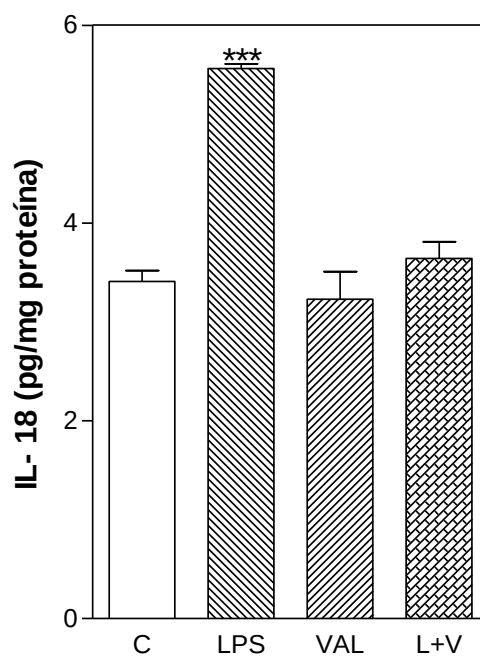


Figura 30. Concentración de IL-18 en saliva en el grupo de 14 días de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p<0,001 con respecto al control.

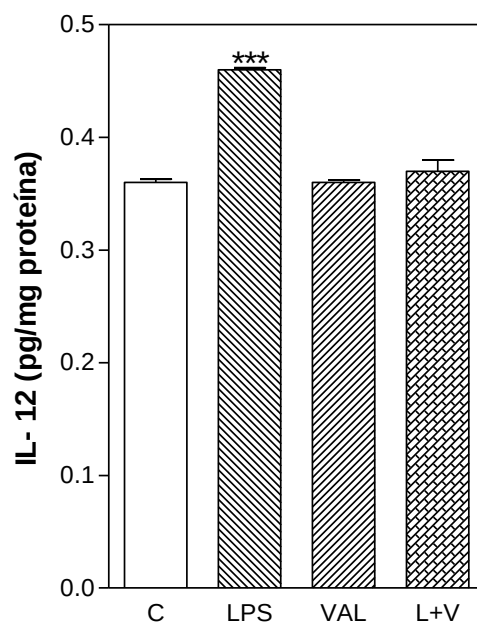


Figura 31. Concentración de IL-12 en saliva en el grupo con 14 días de tratamiento. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p<0,001 con respecto al control.

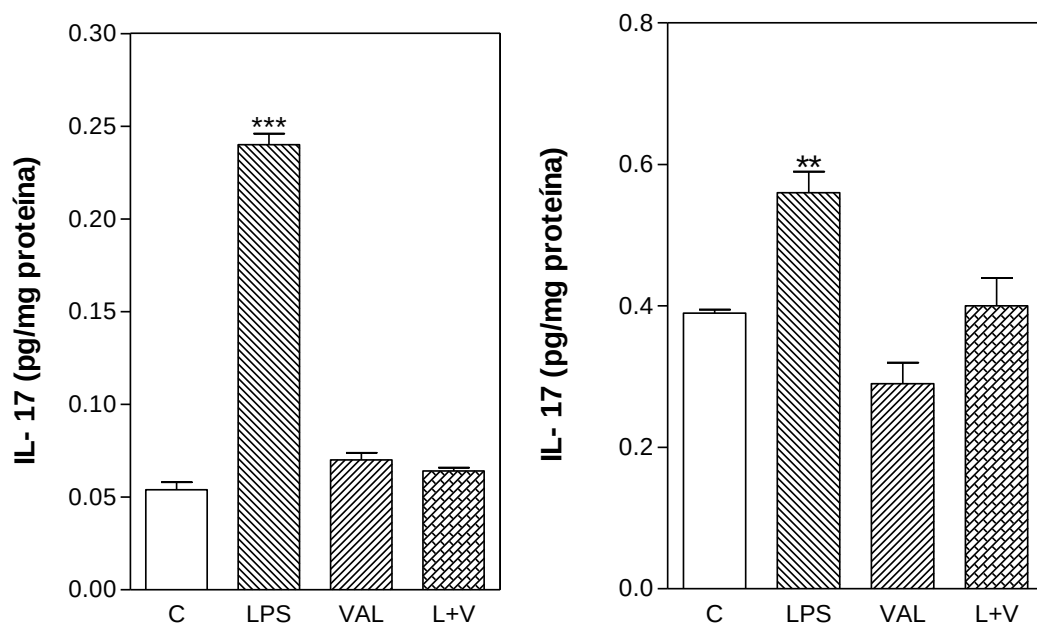


Figura 32. Concentración de IL-17 en saliva en los animales con 7 y 14 días de tratamiento (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $<0,001$; ** $<0,01$ respecto al control.

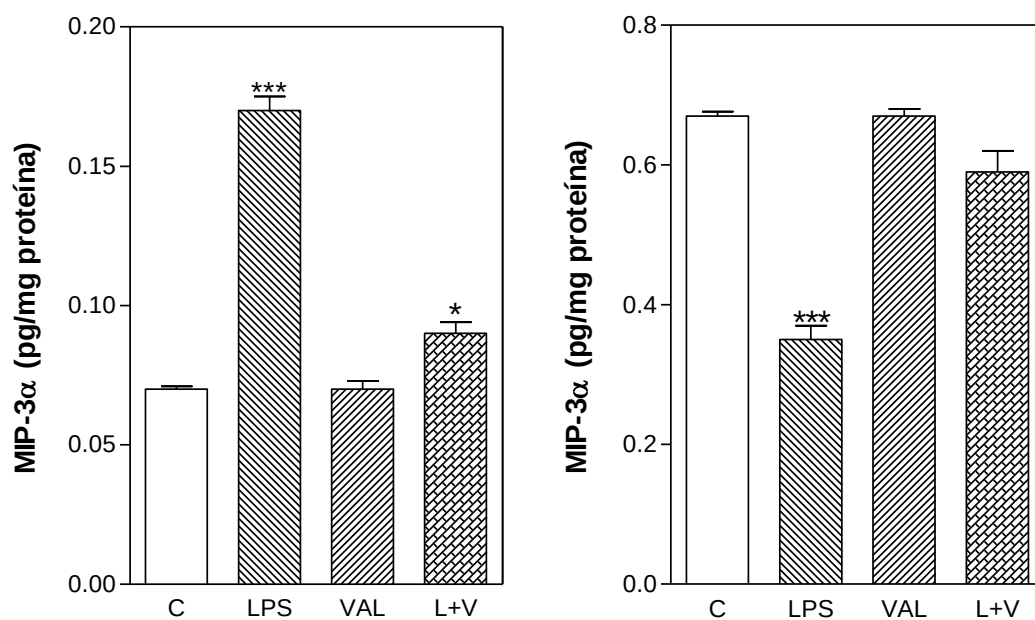


Figura 33. Concentración de MIP-3α en saliva en los animales tratados por 7 y 14 días. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. ***p < 0,001 respecto al control. *p < 0,05 respecto al grupo VAL.

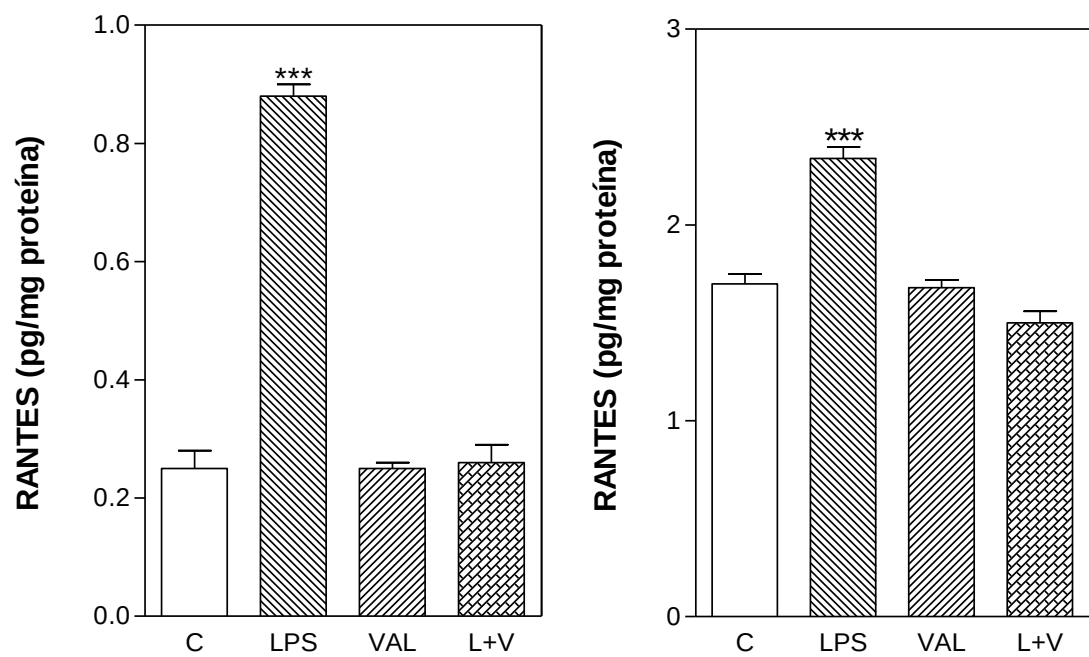


Figura 34. Concentración de RANTES en saliva en los animales tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

Determinación de los receptores AT1, RANK, OPG y TLR4, así como la del RANKL, p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFkB y p-NFkB mediante inmunofluorescencia.

La expresión del receptor AT1, RANK, OPG y TLR4, así como la del RANKL, p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFkB y p-NFkB fue determinada mediante inmunofluorescencia (Figuras 35 a 51), observándose en todos los casos, un aumento significativo de las densidades ópticas en el grupo al que se le administró el LPS con relación al grupo control, tanto en el grupo de 7 como en el de 14 días de tratamiento. Al realizarse las relaciones de las densidades ópticas de las proteínas fosforiladas/totales (p-p38/p38, p-NFkB/NFkB) se observó un aumento de estas en el grupo tratado con LPS a los 7 y 14 días de tratamiento, indicando un incremento de la activación de estas proteínas. Asimismo, la relación RANKL/OPG aumentó en el grupo tratado con LPS con relación al grupo control en ambos periodos de tiempo, en todos los casos el efecto fue parcial o totalmente revertido en el grupo al cual se le administró el VAL. (Figura 41, 48, 51).

Tabla IX. Valores de la determinación de los receptores AT1, RANK, OPG y TLR4, así como la del RANKL, p38 MAPK, p-p38 MAPK, NFkB y p-NFkB mediante inmunofluorescencia.

	C n=4	LPS n=4	VAL n=4	L+V n=4
AT1 (7 días)	3648±209,27	6081±149,65	3459±134,13	40545±299,81
AT1 (14 días)	3660±75,96	6228 ±313,48	3668±41,50	4046±194,31
RANKL (7 días)	5570±129,62	7341±122,10	5401±179,16	6177±189
RANKL (14 días)	4922±289,25	6596±204,18	4834±97,75	5382±105,37
OPG (7 días)	5451±181,56	1007±42,13	5340±115,25	5638±108,59
OPG (14 días)	4930±124,46	1329±79,42	4738±98,34	4929±161,18
Relación RANKL/OPG (7 días)	1,03±0,05	7,33±0,30	1,01±0,05	1,09±0,02
Relación RANKL/OPG (14 días)	1,00±0,03	5,01±0,28	1,02±0,02	1,09±0,04
RANK (7 días)	5067±34,57	6161±48,04	5201±68,22	5387±48,45
RANK (14 días)	3648±209,27	6081±149,65	3459±134,13	4045±299,81
TRL4 (7 días)	5487±65,78	7276 ±293,04	5499 ±49,73	6097±62,17
TRL4 (14 días)	5450±116,34	7038 ±364,47	5505±217,65	6121 ±135,61
Relación p-p38/p38 (7 días)	1,00±0,01	1,52±0,04	0,99±0,007	1,19±0,02
Relación p-p38/p38 (14 días)	1,06±0,008	2,55±0,03	1,01±0,03	1,04±0,02
Relación p-NFkB/NFkB (7 días)	1,00±0,02	1,72±0,03	1,00±0,04	1,10±0,02
Relación p-NFkB/NFkB (14 días)	1,00±0,02	1,97±0,06	1,00±0,01	1,13±0,02

AT1

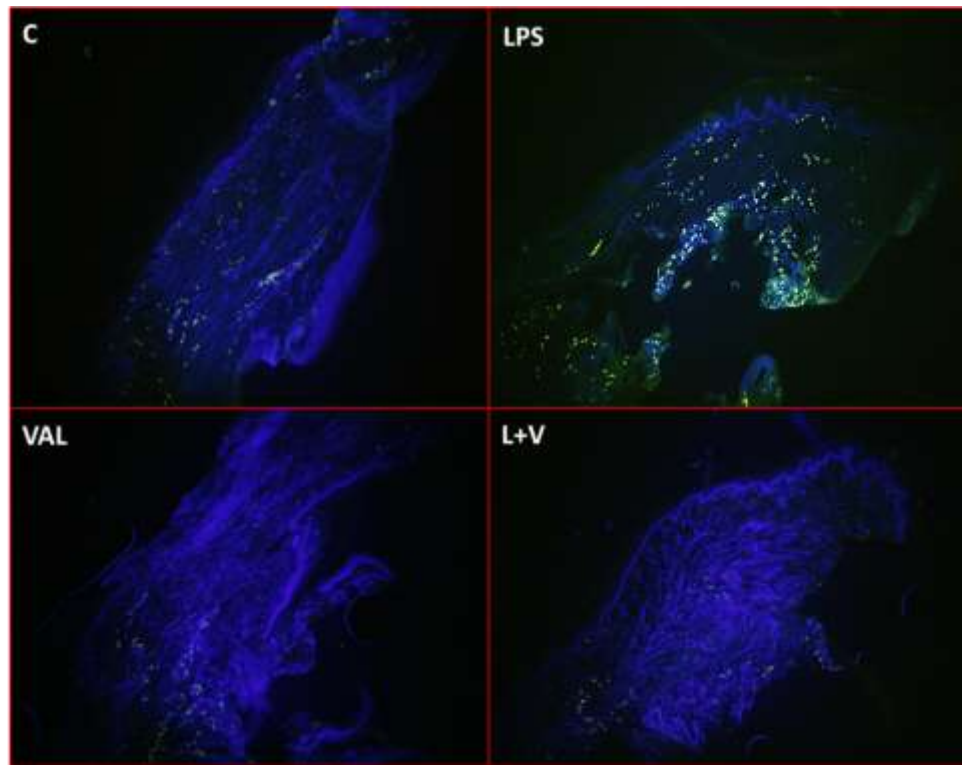


Figura 35. Inmunofluorescencia del receptor AT1 en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

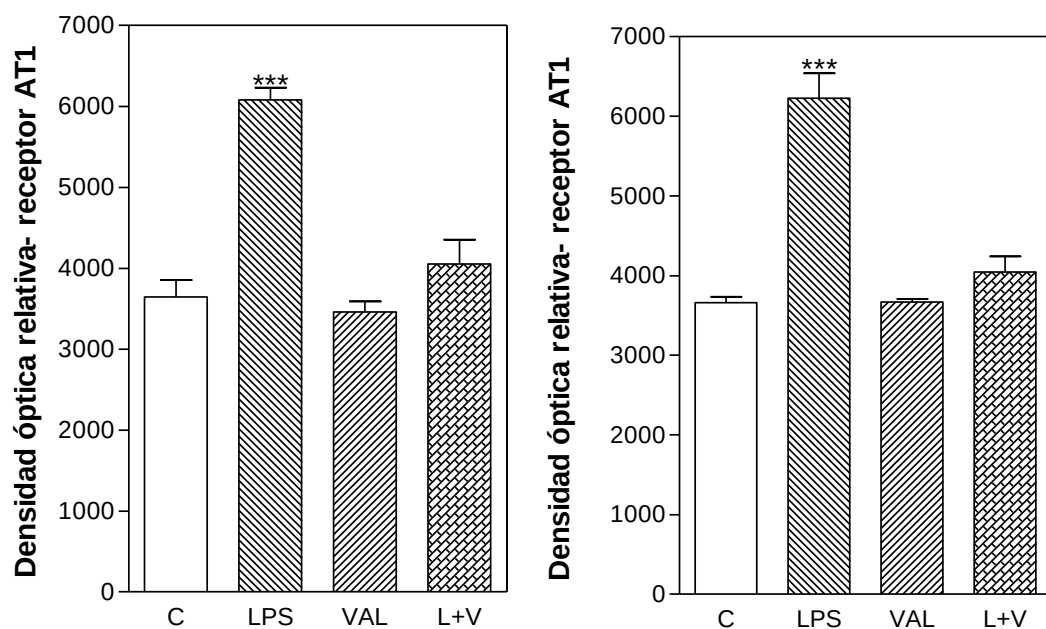


Figura 36. Densidad óptica relativa de los receptores AT1 en la encía de rata en los grupos tratados por 7 y 14 días. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control.

RANKL

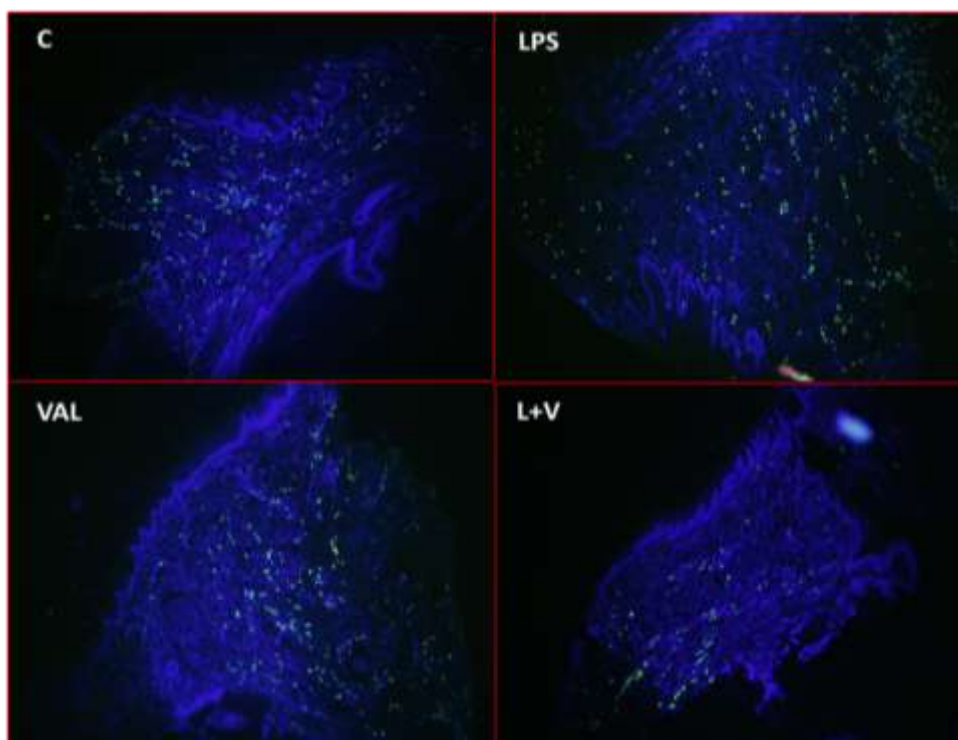


Figura 37. Inmunofluorescencia del RANKL en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

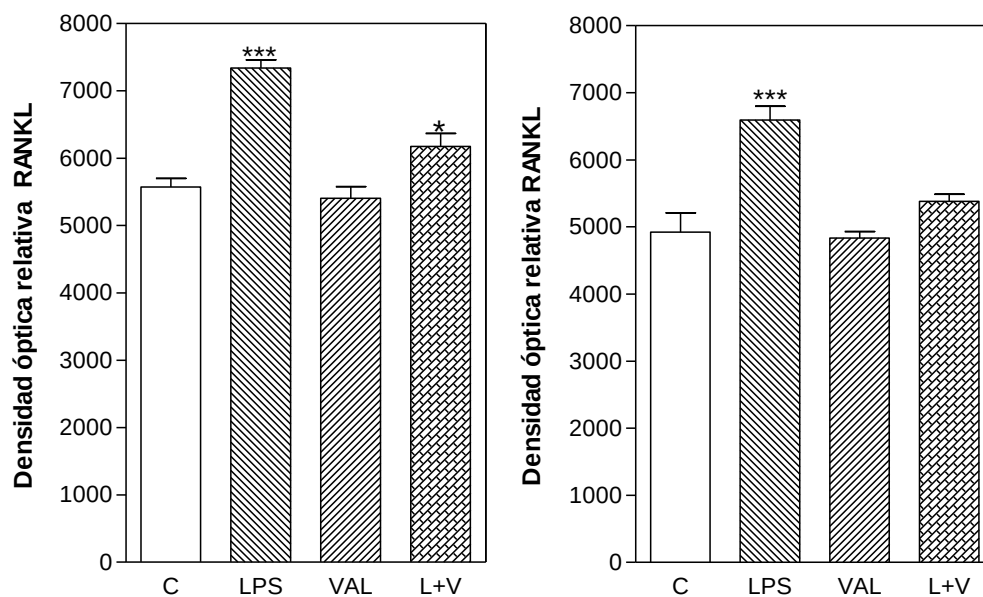


Figura 38. Densidad óptica relativa del RANKL en la encía de rata en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control. * $p < 0,05$ respecto al grupo VAL.

OPG

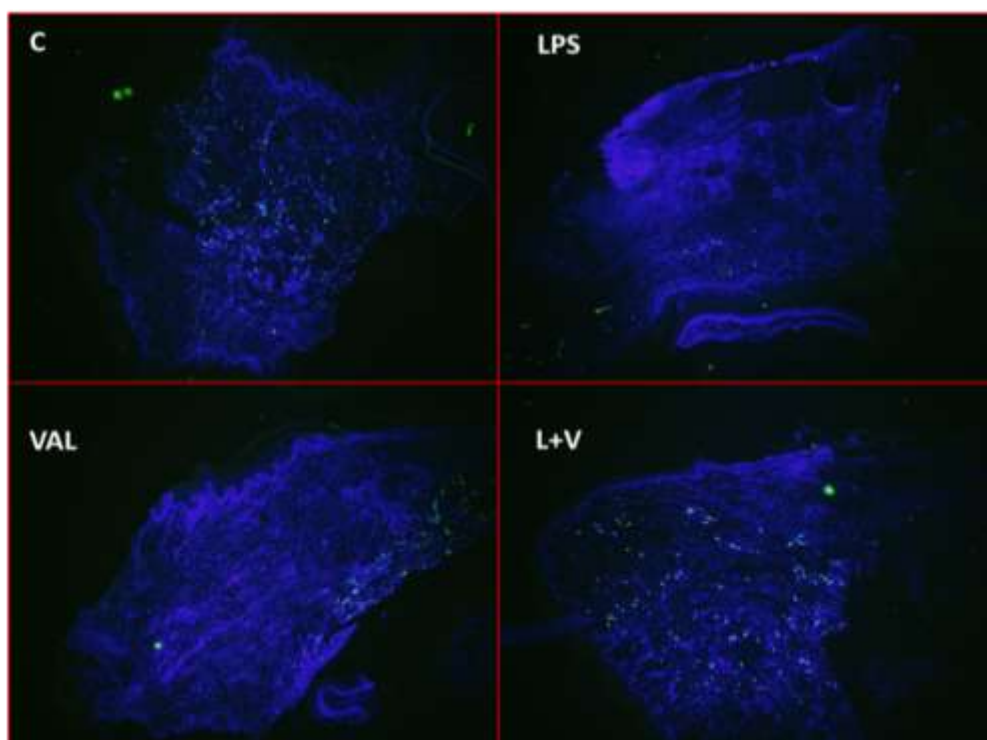


Figura 39. Inmunofluorescencia del receptor señuelo OPG en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

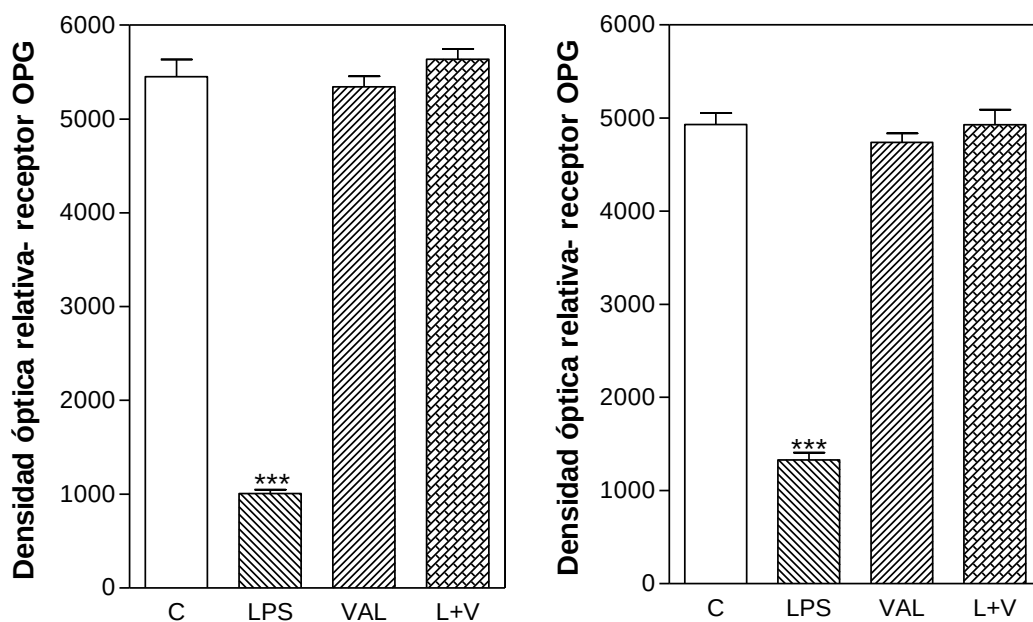


Figura 40. Densidad óptica relativa del receptor señuelo OPG en la encía de rata en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

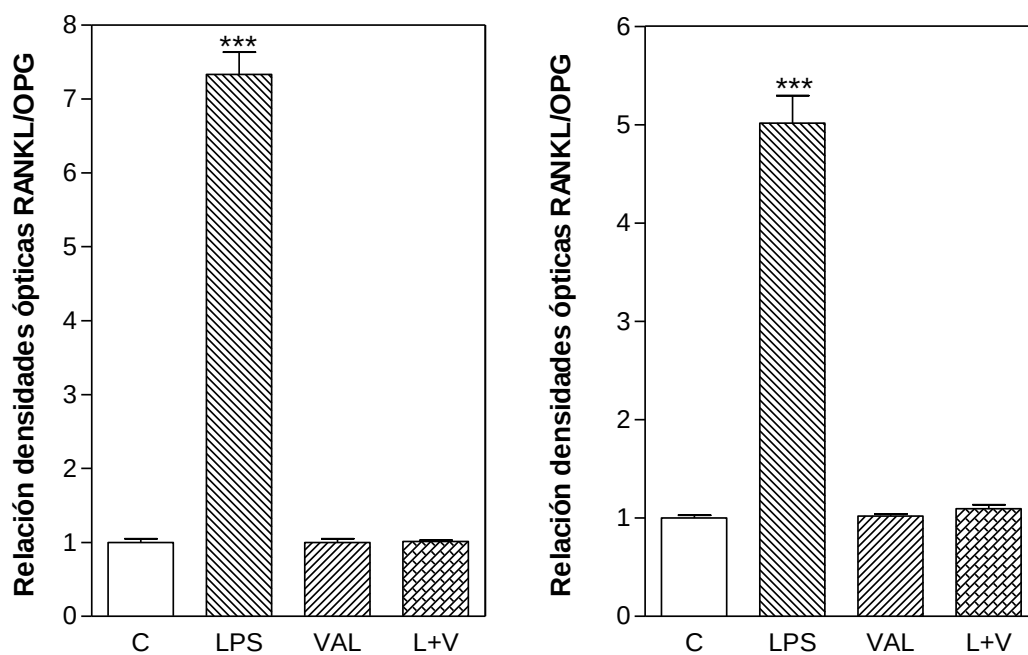


Figura 41. Relación de las densidades ópticas relativas de RANKL/OPG en la encía de rata en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

RANK

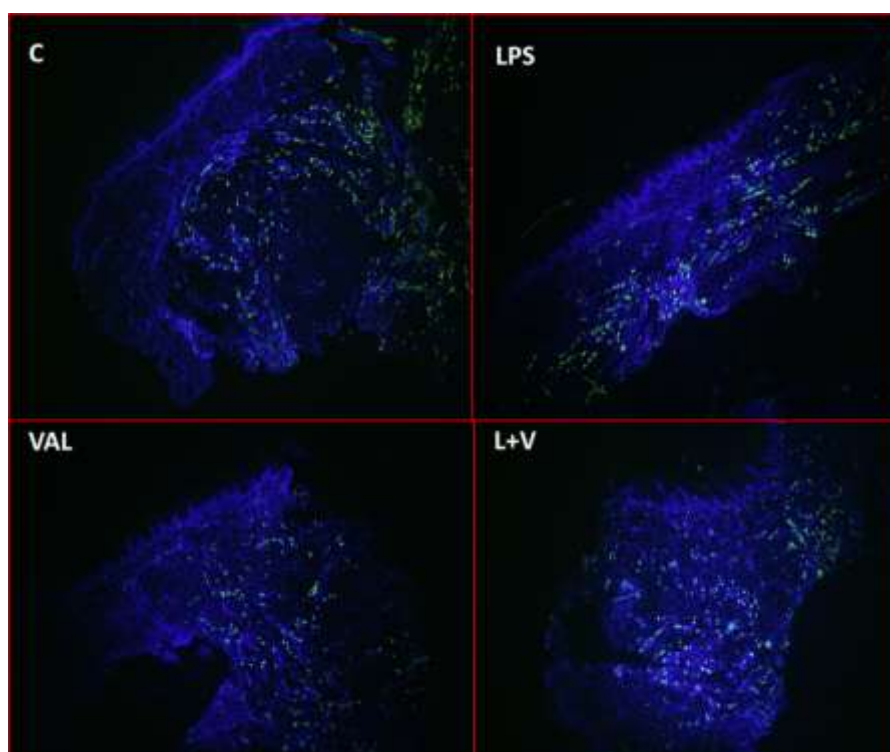


Figura 42. Inmunofluorescencia del receptor RANK en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

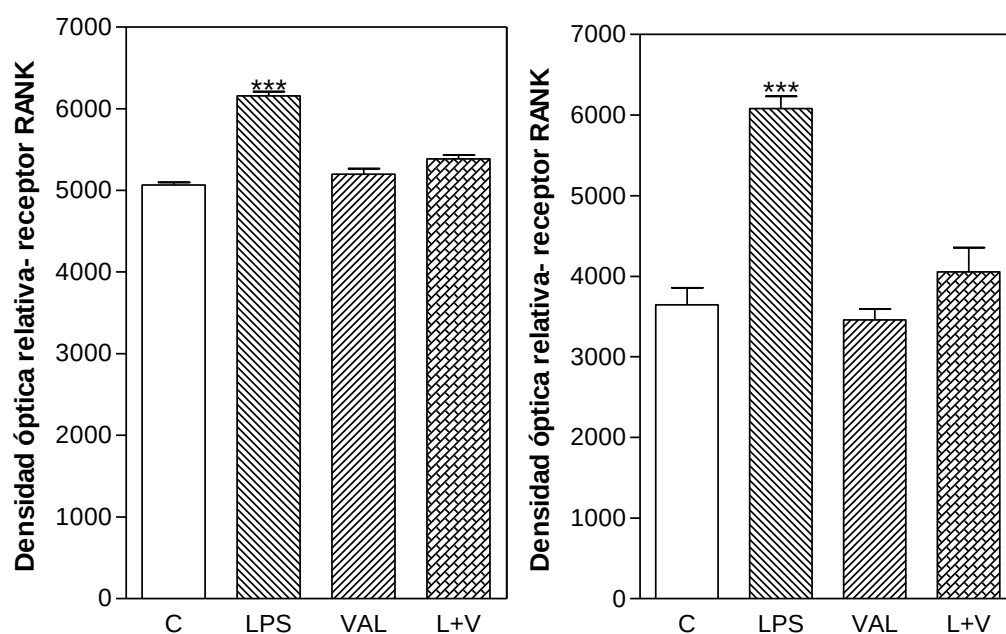


Figura 43. Densidad óptica relativa del receptor RANK en la encía de rata en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

TLR4

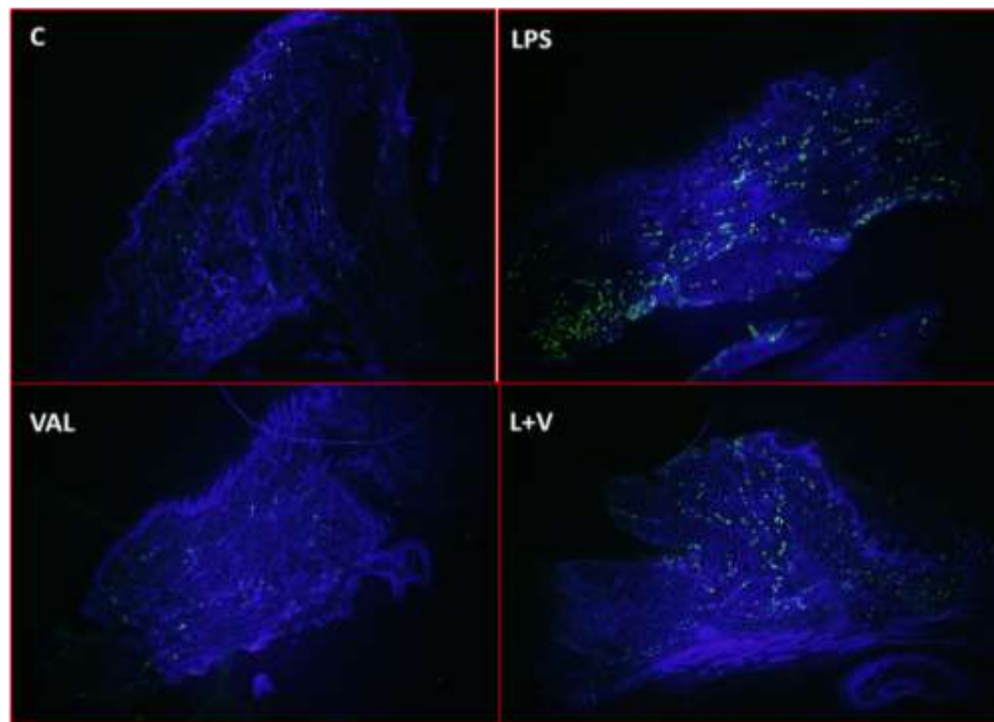


Figura 44. Inmunofluorescencia del receptor TLR4 en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

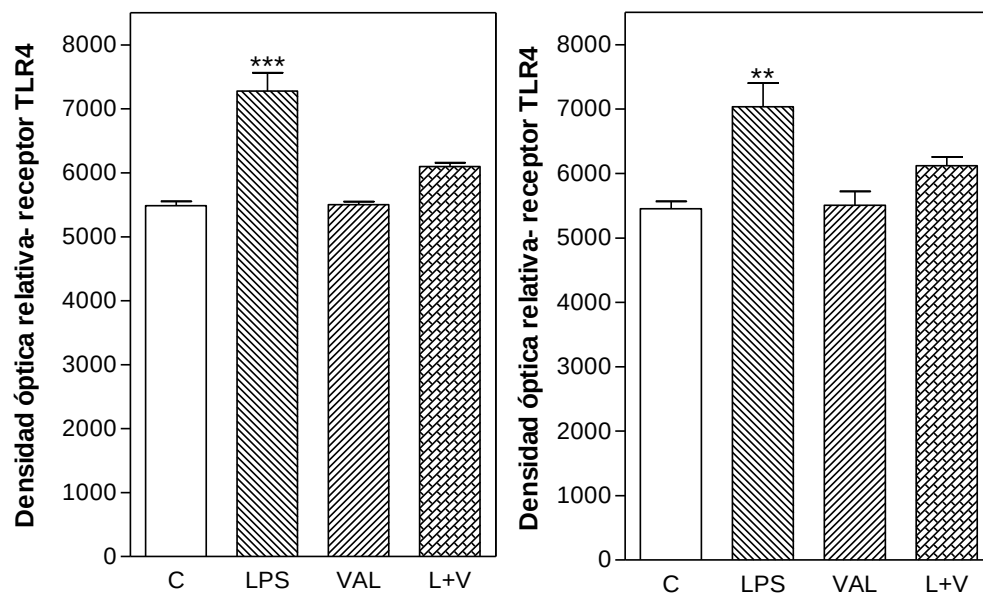


Figura 45. Densidad óptica relativa del receptor TLR4 en la encía de rata en el grupo tratado por 7 y 14 días. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

p38 MAPK

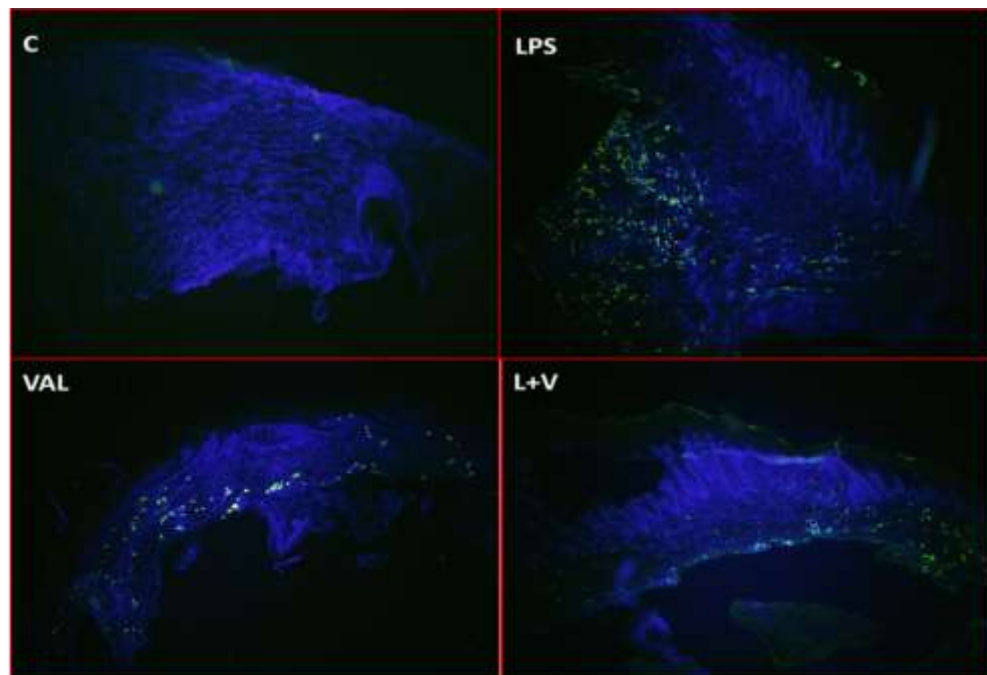


Figura 46. Inmunofluorescencia de p38 MAPK en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

p-p38 MAPK

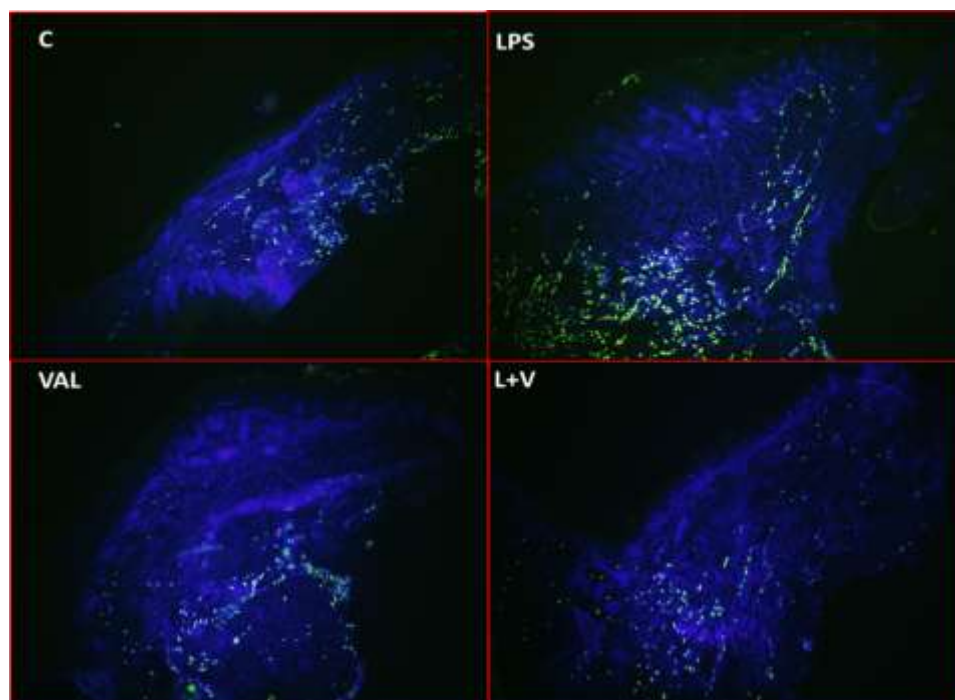


Figura 47. Inmunofluorescencia de p-p38 MAPK en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

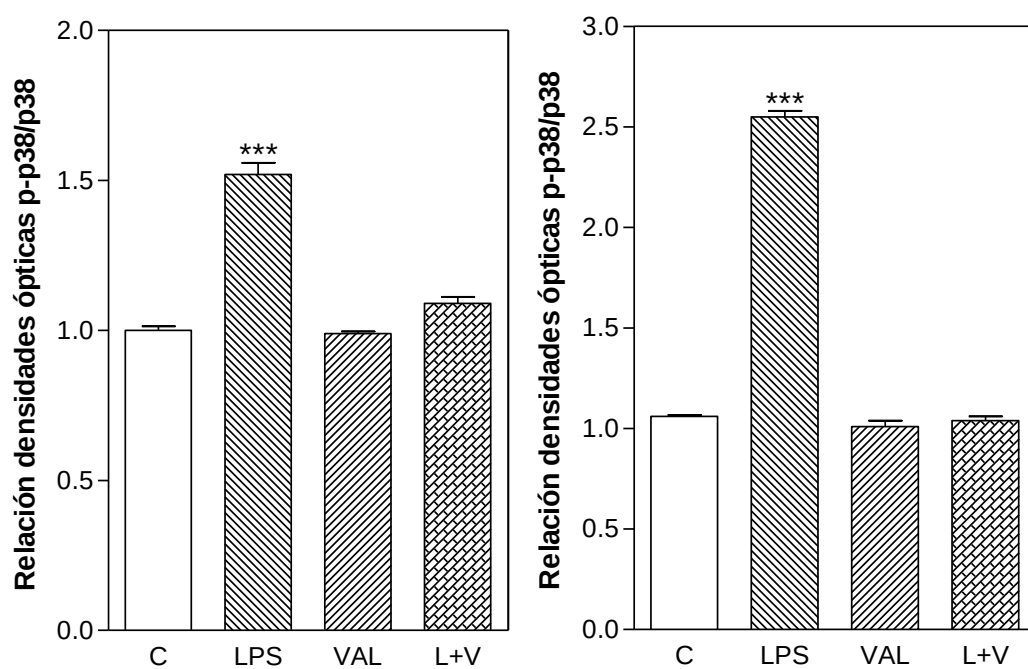


Figura 48. Relación de las densidades ópticas relativas de p-p38/p38total en la encía de rata en los grupos tratados por 7 y 14 días (panel izquierdo y derecho respectivamente). Cada barra representa la media + E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al grupo control.

NFkB

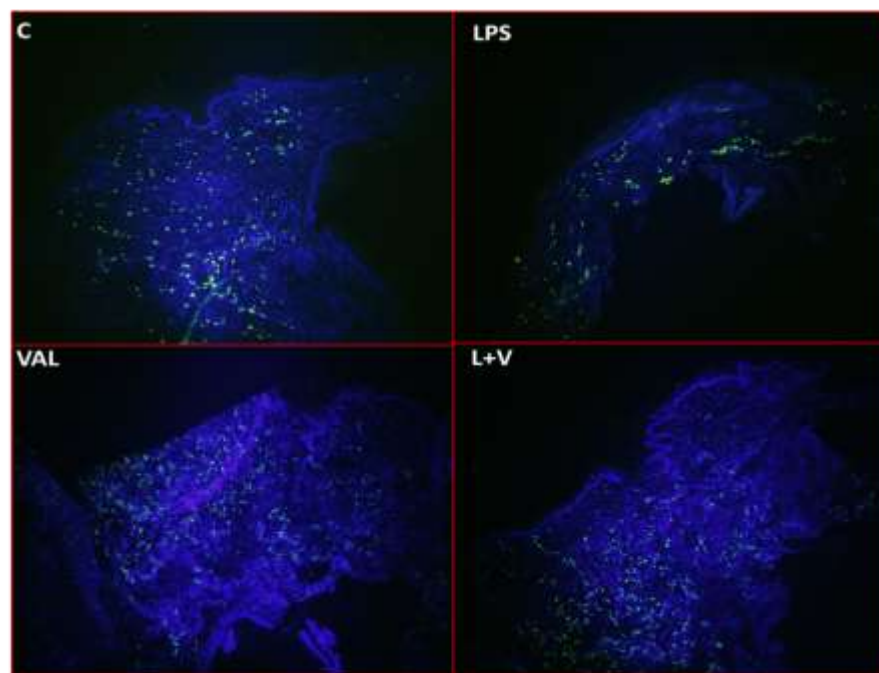


Figura 49. Inmunofluorescencia de NFkB en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

p-NFkB

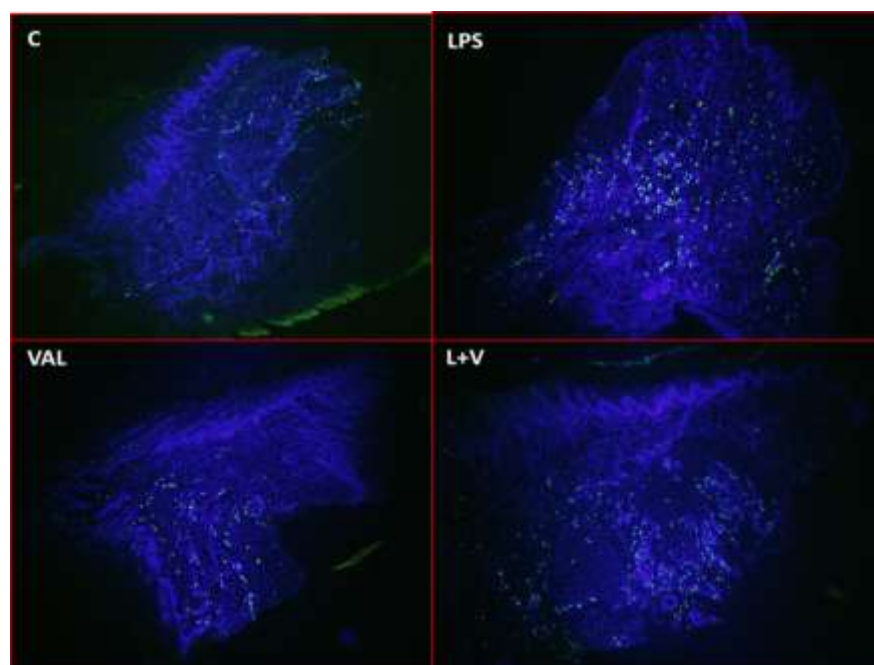


Figura 50. Inmunofluorescencia de p-NFkB en la encía de rata en los diferentes grupos de experimentación.

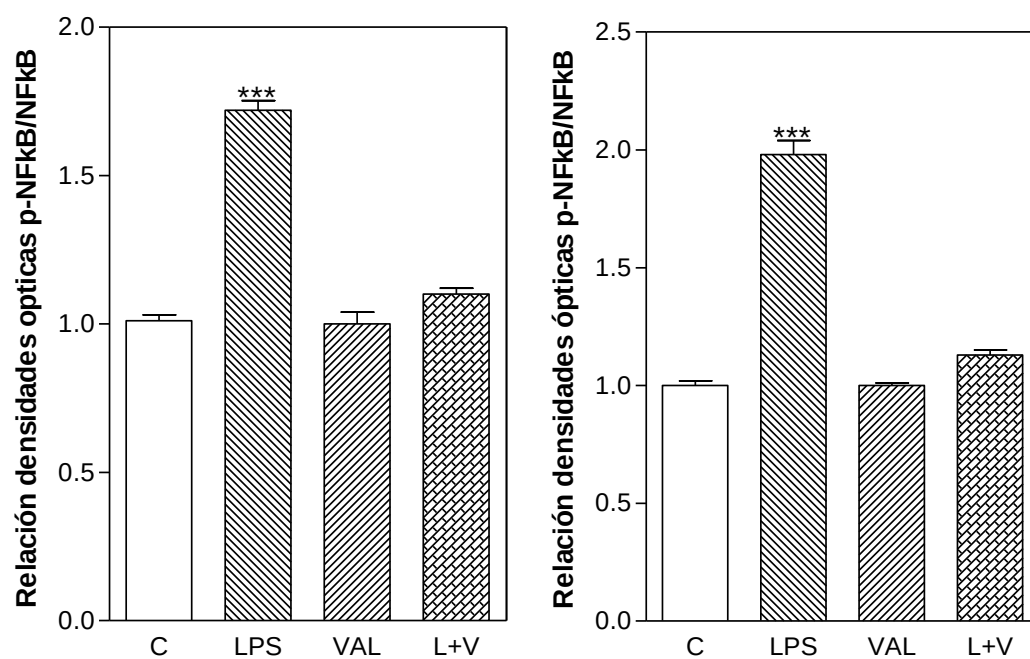


Figura 51. Relación de las densidades ópticas relativas de p-NFkB/NFkB en la encía de rata en el grupo tratado por 7 y 14 días. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0,001$ respecto al control.

DISCUSIÓN

La EP es una patología de origen infeccioso con una alta prevalencia en la población mundial y conduce a la destrucción del sistema de inserción de los dientes con graves consecuencias tanto funcionales como estéticas, llegando incluso a la pérdida de las piezas dentales.

La EP está caracterizada por la degradación del tejido conectivo y del hueso alveolar como consecuencia de la respuesta del huésped al biofilm dental. La destrucción tisular puede ser inducida directamente por las toxinas y productos del metabolismo microbiano, sin embargo, la mayor parte del daño está asociada a la respuesta inflamatoria que ocurre en el huésped (Cochran, 2008). La EP es considerada por lo tanto una enfermedad inflamatoria, caracterizada por infiltración leucocitaria, recesión y pérdida de tejido conectivo, migración del epitelio gingival, con formación de bolsillo periodontal y resorción ósea alveolar (Dumitrescu y col., 2004, Dumitrescu 2006).

Los modelos animales poseen características útiles para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la EP y se han utilizado con el propósito de evaluar tanto la patogénesis de la EP como los posibles tratamientos. La EP puede ser inducida en las ratas por manipulación dietética (Galvão y col., 2003), introducción de microorganismos patógenos (Graves y col., 2012), colocación de ligaduras que conducen a la acumulación de placa bacteriana y a la invasión de patógenos en el tejido conectivo (Lima y col., 2004), o por inyección de toxinas bacterianas (Vardar y col., 2004). Estos

modelos de inducción han sido utilizados en diferentes primates no humanos (Smith y col., 1993), en perros (García y col., 2005), en conejos (Hasturk y col., 2006) y en ratas (Menezes y col., 2005). La administración sistémica de endotoxinas bacterianas como los LPS de bacterias Gram negativas, a roedores, constituye hoy en día un sistema bien caracterizado de inflamación, reproduciéndose así los aspectos clínicos, radiográficos e histológicos de la periodontitis en humanos, constituyéndose en una herramienta útil en el estudio de la EP (Galvão y col., 2003).

La administración del LPS inicia una reacción inflamatoria y dispara la respuesta inmune (Quan y Banks, 2007). La inducción de periodontitis con LPS tiene la ventaja sobre otros métodos, de presentar, ya a los dos días de iniciado el tratamiento, una pérdida significativa de hueso alveolar, posee adicionalmente la ventaja de tener bajo costo, menor duración y menor manipulación de los animales (Dumitrescu, 2006).

Se ha reportado que la infusión continua con LPS provoca una serie de alteraciones en los signos vitales de las ratas, incluyendo la disminución de la PAM (Yuan y col., 2011, Jing y col., 2007), la cual se hace evidente cuando se induce shock endotoxico con LPS (Ocasio y col., 2004; Clayton y col., 2005) y cuando se trata directamente la vasculatura mesentérica para producir inflamación de la misma (Hayes y col., 2004). En ratas normotensas, una sub dosis de LPS no afecta a la presión sanguínea sistémica sino que produce un

aumento importante en los factores inflamatorios en la circulación general (Benicky y col., 2011).

Por el contrario otros estudios han demostrado que la PAM no se ve afectada por el uso de infusiones continuas de LPS para inducir daño intestinal en ratas (Guo y col., 2009), en la insuficiencia renal aguda (Jonassen y col., 2002) o en la disfunción cardiovascular en ratas (Schwartz y col., 1997)

En condiciones en las cuales hay un proceso inflamatorio como es el caso de la enfermedad periodontal, a medida que el estímulo microbiano aumenta, la inflamación de la encía marginal se manifiesta clínicamente, las bacterias y sus productos interactúan con el epitelio y penetran dentro del tejido conectivo subyacente, en respuesta, hay un aumento de la permeabilidad vascular y los leucocitos trasvasan las vénulas post-capilares. En consecuencia, hay un incremento en el número de leucocitos, especialmente neutrófilos, los cuales migran a través del epitelio de unión hacia el surco gingival (Page y col., 1997).

La leucocitosis con linfocitosis significativa, sugiere una repercusión sistémica de la periodontitis debido a las bacterias Gram negativas viables del biofilm, a los LPS y citocinas pro inflamatorias que pueden ingresar al torrente sanguíneo e influir en la salud general y en la susceptibilidad a ciertas enfermedades. En efecto, en los últimos años, han surgido numerosos informes basados en estudios epidemiológicos, en los que las infecciones buco-dentales están asociadas y pueden desempeñar un papel coadyuvante en el desarrollo de

enfermedades sistémicas, reportándose una relación estadísticamente significativa entre la EP y un riesgo aumentado de padecer arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Bullon y col., 2011), accidentes vasculares cerebrales y artritis reumatoidea (Esen y col., 2012), lo cual está en concordancia con resultados relativos a los recuentos elevados de leucocitos en la sangre venosa de los pacientes con periodontitis que confirma la presunción de que la EP causa inflamación de bajo grado sistémica inducida por la respuesta del huésped a las bacterias periodontales (Žilinskas y col., 2011).

La inflamación y la pérdida del hueso alveolar son los signos distintivos de la enfermedad periodontal. La resorción ósea involucra una serie de fases celulares dirigidas hacia la disolución de los constituyentes minerales o inorgánicos y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea por parte de los osteoclastos y controlada por los osteoblastos. Aunque los reguladores moleculares de las distintas fases de vida y actividad de los osteoclastos no han sido completamente dilucidados, por décadas, varios sistemas de citocinas han sido sugeridos como importantes reguladores de la resorción ósea (Sodek y McKee, 2000). Adicionalmente, el proceso de resorción está controlado por una compleja interacción entre células osteoclásticas y osteoblásticas (Hill y Orth, 1998; Lafati, 2003).

La movilización dentaria consecuente a la pérdida de hueso alveolar involucra una serie de cambios en los tejidos de soporte caracterizados por la activa remodelación del tejido periodontal y óseo adyacente a la pieza dentaria, que

permiten el desplazamiento de los dientes a través del proceso alveolar, la remodelación de este componente tisular es llevada a cabo por osteoclastos (Droghetti y col., 2010). Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de precursores en la médula ósea hematopoyética, encargadas de la resorción ósea que se diferencian *in situ* a partir de precursores de origen monocítico (Boyce y col., 2007).

La Fosfatasa Ácida Tartrato Sensible ha sido localizada en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, mientras que la Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP) se ubica únicamente en osteoclastos y ha demostrado ser un marcador citoquímico para estas células (Cole y Walters, 1987), siendo utilizado en diferentes estudios de movilización dentaria y pérdida de hueso alveolar, donde se ha verificado la presencia de células TRAP+ asociadas a lagunas de la resorción ósea. Así en estudios histológicos realizados en conejos bajo diferentes modelos de inducción de EP (ligadura, inyecciones con *P. gingivalis*, ligadura + inyecciones con *P. gingivalis*), se observaron incrementos en el número de osteoclastos en relación al grupo control (Hastuk y col., 2006). Esto fue igualmente reportado en estudios histológicos en ratas a las cuales se les indujo EP mediante inyecciones con LPS (Kirkwood y col., 2007).

La disminución de la capacidad masticatoria resultante de la pérdida ósea y la movilidad dentaria podrían ser las causantes de una pérdida de peso lo cual sucede en otros modelos como en el caso de inducción con ligadura (Keles y col., 2005) o en patologías como la inducción conjunta de osteoporosis y

periodontitis en ratas, donde tanto en el grupo al que se les indujo la periodontitis como en el grupo que se le indujo la osteoporosis hubo una disminución de peso siendo esta disminución más marcada en el grupo al que se les indujo tanto la periodontitis como la osteoporosis conjuntamente (Allam y col.,2010).

En el presente trabajo establecimos, que la inducción de periodontitis mediante la inyección localizada de LPS, tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento (Lima y col., 2004; Menezes y col., 2005; Dumitrescu y col 2004; Dumitrescu 2006), la PAM no se alteró con el tratamiento de inyecciones locales con LPS, asimismo el grupo al que se les colocaron inyecciones con LPS mostró una disminución de la ganancia de peso corporal, un aumento de la leucocitosis, incremento en la pérdida de hueso alveolar y del tejido conectivo, debida a un incremento de la osteoclastogénesis corroborada por la marcación positiva de la enzima TRAP+, en el área donde se indujo la enfermedad periodontal dada por el aumento del número de osteoclastos en la zona. Lo cual se ve reflejado en el aumento en la movilidad dentaria así como en el examen histológico de las mandíbulas de las ratas sometidas a inducción de enfermedad periodontal donde se demostró una disminución de los depósitos de calcio y del colágeno tanto en intensidad como de las densidades de la tinción de Von Kossa y Tricrómico de Masson respectivamente, y un incremento de la movilidad dentaria producto de la pérdida de hueso y del tejido conectivo. Nuestros resultados están en concordancia con lo reportado en la literatura sobre el uso de LPS de origen bacteriano como modelo experimental de inducción de periodontitis y pérdida de volumen óseo mandibular en la rata (Rogers y col., 2007; Cheng y col., 2010).

Asímismo, demostramos por primera vez en la literatura en las ratas a las que se les indujo EP con LPS y que fueron tratadas con el bloqueante de los receptores AT1 de la ANG II, que el VAL, previene de modo significativo la pérdida de peso y la leucocitosis, produce la reversión de la pérdida de tejido conectivo y la resorción del hueso alveolar. Lo cual fue confirmado a nivel de análisis histopatológico, demostrando preservación parcial del hueso alveolar y del ligamento periodontal.

ERO

Como se ha manifestado anteriormente, la EP es una enfermedad inflamatoria oral, que da lugar a daño y pérdida de tejido, como resultado de la compleja interacción entre las bacterias patogénicas y la respuesta inmune del huésped (Canakci y col., 2009).

El descubrimiento de la superóxido dismutasa por McCord y Fridovich en 1969, el hecho de que el anión superóxido puede ser producido por enzimas (McCord y Fridovich 1968) y que los radicales libres pueden ser sustrato para una enzima, revolucionó completamente el pensamiento sobre el papel de los radicales libres en la biología (Fridovich 1995). Adicionalmente, la idea de que

las ERO puedan actuar como moléculas de señalización, hacen que la biología “redox” sea vista hoy en día como un determinante fundamental en la biología básica de células y tejidos, en la salud y en la enfermedad (Buettner, 2011).

Todos los tipos de células poseen la maquinaria para producir el O_2 . La presencia del anión superóxido en el tejido periodontal se debe principalmente a la activación de los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) y se ha sugerido que el mismo está involucrado en la resorción ósea, habiéndose demostrado la presencia de este anión en zonas adyacentes a los osteoclastos (Wang y Ohura., 2002). Adicionalmente a la cadena transportadora de electrones, el anión superóxido puede ser producido por la familia de enzimas Nox, así como por la xantina oxidasa (Sorescu y col., 2002).

Debido a las propiedades altamente reactivas de las ERO, un exceso de las mismas puede ocasionar daño a proteínas, lípidos, ADN y ARN; todas las células expresan enzimas capaces de neutralizar a las ERO, además de mantener un sistema antioxidante como el glutatión y las tioredoxinas, las células expresan enzimas detoxificantes como la SOD, la CAT y la GPx (Chapple y col., 2007). El desbalance entre la formación y la inactivación de las ERO por el sistema antioxidante conduce al estrés y daño oxidativo.

Se ha demostrado en el FGC de pacientes tanto control como con periodontitis crónica, la liberación espontánea de ERO a partir de leucocitos PMN, y el efecto protector o destructivo de los PMN en FGC de los pacientes con periodontitis,

depende de las variaciones de la tasa de formación de O_2 (Guarnieri y col., 1991).

Ellis y col. (1998) analizando tejidos gingivales de pacientes con EP avanzada, mostraron que la actividad de la CAT se encuentra reducida. Por el contrario, Panjamurthy y col. (2005) demostraron que los pacientes con periodontitis comparados con los sujetos sanos presentan incrementos significativos de la actividad de la SOD y la CAT en el plasma (60-65%), eritrocitos (110-125%) y los tejidos gingivales (40-60%), acompañados de un aumento moderado de la actividad de la GSHPx (glutación peroxidasa) en el plasma (21%), los eritrocitos (30%) y los tejidos gingivales (41%). Del mismo modo, Wei y col., (2010), reportan un incremento en el estado oxidativo total y en los valores de SOD en suero, saliva y FGC de pacientes con periodontitis crónica y niveles incrementados de MDA solo en FGC, que retornaron a niveles basales con terapia.

En relación a la GPx, se ha demostrado claramente un aumento de la actividad en las muestras gingivales provenientes de perros y humanos con periodontitis (Panjamurthy y col., 2005), sugiriéndose que este aumento de actividad de la GPx podría representar una posible compensación antioxidante en las reacciones de desintoxicación de peróxidos orgánicos que se producen durante el estrés oxidativo en el tejido gingival (Borges y col., 2007).

Akalin y col., (2005), investigaron los niveles de SOD en el FGC en sujetos con periodontitis y controles no encontrando diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, en un trabajo posterior, los autores reportan incrementos en el estado oxidativo total en suero, saliva y FGC de pacientes con periodontitis crónica relativos a los controles sanos (Akalin y col., 2007).

Por otro lado, se ha utilizado a la SOD como terapia en los abscesos periapicales inducidos en la rata, demostrándose una disminución progresiva en la lesión y el proceso inflamatorio con proliferación de la dentina y cemento, sin que hubiese diferencias significativas entre el grupo tratado con SOD y el grupo control a las tres semanas de iniciado el proceso (Wang y Quinn., 2010).

El nivel de las enzimas antioxidantes es sensible al estrés oxidativo y se han reportado aumentos o disminución en diferentes patologías en las cuales un incremento de las ERO es causa o consecuencia de la enfermedad. Así episodios moderados de estrés oxidativo pueden potenciar al sistema de defensa, estimulando la expresión y/o actividad de las enzimas antioxidantes o por el contrario, disminuir cuando la carga oxidativa sobrepasa el potencial defensivo (Chapple y col., 2007).

Reportes recientes indican una disminución en la capacidad antioxidante y un incremento en biomarcadores de estrés en pacientes con periodontitis (Panjamurthy y col., 2005; Akalin y col., 2007; Brock y col., 2004; Mashayekhi y col., 2005). Siendo esto confirmado por estudios de asociación en gran escala

donde se demostró que pacientes con periodontitis tenían una capacidad antioxidante total en suero disminuía (Brock y col., 2004), mientras que no hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos, lo que puede reflejar diferencias en los métodos de preparación de suero y plasma.

Igualmente, Akalin y col., (2007) reportan un incremento en el estado oxidativo total junto con un incremento significativo en los niveles de MDA en la saliva y el FGC en pacientes con periodontitis crónica cuando comparados con el grupo control sano, estos resultados demuestran un incremento de la peroxidación lipídica en el ambiente oral/bolsa periodontal. De modo similar, Khalili y Biloklytska (2008), revelan una correlación entre los niveles incrementados de MDA y diferentes grados de severidad en pacientes con periodontitis crónica generalizada en relación a controles sanos.

Tsai y col., (2003) informaron de una correlación positiva entre la peroxidación lipídica y la presencia de patógenos periodontales y una correlación negativa entre GPx y periodontopatógenos, concluyendo que los mayores niveles de peroxidación de lípidos con disminución del nivel de antioxidantes proporcionan la evidencia de que el estrés oxidativo, podría jugar un papel en la patogénesis de la periodontitis.

La evidencia indica una fuerte secuencia de eventos que conectan a las ERO con la destrucción del tejido conectivo durante la EP, siendo el radical hidroxilo el más activo en el daño a moléculas importantes tales como el ADN, proteínas y

lípidos. El radical hidroxilo inicia la reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica que conduce a la resorción ósea.

Nuestros resultados apuntan a esta posibilidad de un incremento compensatorio de la actividad antioxidante, ya que en el modelo experimental de periodontitis inducida por la inyección de LPS en rata, se observa, sin lugar a dudas, un incremento significativo de la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y de MDA como mediador biológico del estrés oxidativo en el tejido de la mucosa bucal.

El grado de estrés oxidativo está en función del balance entre el ON y los radicales $O_2^{\cdot -}$. El ON ejerce un papel importante en procesos fisiológicos tales como la regulación del tono vascular, la modulación de la transmisión de la información sensorial y efectos inmunitarios. Además, el ON y otros radicales libres participan en la etiopatogenia de ciertas enfermedades crónicas de la cavidad bucal, donde son producidos en cantidades considerables durante la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, siendo considerado uno de los posibles factores que intervienen en la naturaleza multifactorial de la periodontitis. Las fuentes potenciales de ON en el periodonto son las células inflamatorias, queratinocitos, fibroblastos, osteoclastos y células endoteliales de vasos sanguíneos (de Sá Siqueira y col., 2010). Estos resultados sugieren que en la periodontitis, la destrucción periodontal resulta como consecuencia de una respuesta inmunitaria alterada frente al biofilm patogénico, que involucra la liberación prolongada de enzimas y radicales libres con predominio de ON. En

los tejidos periodontales y en fluidos como la saliva, el ON a bajas concentraciones, funciona como parte de los mecanismos de defensa inespecífica. No obstante, en altas concentraciones puede producir daños y destrucción de los tejidos periodontales. Existe una relación directa entre los niveles de ON, medido mediante concentraciones de nitrato en saliva, con la profundidad de la bolsa periodontal (Reher y col., 2007).

La síntesis de ON incrementa en la EP como resultado de la infiltración de PMN en el tejido periodontal (Brennan y col., 2003), existiendo la posibilidad de que la placa bacteriana sea responsable de la activación de la iNOS favoreciendo la alta expresión de esta enzima, en fibroblastos gingivales de sujetos con periodontitis crónica comparada con fibroblastos gingivales de sujetos sanos (Choi y col. 2007) y en tejidos gingivales de pacientes con periodontitis crónica y agresiva (Artese y col., 2010). Algunos hallazgos han demostrado que los liposacáridos de microorganismos como: *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. gingivalis*, flora patógena que predomina en la periodontitis, inducen significativamente la expresión de NOS en macrófagos (Kim y col., 2004).

Durante la periodontitis el eje monocitario-linfocitario del hospedero se estimula y localmente libera mediadores inflamatorios, como los metabolitos del ácido araquidónico (PGE2, leucotrienos y lipoxinas) y citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) que activan la enzima iNOS para la producción de ON (Kendall y col., 2001; Gemmell y col., 1997; Baker 2000; Daghigh y col., 2002). De esta

forma, estos mediadores inflamatorios a largo plazo causan destrucción tisular local, con la formación de la bolsa periodontal y la pérdida de hueso alveolar (Page y col., 1997).

También se ha evaluado las concentraciones de L-arginina y L-citrulina en tejido periodontal inflamado de pacientes con periodontitis crónica moderada, como indicadores de la actividad de la iNOS para producir ON (Matejka y col., 1998). En este sentido, otro hallazgo importante fue el encontrado por Téllez y col., (2008), quienes determinaron los niveles de arginina (precursor del ON) y glutamato, en el FGC de pacientes con periodontitis crónica y observaron un incremento significativo en los niveles de arginina, con disminución en el glutamato en pacientes con periodontitis crónica cuando fueron comparados con sujetos sanos.

Estudios realizados por Chen y Sun (1999), evidencian la relación entre el aumento de los niveles de ON (como nitritos) en saliva y la severidad de la EP, en pacientes con periodontitis cotejados con pacientes sanos. Hallazgos similares, revelan que el ON medido mediante concentraciones de nitrito en la saliva de pacientes con periodontitis crónica fue significativamente mayor que en saliva de los sujetos sin periodontitis (Reher y col., 2007), a diferencia de lo encontrado por Aurer y col. 2001, quienes observaron una disminución de nitritos en saliva de pacientes con periodontitis.

Con relación a la pérdida ósea, algunos estudios *in vitro* sugieren que el ON disminuye la resorción ósea por inhibir la formación y actividad de los osteoclastos, guía hacia apoptosis a las células precursoras de osteoclastos y aumenta la función de los osteoblastos (Fan y col., 2004), pero otros hallazgos indican que el ON promueve la maduración de los osteoclastos y aumenta la resorción ósea causada por citocinas (Delima y Van Dyke, 2004).

Lohinai y col. 1998, evaluaron la actividad de la iNOS en periodontitis inducida por ligadura en rata y demostraron su presencia en células inflamatorias y células epiteliales con un incremento en la producción local de ON y de la destrucción ósea, que fue bloqueado por la mercapto-etil-guanidina, un inhibidor selectivo de la NOS y agente antioxidante. Otros estudios similares reportaron altas expresiones de iNOS en tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica comparado con pacientes sanos (Hirose y col., 2001; Sánchez y col., 2010). Además, de una alta expresión de iNOS en queratinocitos de células epiteliales de tejido periodontal inflamado (Kendall y col., 2000).

Por otra parte la expresión de iNOS disminuye después de la terapia periodontal (Güllu y col., 2005). Adicionalmente, algunos estudios mencionan que sólo esta isoforma está involucrada en la EP inflamatoria y no las otras isoformas constitutivas (Sato y col., 2008). Así mismo, mediante el uso de inhibidores de NOS como la aminoguanidina en un modelo experimental de periodontitis en ratas, se observó una disminución en los niveles de MDA (Di Paola y col., 2004).

Como se ha podido observar el estrés oxidativo afecta la progresión de la periodontitis. En apoyo a ello se ha demostrado en modelos de periodontitis con ligadura, que estos efectos son prevenidos o revertidos mediante el uso de agentes que bloquean la síntesis del óxido nítrico tales como la aminoguainidina y el Nitro-L-arginina (L-NAME) (Leitao y col., 2005), productos naturales como flavonoides provenientes del cacao (Tomofuji y col., 2009) y el Vimang que es un extracto de la corteza del árbol *Mangifera indica* L., ambos con propiedades antioxidantes, suprimiendo el estrés oxidativo gingival en las lesiones periodontales previniendo la progresión de la periodontitis (García y col., 2005).

Nuestros resultados están en concordancia con estos hallazgos ya que demuestran un incremento significativo de la actividad de la NOS en el tejido de la mucosa bucal en la periodontitis inducida por la inyección de LPS en rata, la cual se asocia con la destrucción periodontal.

Consistente con el reporte de Santos y col. (2009) sobre la existencia de un sistema renina-angiotensina funcional en el tejido gingival de la rata, nuestros hallazgos demuestran por primera vez en la literatura que el tratamiento con el bloqueante de los receptores AT1, el valsartán, previene de modo significativo la progresión de la enfermedad periodontal en etapas tempranas de la patología ya que fue capaz de revertir el aumento de la actividad enzimática de la SOD, la CAT, la GPx y la NOS inducido por el LPS, lo que indica una relación entre los marcadores de estrés oxidativo y la EP, la cual varía dependiendo de la progresión y el estadio de la EP. El hecho que estos efectos hayan sido

revertidos por el tratamiento con VAL, sugiriere un papel de la ANGII/RAT1 en la patogénesis de la EP inducida con LPS en ratas.

El fenómeno de producción de ERO por citocinas proinflamatorias puede constituir una parte principal en la generación de la EP. Si el valsartán modula la formación de estas ERO, se propone que éste posee efecto antiinflamatorio, un efecto en la modulación de la remodelación tisular y por último una actividad antioxidante intracelular.

Las ERO constituyen moléculas intermediarias responsables por los procesos inflamatorios. La quimiotaxis de los neutrófilos juega un papel esencial en la inmunidad innata y constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos invasores. Hattori y col., (2010) identificaron en neutrófilos humanos que las ERO producidas por la NAD(P)Hox constituían reguladores clave en la migración de los mismos, ya que la disrupción de la actividad de esta enzima conducía a defectos en la quimiotaxis.

Adicionalmente, se ha demostrado ampliamente el papel de la ANG II en la inducción de la producción de $O_2^{\cdot -}$ en diferentes tejidos. La ANG II induce estrés oxidativo vía la activación de la NAD(P)Hox. Así Didion y col., (2005), demostraron que la deficiencia de SOD1 está asociada con un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot -}$, y que el incremento en la expresión de esta enzima, reduce marcadamente los niveles vasculares de $O_2^{\cdot -}$ inducidos por la ANG II. Del mismo modo, se ha demostrado mediante el uso de ratones transgénicos y “knockout”

para la SOD1 un incremento del anión superóxido en la vasculatura renal inducido por la ANG II, así como la restauración de los parámetros de remodelación vascular y respuesta a la ANG II inducido por la sobreexpresión de la SOD1 (Carlström y col., 2010).

El sistema de la NAD(P)Hox es necesario para la inmunocompetencia contra las bacterias, vía el llamado "estallido" respiratorio u oxidativo que genera las ERO que son tóxicas para las bacterias y su activación ha sido observada bajo diferentes estímulos tales como LPS, insulina y ANG II (Battino y col., 1999).

Recientemente se ha demostrado un efecto de la ANG II en células circulantes, demostrándose la presencia de receptores AT1 en neutrófilos circulantes (Ito y col 2001) y monocitos periféricos (Shimada y Yakazi, 1978). En este contexto, la migración de los leucocitos a los sitios de inflamación son eventos primarios que ocurren en los procesos inflamatorios. Así, El Bekay y col., (2003), demuestran en neutrófilos humanos un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por la acción de la ANG, la especificidad de esta respuesta fue demostrada por la completa inhibición de la producción del anión superóxido por el bloqueante de los receptores AT1 de la ANG, el ibersartán.

Existe evidencia experimental que permite establecer la relación entre la Ang II y las ERO en diferentes patologías. Así, se ha demostrado en células aisladas de aorta provenientes de ratas Sprague-Dawley, que la hipertrofia del músculo liso

vascular causado por la Ang II esta mediada por ERO provenientes de la NAD(P)Hox (Griendling y col., 2000).

De igual forma, la infusión de Ang II causa disfunción endotelial por el incremento de la actividad de la NAD(P)Hox y con el consiguiente aumento de la producción de anión superóxido. La influencia de la Ang II sobre la expresión de las subunidades p22phox, nox1, nox4 y gp91phox ha sido estudiada, y se ha encontrado un aumento de la expresión de todas ellas así como un incremento significativo de la proteína kinasa C, lo que lleva a suponer que efectivamente la Ang II está vinculada en el músculo liso vascular a la producción del anión superóxido (Mollnau y col., 2002).

Asimismo, La producción de anión superóxido inducida por la ANG II en el sistema nervioso central se debe principalmente a la NAD(P)Hox, de forma similar al producido en el tejido vascular (Griendling 2004).

La activación del receptor AT1 está asociado con una gran variedad de vías de señalización a nivel del tejido neuronal (Sumners y col., 2002), por lo que se postula que la NAD(P)Hox podría participar en el mecanismo molecular que media muchas de las acciones centrales de la ANG II. En efecto, se ha demostrado que la administración de inhibidores de la NAD(P)Hox, como el difenileneiodonio (DPI) y la apocinina, en la médula rostral ventrolateral o en los ventrículos cerebrales atenúa la respuesta presora de la ANG II en ratas (Chan y col., 2005; Erdös y col., 2006) y la microinyección de DPI o el oligonucleótido

antisentido de la subunidad p22phox o p47phox de la NAD(P)Hox dentro de RVLM, previene parcialmente la producción local de $O_2^{\cdot-}$ inducida por ANG II (Chan y col., 2005). Aún más, la aplicación extracelular del inhibidor de la NAD(P)H, el gp91ds-tat, disminuye a la mitad el incremento de la actividad neuronal inducida por la ANG II en cultivos primarios de hipotálamo y tallo cerebral (Sun y col., 2005) y la expresión mediada por adenovirus de la isoforma dominante-negativa Rac1, un componente crítico en la activación de la NAD(P)Hox y la producción de $O_2^{\cdot-}$, inhibe el influjo del calcio extracelular inducido por la ANG II en neuronas (Zimmerman y col., 2005).

En el tejido periodontal, también la ANG II es capaz de ejercer efectos inmunoregulatorios. En efecto, Santos y col., 2009 demostraron que el sistema SRA gingival es capaz de generar los péptidos de angiotensina. Adicionalmente, mediante marcaje inmunohistoquímico se demostró que células fibroblásticas eran positivas para el receptor AT1 (Nakamura y col., 2011).

Consistente con los resultados anteriormente expresados en este trabajo, demostramos el posible papel de la ANG II sobre la generación de radicales libres en el tejido gingival de la rata con periodontitis inducida por LPS, mediante el bloqueo del incremento de las enzimas antioxidantes con el uso del antagonista del receptor AT1 de la angiotensina II, el valsartán, por otro lado también se demostró el bloqueo del incremento de la actividad de la SOD, CAT y GPx inducidos por la administración de LPS, mediante el pretratamiento con la apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), un inhibidor de la NAD(P)Hox. Del

mismo modo, el uso del tempol, un atrapador del anion superoxido que mimetiza la acción de la SOD, revierte el efecto obtenido con la administración del LPS, confirmando la activación secuencial: angiotensina II, NAD(P)Hox, anión superóxido, sugiriendo que en la periodontitis inducida con inyecciones de LPS, las especies reactivas de oxígeno participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el receptor AT1.

Nuestra comprensión de la patogénesis de la periodontitis ha evolucionado con los años, desde el concepto del biofilm bacteriano como el único factor etiológico a ser considerado, hasta la toma de conciencia actual del papel de la inflamación junto con factores tales como susceptibilidad y riesgo individual, así como la respuesta del hospedador (Page y col., 1997).

CITOCINAS

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

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

Los biomarcadores de destrucción tisular son moléculas que pueden ser medidas objetivamente y evaluadas como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas a la intervención terapéutica (Biomarkers Definitions Group, 2001), estos biomarcadores están presentes en el fluido crevicular gingival y pueden ser de utilidad para identificar y predecir la progresión de la enfermedad periodontal y para evaluar la respuesta al tratamiento (Embery y col., 1994).

Recientemente, se está estudiando el uso de la saliva como un medio de diagnóstico para enfermedades orales ya que es rápido, no invasivo, fácil de coleccionar y generalmente abundante (Malamud y col., 2005; Christodoulides y col., 2007; Herr y col., 2007; Miller y col., 2010).

Un gran número de publicaciones han reportado niveles locales de varias citocinas en diferentes condiciones periodontales. Como regla general dichos estudios se enfocan en pocos mediadores a la vez, por razones de costo y

complejidad técnica, sin embargo está cada vez más claro que las citocinas no funcionan aisladamente, sino en complejas redes que involucran efectos pro y antiinflamatorios. En el presente trabajo hemos medido simultáneamente 11 citocinas.

La respuesta de fase aguda es un proceso no específico que ocurre en la respuesta inicial del hospedero ante un daño tisular, infecciones, necrosis o malignidad. Es iniciada por la activación de macrófagos locales, fibroblastos o células endoteliales llevando a la liberación de diversos mediadores (Qvarnstrom y col., 2010).

Cuando la respuesta inflamatoria aguda es insuficiente, estos mediadores estimulan a los hepatocitos a segregar proteínas de fase aguda tales como la PCR durante el proceso de respuesta inflamatoria crónica sistémica no específica (Medzhitov y cols., 2007). La PCR es sintetizada primariamente en el hígado y contribuye a la respuesta no específica en la mayoría de las formas de inflamación, infección y daño tisular (Pepys y Hirschfield 2003). Sin embargo, estudios recientes han subrayado la capacidad del tejido periodontal inflamado en la síntesis de PCR. Así, se ha demostrado la presencia de la proteína así como la expresión de su ARNm en tejidos gingivales tanto de pacientes con periodontitis como en sujetos sanos (Lu y Jin 2010). Adicionalmente, la expresión génica de la PCR está significativamente incrementada en la periodontitis comparada con la gingivitis (Maekawa y col., 2011).

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

De este modo, se han reportado que se encuentran niveles alterados de la PCR en la saliva de los pacientes que tienen EP en comparación con los controles. En 1995, Pederson y col. reportaron por primera vez la presencia de PCR en la saliva de pacientes con enfermedad periodontal destructiva y que estos niveles están directamente relacionados con el estado periodontal de un individuo. Posteriormente, los niveles salivares de PCR demostraron ser significativamente elevados en pacientes con periodontitis en comparación con los pacientes desdentados totales (es decir, sin dientes) (Christodoulides y col., 2005). En consonancia, se ha demostrado que los niveles de PCR fueron de 18,2 veces mayor en la saliva de los pacientes que tenían EP en comparación con los de pacientes dentados sanos (Christodoulides y col. 2007). Por el contrario, un estudio con número limitado de pacientes informó que los niveles de PCR son más bajos durante la periodontitis crónica en comparación con los controles sanos (Aurer y col. 2005). Aunque los datos de todos los estudios no están de acuerdo, la opinión mayoritaria es que los niveles de PCR parecen ser elevados en pacientes con periodontitis. Lo cual fue corroborado en nuestro estudio al

observarse un aumento de los niveles de PCR en saliva de las ratas a las que se les indujo la EP con LPS.

En situaciones normales existe un equilibrio entre las citocinas inflamatorias como: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 y las anti-inflamatorias como: IL-4, IL-10 (Manolagas y Jilka 1995). No hay duda de que el patrón de citocinas expresadas localmente en el tejido periodontal y las células inflamatorias contribuyen al estado o a la fase destructiva de la progresión de la enfermedad (Teng 2006a y b). La evidencia ha demostrado claramente que los perfiles de citocinas tanto Th1 como Th2 están muy a menudo presentes simultáneamente en el tejido periodontal infectado.

La IL-1, conocida como FAO (factor activador de osteoclastos), es secretada en dos formas moleculares, IL-1 α e IL-1 β , por una variedad de células incluidos macrófagos, células B, neutrófilos, fibroblastos y células epiteliales. Esta interleucina es considerada pro inflamatoria por sus efectos ya que produce modificación de células endoteliales (lo que permite la adhesión de polimorfonucleares y monocitos), estimulación de la producción de proteinasas y PGE₂ y estimulación de los osteoclastos (Wilton y col., 1992).

En la investigación periodontal, un gran número de estudios han investigado las concentraciones de IL-1 β en el FGC y la saliva en pacientes con diversas condiciones periodontales, observándose que en ambos casos los niveles de IL-1 β se encuentran elevados en los pacientes con EP comparados con pacientes

sanos (Castro y col., 2003, Miller y col., 2006). La IL-1 β es una molécula diana de la fase inflamatoria de la EP. Así, se ha reportado que pacientes con EP mostraban porcentajes importantes de sitios positivos, para IL-1 α (56%) y para IL-1 β (87%). De las dos isoformas la IL-1 β es más potente en la estimulación de la resorción ósea y es la forma más frecuente en la periodontitis (Castro y col., 2003). En el periodonto, la IL-1 β puede ser sintetizada y secretada por células de tejido conectivo (fibroblastos y células endoteliales), o por los leucocitos infiltrantes (Castro y col., 2003). En estudios clínicos, mayores niveles de IL-1 β se han asociado con la inflamación gingival, la gravedad de la enfermedad periodontal y una falta de eficacia terapéutica (Figuredo y col., 1999). La IL-1 ha sido consistentemente detectada en niveles incrementados en muestras de biopsias gingivales y en FGC de pacientes con periodontitis, demostrándose una correlación entre estos niveles con parámetros de la enfermedad periodontal tales como movilidad dental, sangramiento, bolsa periodontal e índices de higiene (Chaudhari y col., 2011), así como una disminución en su concentración después de tratamiento (Wilton y col., 1992).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica que puede ser secretada por distintas células, es producida por células T y B, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos en respuesta a la infección, el estrés y la neoplasia. También se libera en respuesta a IL-1 y TNF (Carrillo y col., 2006). La actividad biológica de la IL-6 es muy diversa: diferenciación de células B a células plasmáticas, activación de células T, liberación de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos y activación de la cascada del complemento (Revel y col., 1989). De particular importancia es la habilidad de la IL-6 para inducir

resorción ósea, tanto de forma aislada como sinérgicamente con la IL-1 β (Ishimi y col., 1990; Mundy y col., 1991). Esta resorción ósea probablemente sea debida a una estimulación y diferenciación por parte de la IL-6 sobre los precursores de los osteoclastos (Irwin y col., 1998).

La IL-6 frecuentemente se ha denominado “citocina inducible por estrés”, la liberación de la IL-6 inducida por una situación de estrés puede determinar la transición de una situación de inflamación periodontal crónica a aguda, en la que predominarían las células plasmáticas como células de defensa (Aurer y col., 1999).

La IL-6 es útil en periodoncia como herramienta diagnóstica. Se ha medido su concentración en el FGC, en sangre periférica y en tejido gingival para determinar la progresión de la enfermedad, encontrándose que la IL-6 es indicador de pérdida de inserción incipiente y de actividad de la enfermedad (Gemmell y col., 1997).

La influencia de la IL-6 en la enfermedad periodontal ha sido ampliamente documentada. Reinhardt y col., (1993) encontraron niveles significativamente mayores en fluido gingival crevicular de IL-6 en pacientes con periodontitis refractaria que en sujetos estables. Lee y col., (1995) reportan niveles significativamente mayores de IL-6 en FGC en localizaciones activas que inactivas, tanto basales como a los 3 meses. Geivellis y col., (1993) observaron una correlación positiva entre sangrado gingival e IL-6, y entre profundidad de

sondaje e IL-6 en pacientes con periodontitis e incrementos en la IL-6 son descritos en suero de pacientes con periodontitis agresiva generalizada (Robati y col., 2011).

Por el contrario, Bozkurt y col., (2000) no encontraron una correlación significativa entre parámetros periodontales y los niveles de IL-6 en FGC en pacientes con periodontitis del adulto. Estos hallazgos pueden significar que la producción local de mediadores inflamatorios varía de una región a otra y de paciente a paciente, y que los niveles de los mediadores inflamatorios en pacientes periodontales pueden verse influenciados por diversos factores como la composición bacteriana local (Reinhardt y col., 1993).

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

periodontitis, y está asociado a la destrucción y resorción ósea (Page y col., 2000, Gemmell y col., 1997).

Es así que diversos estudios en el campo de la EP reportan incrementos de esta citocina en el FGC y en el suero de pacientes con periodontitis cuando comparados con controles sanos, esos niveles mostraron asimismo una asociación con la carga bacteriana de la placa dental (Andrukhov y col., 2011). De modo similar, Ertugrul y col., (2012) comparan los niveles de la IL-1 y del TNF α en pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada cuando fueron comparados con pacientes sanos, encontrando niveles progresivamente incrementados según la progresión de la enfermedad.

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

A mediados de los 1990, se estableció la secuencia de eventos pro inflamatorios en el periodonto, iniciándose con productos bacterianos tales como los LPS los cuales inducen la expresión de la IL-1 β y el TNF- α , quienes a su vez estimulan la

producción de citocinas, quimiocinas y productos de la ciclooxigenasa que amplifican la inflamación. Subsecuentemente se inducen MMPs que rompen el tejido conectivo y se inicia la resorción ósea resultando en destrucción del hueso alveolar conforme el frente inflamatorio se profundiza en el tejido (Preshaw y Taylor 2011).

Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva que conlleve la destrucción tisular, la actividad del TNF- α debe ser regulada. Esta actividad se lleva a cabo gracias a las citocinas antiinflamatorias, 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 por concurrencia competitiva, bloqueando su acción e impidiendo su desarrollo de señalización intercelular. Delima y col., (2001) realizaron un diseño experimental en primates y concluyen que los receptores solubles de la IL-1 y del TNF- α redujeron significativamente la pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar tras la inducción de periodontitis experimental con ligaduras. Por otro lado el uso de ARN de interferencia para elementos asociados al receptor de TNF, como el TRAF6, reduce la producción de esta citocina en cultivos de células del ligamento periodontal humanas (Tang y col., 2011).

La IL-4 es una citocina pleiotrópica expresada primariamente por las células Th2 y los mastocitos. Se ha demostrado la presencia de linfocitos Th2 que expresan la IL-4 en biopsias gingivales de pacientes con EP (Berglundh y col., 2003; Ito y col., 2005). Adicionalmente la IL-4 ha sido detectada en el FGC humano (Bozkurt

y col., 2006; Kamma y col., 2004), con niveles incrementados en el periodonto sano, lo que sugiere una asociación entre esta citocina y la remisión de la EP (Bozkurt y col., 2006; Giannopoulou y col., 2003; Pradeep y col., 2008). La IL-4 inhibe la resorción ósea *in vivo* e *in vitro*, inhibiendo 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 osteoclásticas (Moreno y col., 2003; 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 esta 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.

Recientemente, diversos autores 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 disminuídos de IL-4 en el suero de pacientes con periodontitis agresiva generalizada cuando comparados con el grupo control sano en oposición al incremento de los valores de IL-6 en los pacientes con periodontitis. Asimismo, Shaddox y col., (2011), demuestran niveles superiores de esta citocina en sitios sanos comparados con sitios enfermos en pacientes con periodontitis agresiva.

Los resultados expuestos en el presente trabajo coinciden con lo anteriormente expuesto, donde el grupo tratado con el LPS de *E.coli* indujo una disminución estadísticamente significativa en los niveles de la IL-4, consistente con una regulación hacia abajo de esta citocina antiinflamatoria y coincidente con los efectos de producción de citocinas, radicales libres y resorción ósea aquí mostrados.

Un importante paradigma en inmunología es que factores inflamatorios activan mecanismos de retroinhibición para restringir la inflamación y limitar el daño tisular asociado (Ivashkiv y col., 2011).

La IL-10 es producida por linfocitos T y B y células del linaje mieloide, es una citocina predominantemente inmunosupresora y antiinflamatoria, es también un potente desactivador de células dendríticas y de macrófagos y juega un papel crítico limitando el daño tisular durante las infecciones y previniendo la autoinmunidad limitando la duración y la intensidad de las reacciones inmunes e inflamatorias.

La IL-10 es una citocina con capacidad de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias e inhibir la osteoclastogénesis (Ivashkiv y col., 2011) y se ha observado que su disminución agrava la resorción ósea (Al-Rasheed y col., 2003).

Gamonal y col., (2000) demuestran niveles incrementados de esta citocina en sitios activos de pacientes con periodontitis, disminuyendo estos niveles con terapia. Igualmente se ha reportado en el suero de pacientes con periodontitis un incremento en los niveles de IL-10 y una asociación con la carga de placa bacteriana (Andrukhov y col., 2011). Comparados con pacientes controles, los pacientes con periodontitis crónica con presencia de *P. gingivalis* presentaron mayores niveles de IL-10 (Trinidad y col., 2012). Recientemente, de Lima Oliveira y col., (2012), examinaron los cambios en los niveles de varias citocinas en el FGC de pacientes con periodontitis agresiva generalizada antes y después de terapia, reportando una considerable mejoría en el perfil de citocinas post terapia disminuyendo la IL-1 β e incrementando los niveles de la IL-10.

Los resultados mostrados en el presente trabajo, coinciden con la literatura general, ya que el grupo de ratas tratadas con LPS mostró un incremento en ambas isoformas de la IL-1 tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento, un incremento de la IL-6 y del TNF- α a los 14 días de tratamiento y por otro lado las citocinas antiinflamatorias (IL-4 y IL-10) que regulan a la IL-6 y TNF- α se encuentran alteradas en el grupo de ratas tratadas con LPS a los 7 días de tratamiento en concordancia con las funciones regulatorias a ellas atribuida. El tratamiento con el valsartán bloquea de modo significativo este efecto, pudiendo ser considerado entre los recursos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Se ha demostrado que las células T que infiltran el tejido gingival de pacientes con periodontitis pueden expresar el ARNm para citocinas Th1 y Th2, así como para citocinas regulatorias simultáneamente (Ito y col., 2005). Ciertas citocinas parecen ser necesarias, pero no suficientes por sí mismas en la diferenciación de subgrupos específicos de células T, ejemplificado por el requerimiento de IL-12 para la inducción de células Th1. Otras citocinas refuerzan el desarrollo de subgrupos ya reclutadas para un linaje particular, y poseen un papel auxiliar en su diferenciación, por ejemplo, la IL-18 y la IL-2 refuerzan la diferenciación de células Th1 (Murphy y Stockinger 2010). Más aún, se considera que las células T poseen cierta plasticidad y que este fenómeno está influenciado por el “entorno” de citocinas (Bluestone y col., 2009).

En general se acepta que el control del equilibrio Th1/Th2 es clave en la inmunorregulación de la enfermedad periodontal. Evidencia creciente en los seres humanos indica que la lesión periodontal estable está mediada por las células Th1, mientras que en la lesión progresiva ocurre un cambio hacia las células Th2. Igualmente, hay pruebas contradictorias, principalmente en modelos animales, donde la pérdida ósea es mediada por las respuestas de Th1, y que las respuestas Th2 son protectoras (Murphy y Stockinger 2010).

La IL-18 es una citocina proinflamatoria de la superfamilia de la IL-1 y fue originalmente identificada como factor inductor del interferón gamma. Es la única que tiene la capacidad de inducir la diferenciación tanto de Th1 o Th2, dependiendo del contexto inmunológico (Nakanishi y col., 2001). En presencia de IL-12, la IL-18 induce respuestas Th1 mientras que, en ausencia de IL-12, promueve respuestas Th2 (Orozco y col., 2007).

La IL-18 se expresa en macrófagos/monocitos y células epiteliales orales y su regulación está involucrada en diversas enfermedades crónicas incluyendo la enfermedad periodontal, ya que es una de las citocinas responsables de la iniciación y progresión de la EP, estudios realizados por Jablonska y col., (2002), indican que la IL-18 induce la liberación de MMP-9 e IL-1 β y ambas tienen efectos proinflamatorios y sobre la degradación de tejido gingival y aunque la IL-1 β e IL-18 pertenecen a la misma familia de citocinas, se ha demostrado que su expresión génica y secreción son regulados diferencialmente en células monocíticas humanas en respuesta a la *P. gingivalis*, por lo tanto, las citocinas

de la familia IL-1 pueden participar a través de diferentes vías en la patogénesis de la periodontitis compleja (Hamedi y col., 2009).

Se han encontrado niveles elevados de IL-18 en el FGC tanto en la gingivitis como en la periodontitis, sugiriéndose una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y los niveles de la IL-18 (Orozco y col., 2006), disminuyendo después de tratamiento (Pradeep y col., 2009). Igualmente, Figueredo y col., (2008), reportaron niveles de IL-18 más elevados en periodontitis crónica que en pacientes con gingivitis incluso presentando similar profundidad del surco gingival. Por el contrario, Türkoğlu y col., (2009), no encontraron diferencias significativas entre los niveles de IL-18 en el FGC de pacientes sanos, con gingivitis y con periodontitis ni tampoco entre estos niveles y los parámetros clínicos estudiados.

La IL-12 es una citocina heterodimérica proinflamatoria que favorece la diferenciación de las células CD4⁺ vírgenes en células Th1 y constituye la unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. Los fagocitos y las células dendríticas producen IL-12 en respuesta a patógenos. La producción de la IL-12 depende de mecanismos diferenciales de regulación de la expresión de los genes que codifican para la IL-12, y la regulación cruzada entre los varios subgrupos de células dendríticas que involucra a citocinas tales como IL-10, IFN γ . La IL-12 induce la producción de IFN γ por las células “natural killer” (NK), células dendríticas y macrófagos (Trinchieri 2003; Watford y col., 2003). En presencia de IL-12, la IL-18 induce respuestas Th1.

Varios autores han reportado la presencia de la IL-12 en EP, encontrando niveles de esta citocina inferiores en sitios afectados en pacientes con EP en comparación con la encía sana, estas concentraciones de IL-12 se correlacionaron negativamente, con la profundidad del surco gingival adyacente. (Johnson y Serio, 2005). Orozco y col., (2006), reportan niveles de la subunidad p40 de la IL-12 superiores en suero que el FGC de sitios activos en pacientes con periodontitis.

Diversos autores han reportado el fino balance existente entre las concentraciones de IL-12 y otras citocinas como IL-10 en lesiones periapicales (Colic y col., 2010).

Cairo y col., (2010), indican que pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva no presentaron diferencias significativas en ambas citocinas, siendo difícil señalarlas como biomarcadores del progreso de la EP. Sin embargo, Yücel y col, (2008) encuentran valores significativamente elevados en pacientes con periodontitis crónica cuando comparados con controles sanos y Tsai y col., (2005) reportan valores de IL-12 significativamente mayores en pacientes con periodontitis crónica que en pacientes con gingivitis. Del mismo modo, en muestras de tejido gingival de pacientes con gingivitis y periodontitis, se ha demostrado que la expresión génica de la subunidad p35 de la IL-12 estaba significativamente incrementada cuando comparada con la gingivitis (Honda y col., 2008).

La IL-12 ejerce un papel inhibitorio en la osteoclastogénesis, aunque todavía es controversial si lo hace inhibiendo directamente a los precursores de osteoblastos o indirectamente sobre células T. Se ha descrito que la IL-12, y la IL-18, pueden suprimir al RANKL y la diferenciación de osteoclastos y la función de los osteoclastos maduros in vitro (Gowen, y col., 1986). En este sentido, Amcheslavsky y Bar-Shavit (2006) reportan una inhibición de la diferenciación de los osteoclastos inducida por la IL-12 y mediada por la activación del TLR9.

En el presente trabajo, encontramos un incremento significativo de los niveles de la IL-18 y de la IL-12 inducidos por el LPS a los 14 días de tratamiento, sugiriendo un importante papel inmunomodulador para estas citocinas y sugiriendo con este resultado, que en presencia de IL-12, la IL-18 induce respuesta Th1 regulándose así la respuesta inmune, lo que podría ser señalado como posible blanco terapéutico en la EP. El bloqueo con el antagonista de los receptores AT1 de la ANG II, está en línea con los reportes en la literatura sobre los efectos beneficiosos del bloqueo del SRA en procesos inflamatorios.

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 se encaja del todo en este modelo. La demostración realizada por Infante-Duarte y col., (2000) de que lipopéptidos de *Borrelia burgdorferi* estimulaban 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 (Gaffen y Hajshengallis, 2008) las cuales juegan un rol esencial en la regulación de los procesos inflamatorios y en las enfermedades autoinmunes (Weaver y col., 2007). Este hecho, explica muchas de las discrepancias en el modelo clásico Th1/Th2. La Th17 es activada por diferentes citocinas y factores de transcripción (IL-6, IL-21, IL-23, TGF- β , STAT-3) e inhibido por otros (IL-4, INF, IL-2, IL-27, IL-10), la IL-1 estimula la diferenciación de TH17 (van Beelen y col., 2007).

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 quimiocinas (Beklen y col., 2007), IL-8 (Takahashi y col., 2011).

Asimismo, Konermann y col., (2012) demuestran que en cultivos de células de ligamento periodontal humanas, la IL-17A (100 ng/mL) incrementan la secreción de IL-6 facilitando el reclutamiento de leucocitos.

La IL-17 juega un papel muy importante en los procesos inflamatorios involucrados tanto en la autoinmunidad como en la defensa del huésped (Yu y Gaffen, 2008a). Sin embargo su participación en las enfermedades orales humanas apenas comienza a ser investigado y su papel específico en la patogénesis y protección del huésped aún no son conocidas.

Así, estudios clínicos reportan niveles incrementados de la IL-17 asociados con periodontitis crónica en biopsias de tejidos (Takahashi y col., 2005; Ohya y col., 2009), en fluido gingival crevicular (Vernal y col., 2005) y en lesiones periapicales crónicas (Johnson y col., 2004; Colic y col., 2007). Se ha reportado que *P. 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, 1999). 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.

Existe evidencia creciente de una participación en la EP de las citocinas Th17, pero está abierto a debate si su papel dominante es protector o destructor (Kramer y Gaffen, 2007). Existen reportes de un papel protector para la IL-17 contra infecciones bacterianas y específicamente infecciones periodontales, por ejemplo, contra la pérdida ósea inducida por *P. gingivalis*, vía la movilización de neutrófilos en un modelo murino (Yu y col., 2008b).

Sin embargo, células mononucleares de sangre periférica de pacientes con gingivitis y periodontitis estimuladas con proteínas de la membrana externa de *P. gingivalis*, expresan la IL-17 (Oda y col., 2003). 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).

En el presente trabajo, mostramos un incremento en los valores de la IL-17 en el grupo tratado con LPS tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento el cual es revertido por el bloqueante de los receptores de la ANG II, el valsartán.

QUIMIOCIAS

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 citocinas con funciones muy específicas controlan la activación y el flujo de estas células (Cano y Montoya, 2001).

Desde 1986 un amplio número de citocinas estrechamente relacionadas, que se especializan en activar y atraer leucocitos hacia los sitios de daño, han sido identificadas, clonadas y secuenciadas. Inicialmente se clasificaron como citocinas quimiotácticas; hoy se sabe que cumplen además funciones importantes en la proliferación y apoptosis de diferentes células, la morfogénesis tisular, la hematopoyesis, la angiogénesis y en el desarrollo de respuestas inmunes específicas, induciendo el tráfico de las células dendríticas, los linfocitos Th1, Th2 y B en el tejido linfoides secundario, lo cual contribuye a la ubicación

celular en diferentes localizaciones anatómicas. Generalmente no inducen la producción de otras citocinas, no generan fiebre ni son reactantes de fase aguda. La mayoría de ellas se producen en respuesta a estímulos proinflamatorios e inmunomoduladores (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.

Las quimiocinas RANTES/CCL5 y MIP-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 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 Th1o Th2 y aumentan la producción de IgE e IgG4.

Diversos autores han demostrado la presencia de RANTES/CCL5 y su receptor CCR5 en la enfermedad periodontal. Así Gemmell y col., (2001), en biopsias de tejido sano y con diversos grados de inflamación, encuentran una disminución de RANTES Y MCP-1 a medida que incrementa la inflamación.

Sin embargo, 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 dos veces más en promedio RANTES q el grupo control (Fokkema y col., 2003).

Igualmente, en biopsias de encías sanas o 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).

Adicionalmente, estudios con un antagonista del receptor de RANTES, el Met-Rantes, en ratones C57Bl/6 infectados oralmente con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y tratados con dosis crecientes del Met-RANTES, mostraron fuertes reducciones en la pérdida de hueso alveolar y la migración de células inflamatorias demostrando la capacidad de disminuir los niveles de las citocinas proinflamatorias Th1 y de citocinas osteoclastogénicas. Sin embargo, las dosis máximas también modularon la respuesta del huésped de modo inespecífico y excesivo interfiriendo también con la producción de mediadores antimicrobianos tales como MPO, iNOS e IgG, y con la migración celular resaltando la delgada línea existente entre una inmunoregulación beneficiosa y la interferencia con las defensas del huésped en la periodontitis experimental (Repeke, 2011).

Los resultados aquí presentados muestran un incremento en la secreción de RANTES en el grupo de animales tratados con LPS tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento, efecto que es revertido por el valsartán.

Por otro lado en el tejido gingival se ha demostrado la presencia de células de memoria activadas, estas células en los sitios efectores derivan de los nódulos linfáticos, donde células nativas CD4⁺ experimentan la presentación de antígenos por las células presentadora de antígenos. La locomoción de estas células de memoria activadas al sitio efector está regulada por quimiocinas y moléculas de adhesión (Butcher y col., 1996;).

La CCL20, alternativamente denominada MIP-3 α , es expresada por varios tipos de células epiteliales, incluyendo queratinocitos, células epiteliales pulmonares e intestinales (Charbonnier y col., 1999; Reibman y col., 2003). La CCL20 se expresa en muy bajos niveles basales, pero puede ser fuertemente inducida por señales proinflamatorias 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 sus efectos (Greaves y col., 1997). El par CCL20/CCR6 es responsable por la quimioatracción 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 (Liao y col., 1999; Dieu y col., 1998).

En el tejido periodontal enfermo, encontramos infiltradas células T de memoria (Yamazaki y col., 1993) y células dendríticas (Yuan y col., 1999) pero el mecanismo de la infiltración de estas células es incierto. Hosokawa y col., (2002), demostraron que tejidos gingivales inflamados expresan el ARNm para MIP-3 α en contraste con los bajos niveles encontrados en tejido sano. Adicionalmente, los autores reportan, mediante marcaje inmunohistoquímico, 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. 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). En un trabajo posterior, Hosokawa y col., (2005), reportan un efecto de la MIP-3 α , incrementando la producción de CXCL12 en fibroblastos gingivales humanos.

Nuestros resultados muestran un incremento de la MIP-3 α en el grupo tratado con LPS a los 7 días, sin embargo, a los 14 días se muestra una reducción de los niveles, pudiéramos inferir que el incremento a tiempos más tempranos actuaría para favorecer la migración celular al sitio de inflamación. Este efecto fue totalmente bloqueado por el valsartán.

Actualmente, está reconocido que la ANG II, es el efector principal del sistema renina-angiotensina, y regula también el crecimiento celular y la fibrosis. Adicionalmente, datos recientes sugieren que la ANG II está involucrada en eventos claves del proceso inflamatorio (Suzuki y col., 2003b).

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

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

Asimismo, Shishido y col., (2011), reportan que la administración del valsartán redujo el incremento de niveles crónicos de inflamación en pacientes con síndrome metabólico, con o sin diabetes mellitus, disminuyendo los valores de PCR y de microalbuminuria, indicando que las propiedades antiinflamatorias 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 proinflamatorias 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).

Recientemente, Nakamura y col., (2011), demuestran 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; en el mismo trabajo, los autores estudian 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 , reportando un incremento en el nivel de los tres parámetros estudiados, que fue abolido silenciando el gen para el receptor AT1, sugiriendo un papel de la ANGII en la regulación de la producción de IL-6 inducida por la IL-1 en los procesos inflamatorios gingivales.

Nuestros resultados, confirman y extienden estos datos, demostrando mediante inmunofluorescencia la presencia de receptores AT1 en el periodonto de ratas en los cuatro grupos experimentales, el tratamiento con LPS incrementó de modo importante la expresión del receptor AT1, lo cual se ve reflejado en aumento de la densidad óptica relativa de este receptor tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento, efecto que fue revertido en el grupo al cual se le administró el valsartán.

Consistente con lo anterior, el bloqueo del receptor AT1 con el valsartán, bloqueó el incremento inducido por el LPS en los niveles de la PCR, las citocinas proinflamatorias y de las quimiocinas.

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 antiinflamatorias

en modelos de periodontitis inducidos por ligadura o por administración de toxinas bacterianas. Así se han reportado efectos beneficiosos sobre la pérdida de hueso alveolar y el recuento de osteoclastos con fluoxetina (Branco de Almeida y col., 2011), extractos de Ginkgo Biloba (Sezer y col., 2012), ácido bórico (Demirer y col., 2012), donantes de óxido nítrico como el S-nitrosoglutatión (de Menezes y col., 2011), Pentoxifilina y Talidomida (Lima y col., 2004) y clorpromazina (Lima y col., 2000), Quercetina (Cheng y col., 2010), cúrcuma (Guimarães y col., 2011) 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 de antihipertensivos, sino de moduladores de la inflamación.

SISTEMA RANK/RANKL/OPG

Actualmente, existe evidencia considerable del funcionamiento en red para las citocinas: IL-1 β , TNF- α , IL-6 y el sistema RANK/RANKL//OPG y continúa la investigación sobre el papel de otras citocinas y quimiocinas en la EP. Los diferentes componentes del periodonto participan de manera activa en los fenómenos de la respuesta inmunitaria que se desencadena en la EP. Los osteoblastos regulan la resorción ósea a merced a la activación y reclutamiento de osteoclastos maduros (Suda y col., 1999).

Los osteoclastos son células multinucleadas con especificidad tisular originadas a partir de precursores hematopoyéticos de la estirpe monocito-macrófago. La formación de osteoclastos, plenamente diferenciados, está mediada por células estromales/osteoblastos (Teitelbaum 2000). El RANKL y OPG son factores clave en la regulación de la osteoclastogénesis (Suda y col., 1999; Lerner, 2000). El RANKL es una proteína transmembrana producida en los osteoblastos y juega un papel esencial en la diferenciación de los osteoclastos al unirse a su receptor RANK en las células precursoras de osteoclastos. La interacción entre RANKL y RANK puede ser bloqueada por la OPG, una proteína soluble liberada por los osteoblastos que actúa como un receptor señuelo para el RANKL (Boyle y col., 2003).

Varios estudios han sugerido que los linfocitos T podrían modular la inflamación y/o la resorción ósea alveolar, lo cual fue corroborado cuando se observó la expresión de RANKL por células T CD4⁺ (Kong y col., 1999b; Liu y col., 2003). Recientemente se ha demostrado que clones de células T establecidas a partir de los tejidos gingivales expresaron el ARNm para RANKL (Ito y col., 2005). Por lo tanto, diferencias en la expresión de RANKL podrían ser debidas a diferentes fases de activación o subconjuntos de células T infiltrantes en las lesiones.

Estudios iniciales realizados por Teng y col., (2000), demostraron un papel para el RANKL en la resorción ósea alveolar, reportando un aumento en la relación RANKL/OPG en la periodontitis en comparación con sujetos sanos, lo cual fue corroborado por Mogi y col., (2004), ya que en el FGC el cociente RANKL/OPG

es significativamente superior en pacientes con periodontitis con respecto a los individuos sanos. También ha sido evidenciado por inmunohistoquímica, por PCR semicuantitativa y mediante hibridación in situ, una sobreexpresión de RANKL en los tejidos periodontales inflamados, lo que sugiere la expresión de RANKL por linfocitos y macrófagos además de las células osteoblásticas estromales (Liu y col., 2003, Crotti y col., 2003).

El control fisiológico de la actividad de resorción ósea en osteoclastos multinucleados diferenciados y la proliferación, diferenciación y fusión de progenitores de osteoclastos hacia nuevos osteoclastos está regulado por varias hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Entre las moléculas presentes en el proceso inflamatorio, las interleucinas IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 y TNF- α , estimulan la resorción ósea y por tanto están implicadas en la patogénesis de la inflamación inducida por la resorción del hueso (Braun y Zwerina, 2011), por otro lado también hay citocinas que inhiben la resorción ósea como los son: IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, IFN γ .

En líneas generales, la presencia de patógenos en el medio periodontal dispara una producción inicial de citocinas proinflamatorias tales como TNF α e IL-1 β , las cuales estimulan la expresión de MMPs de la matriz que degradan la matriz extracelular del tejido conectivo. Citocinas tales como el TNF α pueden estimular la osteoclastogénesis independientemente, mientras que otras citocinas estimulan la expresión de RANKL que conduce a la formación de osteoclastos y actividad osteoclastogénica. Las respuestas inmunes, tanto la innata como la adaptativa son responsables por los altos niveles de inflamación y resorción ósea. Las citocinas proinflamatorias generan un círculo de amplificación que

contribuye a la progresión de la lesión periodontal. De modo inverso, citocinas producidas por células Th2 y Treg tienen efectos opuestos (Graves y col., 2011).

Así, el TNF- α , IL-1, IL-6 y la IL-17 regulan hacia arriba la expresión de RANKL en los osteoblastos, el TNF promueve la diferenciación y supervivencia de los osteoclastos. La IL-1 promueve la diferenciación de los osteoclastos y mantiene su activación y supervivencia. La IL-6 y la IL-17 promueven la osteoclastogénesis de modo indirecto, la IL-6 incrementa la expresión de RANKL y contribuye a la inducción de células Th17, éstas a su vez secretan IL-17 la cual induce la expresión de RANKL en los osteoblastos e incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos (Braun y Zwerina, 2011).

Por el contrario, la IL-4 y la IL-10 previenen directamente la diferenciación de precursores osteoclásticos y la expresión de factores como NFATc1 (Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático 1) y c-fos durante la osteoclastogénesis (Evans y Fox 2007; Mohamed y col., 2007). Asimismo suprimen la expresión de RANK, e incrementan la expresión de OPG, mientras que inhibe la señalización por NFkB, MAPK y calcio (Palmqvist y col., 2006; Wei y col., 2002; Park-Min y col., 2009). Una función clave de la IL-10 es atenuar la inflamación suprimiendo la producción de TNF α e IL-1 β , antagonizando por lo tanto su función de resorción (Park-Min y col., 2009).

La IL-12 también juega un papel inhibitorio en la osteoclastogénesis, pero aún es controversial, ya que inhibe directamente a precursores de los osteoclastos o

tiene como blanco otras células como células estromales/osteoblastos o células T para así suprimir de modo indirecto la osteoclastogénesis (Horwood y col., 2001). La apoptosis inducida por la interacción entre el FasL o CD95L (pertenece a la familia de TNF tipo-II ligando) inducido por la IL-12 -sola o de modo sinérgico con la IL-18 y el Fas inducido por el TNF- α contribuye a la inhibición de la osteoclastogénesis (Kitaura y col., 2006)

En el presente trabajo, hemos discutido como el tratamiento con el LPS de *E. coli*, induce un incremento general de citocinas (con excepción de la IL-4) el cual es revertido con el pretratamiento con valsartán. Mostramos asimismo como este tratamiento induce un incremento significativo en la expresión de RANK y de RANKL, así como una disminución marcada en la expresión de OPG, incrementando la relación RANKL/OPG de modo consistente con un incremento en los procesos de destrucción del tejido conectivo y resorción ósea demostrados en nuestros resultados. Estos efectos, fueron bloqueados por el pretratamiento con el bloqueante del receptor AT1 de la ANG II, el valsartán.

Se ha demostrado que el SRA desempeña un importante papel en la regulación de la remodelación de los tejidos. Diversos estudios han postulado que la Ang II puede actuar sobre las células implicadas en el metabolismo óseo a través de receptores localizados en los osteoblastos y osteoclastos (Shimuzu y col., 2008). Se sabe que la Ang I y II son potentes estimuladores de la resorción ósea osteoclástica. (Hatton y col., 1997).

Se ha postulado igualmente, una función fisiológica para la ANG II en el metabolismo óseo. Varios reportes han señalado la presencia de ambos subtipos de receptores para la ANG II tanto en osteoblastos como osteoclastos así como la de la ECA (Izu y col., 2009). La activación del SRA en la rata conduce a una masiva resorción ósea. La ANG II es un potente estimulador tanto de la resorción ósea osteoclástica como de la proliferación de osteoblastos (Hatton y col., 1997).

Actualmente se ha demostrado claramente que la Ang II promueve indirectamente la diferenciación y activación de osteoclastos responsables de la resorción ósea mediante la regulación hacia arriba de RANKL en los osteoblastos (Shimizu y col., 2008). Además, en este mismo estudio se confirma que el tratamiento con Ang II activa al NFkB en los osteoclastos. Así, el sistema renina-angiotensina podría estar involucrados en la regulación de la activación de los osteoclastos.

Estudios con modelos de ratones transgénicos THM (Tsukuba hypertensive Mouse), que expresan tanto el gen humano para renina como para el angiotensinógeno (Asaba y col., 2009), muestran que la activación del sistema renina angiotensina, induce un alto recambio óseo, con acelerada resorción ósea mediante un incremento en la expresión de RANKL en los osteoblastos, estimulando la formación de los osteoclastos. Asimismo, Kaneko y col., (2011), mediante delección del receptor AT1a en osteoblastos de ratones, demuestran

que la ausencia de este receptor está asociada a un incremento del volumen de hueso trabecular, mayor número de trabéculas y mayor conectividad.

Así, la ANG II promueve de modo indirecto la diferenciación y activación de los osteoclastos responsables por la resorción ósea, vía la regulación hacia arriba del RANKL en los osteoblastos (Shimizu y col., 2008; Asaba y col., 2009; Kaneko y col., 2011; Guan y col., 2011).

Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Shimizu y col., (2008), quienes encontraron en células mononucleares de médula ósea que la ANG II incrementó de modo significativo el número de osteoclastos positivos a la fosfatasa ácida resistente al tartrato posiblemente debida al incremento en la expresión del RANKL en los osteoblastos. Estos efectos fueron totalmente revertidos por el olmesartán, bloqueante de los receptores AT1 de la ANG II.

Estudios clínicos recientes han demostrado que fármacos que intervienen en el SRA tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Lynn y col., 2006; Rejnmark y col., 2006), disminuyen el riesgo de fractura.

TLRs

La presencia de bacterias es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la periodontitis, el reconocimiento de componentes microbianos como “señales de peligro” por las células del huésped y la subsecuente producción de mediadores inflamatorios es un paso esencial en la patogénesis de la periodontitis. Uno de los componentes críticos en la respuesta del huésped a la

bacteria o sus productos son los TLRs, quienes activan la respuesta inmune innata uniendo a componentes microbianos (ADN bacterial, peptidoglicano, flagelina, lipopéptidos etc) (Graves y col., 2011).

Tras la activación de los TLRs, una cascada de señalización intracelular lleva a la activación de factores de transcripción tales como el NFkB, el AP-1 (proteína activadora-1) y la subsecuente producción de diversas citocinas y quimiocinas. Entre los TLRs, el TLR2 y TLR4 figuran entre los principales sensores para los componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas en mamíferos siendo muy importantes en el progreso de la periodontitis (Matera y col., 2009; Harokopakis y Hajishengallis 2005; Gaddis y col., 2009). La familia de receptores Toll-like, son activados por LPS en numerosas células eucariotas incluyendo el grupo de fagocitos naturales, pero de forma especial con el TLR4 y con el antígeno de membrana CD14 presentes en monocitos/macrófagos (Bainbridge y col, 2002; Lundeland y col., 2012), linfocitos B (Gerondakis y col., 2007), neutrófilos, fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos gingival permitiendo la maduración y la activación de esas células presentadoras de antígeno (Scheres y col., 2011).

Estudios recientes describen un papel tanto para el TLR2 como el TLR4 en el reconocimiento del *A. actinomycetemcomitans*, en la estimulación de la expresión de citocinas, migración de células e inducción de la osteoclastogénesis y pérdida del hueso alveolar (Gelani y col., 2009, Lima y col., 2010).

En efecto, Beklen y col., (2008), estudiaron la expresión celular y distribución de los TLRs desde el 1 hasta el 10 en la periodontitis comparado con grupos sanos, encontrando que, con excepción del TLR10, todos ellos se encuentran tanto en tejidos sanos como con periodontitis mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para todos los receptores exceptuando TLR7 y TLR8.

Recientemente se ha reportado en fibroblastos del ligamento periodontal de pacientes con periodontitis, una mayor expresión del ARNm para TLR1, TLR4, TLR7 y CD14, tanto antes como después de la inducción con *P. gingivalis*. En contraste, los fibroblastos gingivales de pacientes con periodontitis tenían fuerte inducción de TLR1, TLR2 y TLR7 por *P. gingivalis* (Scheres y col., 2011). Del mismo modo, Buduneli y col., (2011), estudiando la concentración de TLR2 y TLRs4 en saliva y plasma de pacientes con periodontitis crónica, reportan valores en saliva similares para TLR2 en pacientes enfermos y controles sanos mientras que los pacientes con periodontitis crónica exhibieron valores salivares y plasmáticos incrementados del TLR4 y valores altos de TLR2 en plasma.

Contrariamente, Oztürk y Yildiz, 2011, estudiando la expresión del TLRs en pacientes con gingivitis y periodontitis agresiva crónica si bien encuentran expresión del TLR4 en queratinocitos gingivales, fibroblastos, células inflamatorias y en el endotelio de capilares del tejido conectivo, reportan niveles similares de este receptor en pacientes y controles sanos.

A su vez, Sun y col., (2010), estudiaron la expresión de los genes para TLR2 y TLR4 y la producción de citocinas (IL1 β , IL-6, IL-8, IL-10, y TNF- α), en células de ligamento periodontal humanas estimuladas con bacterias o LPS; ambos tratamientos incrementaron tanto la expresión génica de ambos receptores como la producción de citocinas, sugiriendo que los TLR2 y TLR4 son moléculas claves en el control de la producción de citocinas inducidas por bacterias Gram-periodontales o sus LPS.

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) demuestran en células mesangiales de ratones tratadas con ANG II, una regulación hacia arriba del ARNm y de la proteína del TLR4, mediado por el receptor AT1; la preincubación de las células con ANG II, incrementó la activación del NF κ B inducida por el LPS y la expresión de citocinas sugiriendo que la ANG II induce la activación del sistema inmune mediante mecanismos que involucran una regulación del TLR4.

Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente expresado, ya que demostramos mediante inmunofluorescencia la presencia de receptores TLR4

en la encía de las ratas, encontrándose un incremento en los grupos tratados por el LPS, tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento. Este efecto se ve revertido por el uso del valsartán, indicando la participación del SRA en los procesos inflamatorios mediados por toxinas bacterianas en la periodontitis. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, no encontramos expresión del TRL2 (resultados no mostrados).

p38 MAPK y NFkB

Como ya ha sido expresado, la activación de los receptores TLR proporciona el nexo entre el ambiente extracelular y la iniciación de los eventos intracelulares que activan diversos componentes de señalización. El estudio de las vías de señalización en la EP ha tomado relevancia en los últimos años (Kirkwood 2007), hasta el momento se ha demostrado que la inducción con inyecciones de LPS activa múltiples vías de señalización en las células del periodonto, tales como fibroblastos y osteoblastos (Rossa y col., 2007).

Entre las diversas moléculas de señalización que regulan las vías inflamatorias, las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son importantes debido a que su expresión aumenta y contribuye significativamente a la regulación de la enfermedad inflamatoria (Li y col., 2011). Aunque la vía de las ERKs responden a mitógenos extracelulares y regulan la supervivencia celular, la p38 MAPK, la JNK y el NFkB están involucrados en las respuestas ambientales al estrés, incluyendo estímulos inflamatorios. Se ha reportado que la vía de la p38 MAPK juega un papel importante en la regulación de genes de citocinas y

quimiocinas tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Rossa y col., 2007).

Se han realizado estudios donde se muestra la relevancia *in vitro* que tiene la p38 MAPK en la regulación de la expresión de IL-6, MMP-13 y NFκB en fibroblastos y osteoclastos de tejido periodontal (Rossa y col., 2007; Rossa y col., 2006; Patil y col., 2004; Patil y col., 2006).

Por otro lado se ha demostrado un aumento de la fosforilación de la p38 MAPK cuando se indujo la periodontitis con inyecciones de LPS lo cual fue corroborado observándose un aumento de los valores de p38 fosforilados en pacientes con periodontitis con relación al grupo control (Kirkwood y col., 2007).

Diversos estudios han mostrado un papel para estas kinasas en la regulación de la expresión del RANKL inducida por citocinas. Así, se ha demostrado que los fibroblastos del ligamento periodontal producen ARNm para el RANKL inducidos por la IL-1α vía señalización de ERKs (Fukushima y col., 2005). Sin embargo, también se ha demostrado la participación tanto de ERKs como de JNK y p38 MAPK en la inducción de la expresión del RANKL por la IL-1β (Oikawa y col., 2007).

Sin embargo, Okahashi y col., (2004), reportan que la expresión del RANKL en osteoblastos, inducida por *P.gingivalis* no involucra ni la vía de la p38 MAPK ni de las ERKs ni de la fosfatidilinositol 3 kinasa.

Recientemente, Rossa y col., (2006), indican que la activación de la vía de la p38 MAPK es requerida para que ocurra la pérdida de hueso alveolar en modelos experimentales animales. En un estudio posterior, estos autores demuestran que la p38 MAPK y sus activadores MKK3 y MKK6 son necesarios para la expresión del RANKL inducida por el LPS en células de fibroblastos del ligamento periodontal (Rossa y col., 2008). Igualmente, Reddi y col., (2011), reportan la fosforilación de la p38 MAPK inducida por *P. gingivalis* en células estromales de médula ósea.

Actualmente, estrategias terapéuticas se han dirigido a esta vía de señalización (Kirkwood y col., 2007; Li y col., 2011), de este modo, inhibidores de p38 MAPK como el SC409, han demostrado que son eficaces en reducir y revertir la destrucción del cartílago y hueso en un modelo de artritis experimental (Medicherla y col., 2006). Igualmente, el SB 203580 y el SB202190, inhibidores selectivos de las isoformas p38 α y p38 β produjeron efectos beneficiosos en modelos animales de artritis, resorción ósea, choque por endotoxinas y función inmune (Badger y col., 1996). En particular, la isoforma p38 α , se activa principalmente dentro de las células implicadas en el proceso inflamatorio. Estos inhibidores también se han utilizado para la prevención de la enfermedad periodontal, siendo su efecto dependiente de la dosis (Kirkwood y col., 2007).

Es bien conocido que niveles elevados de ANG II pueden contribuir al desarrollo de patologías tales como la hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis y

re-estenosis después de la lesión vascular (Rakugi y col.,1994; Feng y col., 2001; Weiss 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 (Gibbons y col., 1992; Sadoshima e Izumo, 1993; Weber y col., 1994; Brilla y col., 1995; Suzuki y col., 2003a; de Cavanagh y col., 2009).

La angiotensina 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 musculo liso aórtico de rata, a través de la activación del subtipo de receptor AT1 (Lee y col., 2007). De este modo, se ha reportado una mediación de la vía de la p38 MAPK en la contracción vascular inducida por la ANG II (Meloche y col., 2002; Taniyama y col., 2004) y se ha sugerido que la activación de p38 MAPK por la ANGII contribuye a la regulación de la migración quimiotáctica de células musculares lisas vasculares, mediada por la fosforilación de la Hsp27 (proteína de choque térmico 27)(Lee y col., 2007) y que las células progenitoras endoteliales pueden retrasar el progreso de la remodelación vascular inducida por la Ang II en los vasos sanguíneos, a través de la inactivación de la p38 MAPK mediante la reducción de la expresión de c-myc y c-fos (Fang y col., 2011). Estos efectos están mediados por el receptor AT1 a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de una o más serina treonina y tirosina quinasas que incluyen MAPKs (Touyz y Schiffrin, 2000; Touyz , 2004; Clempus y Griendling, 2006), ERK1/2, la p38MAPK, y c-Jun (Kyaw y col., 2004; Ohtsu y col., 2005; Lee y col., 2007).

La angiotensina II aumenta la expresión ciclooxygenasa-2 en fibroblastos de la aorta a través de la activación de la p38 MAPK, de fibroblastos aórticos en ratas normotensos y ratas espontáneamente hipertensas (Beltrán y col., 2009).

Como mencionamos anteriormente, existen reportes en la literatura que conectan la activación de la p38 MAPK con la pérdida ósea alveolar, sin embargo, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, no existen reportes conectando estos dos elementos con la posible activación por la ANG II en la enfermedad periodontal. Nuestros resultados concuerdan con las evidencias anteriormente descritas ya que mediante la inmunofluorescencia se observa la expresión del receptor AT1 de la ANG II, así como la presencia de p38 MAPK en la encía de las ratas incrementándose su activación en relación al tiempo de tratamiento.

Por otro lado cuando realizamos las relaciones de p-p38/p38totales se pudo observar que los valores de la densidad óptica de los p38 fosforilados son mayores en el grupo tratado con LPS con relación al grupo control. Efectos que se vieron revertidos por el uso del antagonista de los receptores AT1 (VAL), lo que corrobora que la p38 MAPK es una de las vías de señalización involucradas en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

El NFkB juega un papel muy importante y evolutivamente conservado en el sistema inmune. Los programas transcripcionales regulados por el NFkB son esenciales para el desarrollo y manutención de la respuesta inmune (Hayden y Ghosh, 2011), del esqueleto (Novack, 2011) y epitelio (Wullaert y col., 2011), donde contribuye al control de la diferenciación, proliferación y supervivencia celular.

La contribución del NFkB a la enfermedad es mejor entendida en el contexto de las patologías inflamatorias y enfermedades autoinmunes, donde citocinas proinflamatorias inducen la activación del NFkB lo cual 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 (Rial y col., 2012, Demmer y Desvarieux 2006; Taylor y col., 2004).

Está bien establecido un papel esencial para el NFkB en la osteoclastogénesis, ya que ratones deficientes de un NFkB funcional desarrollan osteopetrosis debido a la ausencia de osteoclastos (Boyce y col., 1999). Asimismo, Chang y col., (2009), reportan en un modelo murino, que la inhibición del inhibidor endógeno de la IKK-NFkB, incrementa significativamente tanto la masa ósea como la densidad mineral.

En la enfermedad periodontal se activan diversas vías de señalización incluyendo la p38 MAPK y la activación del NFkB, con la consecuente inducción de citocinas/quimiocinas y enzimas destructivas (Andreaskos y col., 2005), las cuales se encuentran en abundancia en los tejidos periodontales inflamados (Bascones y col., 2005, Gemmell y col., 2001).

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 pudo observar un aumento de la relación p50/pp65 en el grupo de pacientes con enfermedad periodontal en comparación al grupo control (Jotwani y col., 2010).

La cinética de la activación de NFkB en los dos modelos experimentales más utilizados para inducir la enfermedad periodontal (ligadura y el inducido con inyecciones de LPS), presenta diferencias, observándose en el caso del modelo de la inducción con LPS, un incremento en la activación de las vías de señalización en relación al tiempo, que es significativa a los 15 días de tratamiento, en oposición al modelo con ligadura donde la activación disminuye en el tiempo (García de Aquino y col., 2009).

Nuestros resultados coinciden con lo anteriormente expuesto, ya que el tratamiento con LPS indujo un incremento significativo en la relación pNFkB/NFkB que fue ligeramente mayor a los 14 días de tratamiento en

comparación con el grupo de 7 días de tratados. Esto estaría en concordancia con la propuesta de que en el modelo con LPS solo están involucradas las vías de p38 y NFkB mientras que en el modelo de ligadura se encuentran también involucradas la vía de STAT-3 y STAT-5 (García de Aquino 2009).

La inhibición de la vía del NFkB, se ha convertido en un blanco atractivo en la intervención terapéutica en la periodontitis. Así Shimizu y col., (2009), utilizando oligodesoxinucleótidos señuelos (ODNs) anti NFkB, demostraron una dramática reducción en la actividad de la IL-6 en el fluido gingival crevicular así como una importante protección de la pérdida del hueso alveolar. Adicionalmente, en un modelo de hueso defectuoso, los autores comprobaron que los ODNs-anti NFkB, promovieron el proceso de cura.

Del mismo modo, Tipton y col., (2007), inhibiendo la cascada de señalización iniciada por la IL-1 β y la subsecuente activación del NFkB mediante el uso de un inhibidor de la ciclooxigenasa 2 (NS-398), demostraron en fibroblastos gingivales humanos, una reducción de los niveles de p-IkB α y de la subunidad p65 tanto nuclear como citoplasmática equivalente a los controles, sugiriendo que la inhibición del NFkB puede ser una estrategia útil en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias orales. En concordancia con lo anteriormente expuesto, Murayama y col., (2011), demuestran en células de ligamento periodontal humano, la producción de diversas citocinas y de la MMP-1 inducida por la IL-1, vía la activación de las tres MAPKs y el NFkB así como la reducción de las mismas inducida por inhibidores de dichos factores, postulando

igualmente que la inhibición de esta vía podría llevar a efectos terapéuticos en la progresión de la periodontitis.

En el presente trabajo reportamos como el valsartán, el antagonista de los receptores AT1 de la angiotensina II, bloquea el incremento en la activación de las vías de la p38 MAPK y del NFκB.

Está demostrado que la Ang II activa al NFκB en diversos tipos de células como monocitos humanos y células U-937 de monocitos humanos (Kranzhofer y col., 1999; Yaghooti y col., 2011), neutrófilos y macrófagos humanos (El Bekay y col., 2003; Pan y col., 2012), hepatocitos (Brasier y col., 2000), adipocitos (Tsuchiya y col., 2006), sinoviocitos similares a fibroblastos y fibroblastos cardíacos (Pattacini y col., 2007), cardiomiocitos (Rouet-Benzineb y col., 2000), células vasculares del músculo liso (Chen y col., 2006), células dendríticas (Wei-Guo y col., 2010), podocitos (Zhang y col., 2009), células mesangiales y células mononucleares (Ruiz-Ortega 2000), células endoteliales microvasculares del cerebro, vasculares, glomerulares, del peritoneo, de vena umbilical humanas, tubulares y líneas celulares como ECV304 (Liu y col., 2006; Brasier y col., 2010; Wu y col., 2009; Guo y col., 2006; Li y col., 2000; Li y col., 2002).

La activación de esta vía por la ANG II induce diversas patologías tales como: síndrome nefrótico (Muñoz y col., 2001), promueve la proliferación de cáncer de mama en ratones (Du y col., 2012), induce una respuesta inflamatoria en los pulmones (Liu y col., 2009), glomeruloesclerosis y fibrosis túbulo-intestinal (Zhuo

y col., 2006) y obesidad (Tsuchiya y col., 2006) todas ellas mediadas por receptores AT1, aunque también se postula la participación del receptor AT2 en patologías como la obstrucción ureteral unilateral (Esteban y col., 2004).

Se ha demostrado que los antagonistas de los receptores AT1 actúan sobre la sub unidad p53 del NFkB (Du y col., 2012) por lo que han sido utilizados para el tratamiento de patologías tales como cáncer de mama en ratones (Ibesartán), o en lesiones pulmonares agudas (losartán) (Liu y col., 2009) Igualmente, se ha experimentado con fármacos que contrarrestan de modo indirecto las acciones de la ANG II tales como partenolida, un inhibidor selectivo de la p65 que actúa como un mecanismo de retroalimentación positiva que puede afectar la sensibilidad de descarga neuronal en respuesta a la ANGII (Mitra y col., 2012), por la activación de PPAR-gamma (Peroxisoma proliferador activado del receptor- gamma) la cual inhibe la activación de las células dendríticas inducidas por Ang II (Wei-Guo y col., 2010), apoyando el importante papel de estos mediadores en la regulación de las células dendríticas, la catepsina bloquea la actividad del NFkB en la inflamación y la fibrosis cardíaca inducida por la ANG II en ratones (Pan y col., 2012).

Por otra parte la Ang II es uno de los inductores más importantes del estrés oxidativo, a través de la activación de la vía de señalización ERO-NFkB provocando un aumento de la PCR, contribuyendo a las acciones proinflamatorias y proateroescleróticas de la ANG II (Li y col., 2011). De este modo, estudios realizados mediante administración de ANG II a nivel del núcleo

paraventricular del hipotálamo, demostraron incrementos en los niveles de la superóxido dismutasa y por ende aumento del estrés oxidativo (Kang y col., 2009). Este estrés oxidativo inducido por la ANGII puede estar modulado por los canales de Na^+ que confieren sensibilidad redox a la célula y a la vez actúan sobre la subunidad p50 del NFkB, modulando así su activación (Shang y col., 2008). Se ha observado igualmente, que el losartán es capaz de suprimir el estrés oxidativo inducido por la activación de NFkB en el riñón de ratas viejas (Kim y col., 2011, 2012).

Se ha demostrado que la ANG II y el TNF- α actúan sinérgicamente estimulando la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) a través de la utilización de distintas vías de señalización intracelular (p38 MAPK y NFkB) y que estas vías se activan de modo independiente y dependiente de ERO. Igualmente, se ha demostrado que la IL-6 juega un papel importante en la activación de NFkB inducida por la administración de ANG II en procesos de inflamación vascular (Brasier 2010).

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existe en la literatura reportes sobre un papel de la ANG II en la activación del NFkB en tejidos periodontales, sin embargo, Sánchez-Lemus y col., (2009a) estudiaron los efectos en el bazo de la administración periférica de LPS a roedores, con el subsecuente incremento de citocinas proinflamatorias en la circulación, siendo este efecto inhibido por el candesartán, un bloqueante de los receptores AT1 de la ANG II tanto a nivel de expresión génica como de las proteínas. Los autores sugieren

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 AngII o NFkB podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio donde el sistema inmune se encuentra involucrado, siendo estas características similares a las que se presentan en la progresión de la enfermedad periodontal donde demostramos en el presente estudio que participan las mismas vías de señalización, p38 MAPK y NFkB, demostrando por inmunofluorescencia la presencia de ambas proteínas. Mostramos igualmente que ambas siguen la misma cinética descrita para este modelo de inducción de la inflamación con LPS, y adicionalmente se observa un aumento de la actividad de las mismas ya que en ambos casos tanto la p38 MAPK como el NFkB fosforilados se encuentran aumentados en el grupo tratado con LPS. Este efecto fue revertido por el uso del antagonista del receptor AT1, sugiriendo que la ANG II puede mediar a este proceso inflamatorio pudiendo ser utilizado como terapia antiinflamatoria.

Está plenamente reportado que el bloqueo de los receptores AT1 disminuye la inflamación inducida por LPS en diversas patologías, tipos celulares y tejidos. Así, esto ha sido demostrado tanto *in vivo como* en tejido periférico de ratas normotensas (Sánchez-Lemus y col., 2008, 2009 a,b), en experimentos *in vitro* con monocitos de pacientes voluntarios normotensos (Larrayoz y col., 2009), en tejidos ricos en macrófagos como el bazo, la glándula suprarrenal y la glándula

pituitaria, donde se demostró que el bloqueo de los receptores AT1 actúa disminuyendo la liberación de citocinas inflamatorias a la circulación a expensas de un aumento de citocinas antiinflamatorias (Sánchez-Lemus y col., 2008, 2009a,b).

Por otro lado el uso del antagonistas de los receptores AT1 revierte la inflamación cerebro vascular (Yamakawa y col., 2003), disminuye la isquemia cerebral en ratas espontáneamente hipertensas (Zhou y col., 2005), la isquemia cerebral, accidentes cerebrovasculares y la hemorragia cerebrovascular (Sironi y col., 2004, Hallevi y col., 2007, Jung y col., 2007).

El candesartán puede disminuir o eliminar de la circulación los factores inflamatorios inducidos por el LPS sin afectar la inducción de LPS de factores anti-inflamatorios. Esto disminuye significativamente el perfil proinflamatorio inducida por LPS en la circulación general (Benicky y col., 2011; Sánchez-Lemus y col., 2008, 2009a, b). Estos estudios demuestran que la utilización de antagonistas de los receptores AT1 pueden ser considerados potentes agentes antiinflamatorios efecto que no tiene nada que ver con sus propiedades antihipertensivas.

En resumen las evidencias demuestran que la administración de LPS desencadena una serie de elementos que finalmente conducen a un proceso inflamatorio ya que al momento en que el LPS es reconocido por el CD14 y se une al TLR4 se inician vías de señalización como la de la p38 MAPK que

conduce a la activación de factores de transcripción como NFκB y la producción de citocinas inflamatorias, la estimulación de la NOS, la NAD(P)H oxidasa y la producción de ERO. Por el contrario, la utilización del antagonista de los receptores AT1, el valsartán, actúa inhibiendo la activación de la p38 MAPK, del NFκB, disminuye la producción de citocinas inflamatorias, limita la estimulación de la oxido nítrico sintasa, la NAD(P)H oxidasa y las especies reactivas de oxígeno, demostrando un efecto terapéutico para esta molécula en el control de los procesos inflamatorios.

Así, las evidencias anteriormente citadas nos permiten sugerir que la inhibición del receptor AT1 con el uso del valsartán reduce la respuesta inmunitaria inflamatoria innata en un modelo de enfermedad periodontal inducida por las inyecciones de LPS en la encía de las ratas.

Nuestros datos demuestran que el valsartán disminuyó la leucocitosis sistémica por disminución del conteo de leucocitos y principalmente el conteo de neutrófilos, disminuyó la movilidad dentaria, revirtió la pérdida de peso corporal de las ratas. El valsartán también revirtió los efectos del LPS sobre la resorción ósea ya que disminuyó el conteo de osteoclastos, aumentó los depósitos de calcio y el colágeno, disminuyó la expresión de los receptores RANK/RANKL y disminuyó la relación RANKL/OPG.

El LPS aumenta la formación de ERO, un efecto mediado a través de una vía dependiente de TLR4 y que conduce a la activación de NFκB. El valsartán

disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes, demostrándose el bloqueo del incremento de la actividad de la SOD, CAT, GPx y NOS inducidos por la administración de LPS. La interferencia del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa con apocinina y el atrapamiento del anión superóxido por el Tempol, bloquearon el efecto que produce la ANG II sobre las enzimas antioxidantes (CAT, GPx y SOD), sugiriéndose que en la enfermedad periodontal inducida con inyecciones con LPS, al ser bloqueado el receptor AT1 con el antagonista del receptor AT1 no solo se impide la producción de especies reactivas de oxígeno sino que apoya la participación de la NAD(H)ox en este efecto.

Por otro lado también se confirmó que el uso del antagonista del receptor AT1 reduce la producción y liberación al medio de citocinas pro inflamatorias (IL-1 α y 1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, IL-10, IL-12, IL17, RANTES y MIP-3 α) y aumenta las citocinas antiinflamatorias IL-4, disminuyó la activación de la p38 MAPK y del NF κ B, así como la expresión del TLR4.

La progresión de la enfermedad periodontal ha sido explicada en parte por diversos factores incluyendo variaciones en los niveles de citoquinas proinflamatorias, un balance alterado entre enzimas proteolíticas y sus inhibidores, un aumento en la cantidad de ROS y cambios en la microflora subgingival entre otros.

Los mecanismos por los que el valsartán reduce los efectos inflamatorios producidos por el LPS no están claros. El bloqueo de las acciones inducidas por

el LPS ya a nivel de la NAD(H)ox, indica que el valsartán puede interferir con los pasos iniciales para el reconocimiento de LPS y su asociación con su receptor TLRs4.

Recientemente se ha postulado 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 para inducir la activación de la neuraminidasa 1 (Neu1 sialidasa) Neu1. Central a este proceso es que el complejo Neu1-MMP9 está unido a los macrófagos sin activar. Se ha identificado al residuo α -2,3-sialil del TLR4 como el blanco específico para la hidrólisis por Neu1, la desaliciación del TLR conduciría a su activación y producción de citocinas proinflamatorias y ERO. La inactivación o inhibición de la MMPs9, Neu1 o G α i, bloquea la activación del NF κ B. Los autores propugnan que agonistas tales como bombesina, bradicinina, ácido lisofosfatídico, colesterol y la ANG I y ANG II son capaces de inducir la actividad de la Neu1 y de la metaloproteinasa 9 en líneas celulares de macrófagos y macrófagos de médula ósea de murinos, llevando a una transactivación del TLRs.

Por otro lado, El-Bekay y col., (2003) demostraron en cultivos de neutrófilos humanos, que la ANG II indujo un incremento en los niveles citosólicos de Ca $^{++}$, liberado principalmente de sus lugares de almacenamiento y un incremento subsecuente de la síntesis de novo y la actividad de la calcineurina y la

expresión del NFkB. Estos resultados son coincidentes con una activación de la calcineurina y de las MAPKs en miocitos cardíacos (Lim y col., 2001). Recientemente se ha reportado que el LPS es capaz de incrementar la actividad de la calcineurina en miocitos cardíacos y que este efecto es mimetizado por la ANG II sin efectos aditivos, las acciones tanto del LPS como de la ANG II fueron prevenidas por el pretratamiento con el bloqueante AT1, el losartán. Los autores proponen que el LPS vía su receptor TLRs4, activaría la síntesis de ANG II, la cual actuando sobre su receptor AT1 y liberando el calcio, activaría a la calcineurina (Suzuki y col., 2007).

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 confirman los recientes reportes sobre los efectos benéficos de los bloqueantes de los receptores AT1 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.

Diversos estudios epidemiológicos reportan efectos beneficiosos de las drogas antihipertensivas, tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o los bloqueantes del receptor AT1, incrementando la masa ósea y disminuyendo el riesgo de fracturas (Lynn y col., 2006, Shimizu y col., 2009, Rejnmarck y col., 2006). El punto final de enfermedad periodontal como ya lo hemos mencionado es la resorción ósea siendo esta la causa más frecuente de la pérdida de las piezas dentarias. Los resultados aquí presentados sugieren

nuevos aspectos terapéuticos de los fármacos antihipertensivos, como los antagonistas de los receptores AT1 de la ANG II, que pueden ser usados para prevenir la enfermedad periodontal cuando es detectada en estadios tempranos de la patología. Sería necesaria la realización de ensayos clínicos con bloqueantes del receptor de la Ang II para confirmar esta teoría.

BIBLIOGRAFÍA

Abdulkhalek S, Amith S, Franchuk S, Jayanth P, Guo M, Finlay T, et.al. (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.

Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.

Akalin F, Baltacioğlu E, Alver A, Karabulut E. (2007). Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 34:558-565.

Akalin F, Toklu E, Renda N. (2005). Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol.* 32: 238–243.

Alfonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spin.* 74; 324-329.

Allam E, Draz A, Hassan A, Neamat A, Galal M, Windsor L. (2010). Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. *J Periodontal Res.* 45(1):136-142.

Al-Rasheed A, Scheerens H, Rennick D, Fletcher H, Tatakis D. (2003). Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. *J Dent Res.* 82(8): 632-635.

Altman L, Baker C, Fleckman P, Luchtel D, Oda D. (1992). Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J. Periodontal. Res.* 27:70-79.

Amano S, Kawakami K, Iwahashi H, Kitano S, Hanazawa S. (1997). Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. *J Cel Physiol.* 173: 301–309.

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.* 76:1148–1153.

Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. (2006). Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides. *J Cell Physiol.* 207(1):244-250.

Andreaskos E, Sacre S, Foxwell B, Feldmann M. (2005). The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 10:2478–2488.

Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen P, Matejka M, Rausch-Fan X. (2011). Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol.* 82(6):885-892.

Artese L, Piattelli A, de Gouveia Cardoso L, Ferrari D, Onuma T, Piccirilli M, et.al. (2010). Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 81(5):718-726.

Asaba Y, Ito M, Fumoto T, Watanabe K, Fukuhara R, Takeshita S, et.al. (2009). Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *J Bone Miner Res.* 24(2):241-250.

Asai Y, Hashimoto M, Ogawa T. (2003). Treponemal glycoconjugate inhibits Toll-like receptor ligand-induced cell activation by blocking LPS-binding protein and CD14 functions. *Eur J Immunol.* 33:3196-3204.

Asai Y, Ohyama Y, Gen K, Ogawa T. (2001). Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 69:7387-7395.

Aurer A, Aleksic J, Ivic- kardum M, Aurer J, Čulo F. (2001). Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J. Clin Periodontol.* 28 (6): 565-568.

Aurer A, Aurer-Kozelj J, Stavljenic-Rukavina A, Kalenic S, Ivic-Kardum M, Haban V. (1999). Inflammatory mediators in saliva of patients with rapidly progressive periodontitis during war stress induced incidence increase. *College of Antropology* 23:117-124.

Aurer A, Jorgic-Srdjak K, Plancak D, Stavljenic-Rukavina A, Aurer-Kozelj J. (2005). Proinflammatory factors in saliva as possible markers for periodontal disease. *Coll. Antropol.* 29(2):435–439.

Badger A, Bradbeer J, Votta B, Lee J, Adams J, Griswold D. (1996). Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther.* 279(3):1453-1461.

Baelum V, Lopez R. (2003). Defining and classifying periodontitis: need for a paradigm shift? *Eur J Oral Sci.* 111: 2–6.

Bainbridge B, Coats S, Darveau R. (2002) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Ann Periodontol.* 7(1):29-37.

Baker P. (2000) The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect.* 2 (10): 1181–1192.

Barnes P y Karin M. (1977). Nuclear factor- κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Eng J Med.* 336:1066-1071.

Bascones A, Noronha S, Gomez M, Mota P, Gonzalez M, Dorrego M. (2005). Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence Int.* 36:299–306.

Bascones-Martinez A, Muñoz-Corcuera M, Noronha S, Mota P, Bascones-Ilundain C, Campo-Trapero. (2009). Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanism. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 1;14(12)e680-685.

Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Newman (1999). Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10:458–476.

Beinke S y Ley S. (2004). Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J.* 382,393-404.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Kontinen Y. (2007). MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res.* 86(4):347-351.

Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen Y. (2008). Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 23(5):425-431

Beltrán A, Briones A, García-Redondo A, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso M, et al.(2009). p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 27(1):142-154.

Benicky J, Sánchez-Lemus E, Honda M, Pang T, Orecna M, Wang J, et.al. (2011). Angiotensin II AT(1) receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology.* 36:857–870.

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.

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 Caucasians. *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):G414-423.

Bermúdez V, Leal E, Bermudez F, Cano C, Cabrera M, Ambard M, et.al. (2003). Enfermedad periodontal como factor de riesgo para la aterosclerosis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y terapéutica.* V.22.n2.

Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. (2004). Genetic analysis of innate immunity: TIR adapter proteins en innate and adaptive immune responses. *Microbes Infect.* 6:1374-1381.

Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R. (2001). Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 28: 840-847.

Biomarkers Definitions Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69:89-95.

Biri A, Bozkurt N, Gunaydina G, Korucuoglu U, Durakb, I, Kavutcu C. (2007). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in preeclampsia. *Intern. J. of Gynecol. and Obst.* 96: 196–207.

Blaque S y James I. (2003). RANKL (Receptor Activator of NFkB Ligand). En: Thomson AW, Lotze MT. The Cytokine Handbook. Academic Press.

Bluestone, J, Mackay, C, O'Shea, J, Stockinger, B. (2009) The functional plasticity of T cell subsets. Nature Reviews Immunology. 9, 811– 816.

Bondeva T, Roger T, Wolf G. (2007). Differential regulation of Toll-like receptor 4 gene expression in renal cells by angiotensin II: dependency on AP1 and PU.1 transcriptional sites. Am J Nephrol. 27(3):308-14.

Borges I, Machado M, Wilhem D, Bittencourt T, Barreto M y Frode T. (2007) Clinical study. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. Mediators of inflammation. 45794.

Boyce B, Yao Z, Zhang Q, Guo R, Lu Y, Schwarz E, Xing L. (2007). New roles for osteoclasts in bone. Ann NY Acad Sci. 1116: 245-254.

Boyce B, Xing L, Franzoso G, Siebenlist U. (1999). Required and nonessential functions of nuclear factor-kappa B in bone cells. Bone. 25:137-139.

Boyle W, Simonet W, Lacey D. (2003). Osteoclast differentiation and activation. Nature 423:337-342.

Bozkurt F, Berker E, Akkus S, Bulut S. (2000). Relationship between IL-6 levels in gingival crevicular fluid and periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. J Periodontol. 71:1756-1760.

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, et.al. (2011). Fluoxetine Inhibits Inflammatory Response and Bone Loss in a Rat Model of Ligature-Induced Periodontitis. J Periodontol. 83(5):664-671

Brasier A, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge M. (2000). Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem.* 212(1-2):155-169.

Brasier A. (2010). The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 1;86(2):211-8.

Braun y Zwerina J. (2011) Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 13:235 .

Bredt D y Snyder S. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 682-685.

Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Savedra J. (2003). Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285(2):G414-423.

Brennan P, Thomas G, Langdon J. (2003). The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol.* 48 (2): 93-100.

Brilla C, Maisch B, Rupp H, Funck R, Zhou G, Weber KT (1995) Pharmacological modulation of cardiac fibroblast function. *Herz.* 20:127–134.

Brock G, Butterworth C, Matthews J, Chapple I. (2004). Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol.* 31:515-521.

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

Buege J y Aust S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302–310

Buettner G. (2011). Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem.* 1;11(4):341-346.

Bullon P, Cordero M, Quiles J, Morillo J, Ramirez M, Battino M. (2011). Mitochondrial dysfunction promoted by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radic Biol Med*. 50(10):1336-1343.

Burgess T, Quian Y, Kaufman S, Ring B, Van G, Capparelli C, et al. (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 145:527-538.

Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. (2006). Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J Immunol*. 177(12):8296-8300.

Butcher E, Picker L. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60–66

Cairo F, Nieri M, Gori A, Tonelli P, Branchi R, Castellani S, et.al.(2010). Markers of systemic inflammation in periodontal patients: chronic versus aggressive periodontitis. An explorative cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol*. 3(2):147-153.

Canakci C, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. (2009). Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent*. 3(2):100-106.

Cano N, Montoya C. (2001). Las quimioquinas: citoquinas proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular IATREIA/VOL 14/No.1/).

Cao C y Smith Q. (1989). Crevicular fluid myeloperoxidase and periodontitis disease. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*. 24:204-254.

Carlström M, Lai E, Ma Z, Steege A, Patzak A, Eriksson U, et.al. (2010) Superoxide dismutase 1 limits renal microvascular remodeling and attenuates arteriole and blood pressure responses to angiotensin II via modulation of nitric oxide bioavailability. *Hypertension*. 56(5):907-913.

Carrillo A, García A, Bascones A. (2006) Papel de la IL-6 y TNF- α en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol*. 18, 2: 83-89.

Castro C, Koss M, López M. (2003). Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal. *Med Oral*. 8:322-328.

Chan S, Hsu K, Huang C, Wang L, Ou C, Chan J. (2005). NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res*. 97:772-780.

Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, Guan K, Krebsbach P, Wang C. (2009). Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med*. 15:682-689.

Chapple I, Brock G, Eftimiadi C, Matthews J. (2002). Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 55:367–373.

Chapple I, Milward M, Dietrich T. (2007). The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr*. 137: 657- 664.

Chapple I. (1996). The role of the free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal disease. *Mol Pathol*. 49:247-255.

Charbonnier A, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D. (1999). Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 190:1755–1768.

Charon J, Mergenhagen S, Gallini J. (1985). Gingivitis and oral ulceration in patients with neutrophil dysfunction. *J Oral Pathol*. 14:150-155.

Chaudhari A, Byakod G, Waghmare P, Karhadkar V. (2011). Correlation of levels of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract*. 1;12(1):52-59.

Chen G, Sun W. (1999). The investigation on nitric oxide levels in saliva and their relationship with the severity of periodontitis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 17 (2): 140-142.

Chen Y, Currie R. (2006). Small interfering RNA knocks down heat shock factor-1 (HSF-1) and exacerbates pro-inflammatory activation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 69(1):66-75.

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 Z, Vapaatalo H, Mervaala E. (2005). Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit.* 11(6):RA194-205.

Choi E, Hwang Y, Lee J, Choi J, Choi I, Jin J, et.al. (2007). Lipid A- associated proteins from *Porphyromonas gingivalis* stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res.* 42 (4): 350-360.

Christodoulides N, Floriano P, Miller C, Ebersole J, Mohanty S, Dharshan P, et.al. (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, et.al. (2005). Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip.* 5(3):261-269.

Chuang T y Ulevitch R. (2000). Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *European Cytokine Network.* 11(3)372-8.

Clayton N, LeDuc B, Kelly L. (2005). Effect of potassium channel and cytochrome P450 inhibition on transient hypotension and survival during lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in the rat. *Pharmacology.* 73(3):113-120.

Clempus R y Griending K. (2006) Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 71:216 –225.

Cochran D. (2008). Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 79:1569-1576.

Cohen M, Leong P, Simpson D. (1985). Phagocytic cells in periodontal defence. Periodontal status of patients with chronic granulomatous disease of childhood. J Periodontol. 56:611-617.

Cole A y Walters L. (1987) Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold embedding in plastic. J Histochem Cytochem. 35: 203-206.

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.

Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. (2010). Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. J Oral Pathol Med. 39(9):690-396.

Crotti T, Smith M, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et.al. (2003). Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res. 38(4):380-387.

Cury J, Campbell E, Lazarus C, Albin R, Welgus H. (1988). Selective up-regulation of human alveolar macrophage collagenase production by lipopolysaccharide and comparison to collagenase production by fibroblasts. J Immunol. 141:4306–4312.

Daghigh F, Borghaei R, Thornton R, Bee J. (2002). Human Gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. J Periodontol. 73 (4): 392-400.

De Cavanagh E, Ferder M, Inserra F, and Ferder L (2009) Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. Am J Physiol Heart Circ Physiol 296:H550–H558.

De Gasparo M, Catt K, Inagami T, Wright J, Unger T. (2000). The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev. 52:415-472.

De Lima Oliveira A, de Faveri M, Gursky L, Mestnik M, Feres M, Haffajee A, et.al. (2012). Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. J Clin Periodontol. 39(3):295-302.

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

De Sá Siqueira M, Fischer R, da Silva C, Brunini T, Mendes-Ribeiro A. (2010). Nitric oxide and oral diseases: can we talk about it? Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 8(2):104-112. Review.

Delima A, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves D.(2001) Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. J Clin Periodontol. 28(3):233-240.

Delima A, Van Dyke T. (2004). Origen y función de los componentes celulares del líquido crevicular gingival. Periodontol 2000. 6:55-76.

Demirer S, Kara M, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H, Ay S. (2012). Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. Arch Oral Biol. 57(1):60-65.

Demmer R, Desvarieux M. (2006). Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart of the matter. J Am Dent Assoc.137:14S–20S.

Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, et.al. (2004). Effects of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rat. J Dent Res. 83 (4): 343-348.

Didion S, Kinzenbaw D, Faraci F. (2005). Critical role for CuZn-superoxide dismutase in preventing angiotensin II-induced endothelial dysfunction. Hypertension. 46:1147–1153.

Dieu M, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J, Oldham E, Aït-Yahia S, et.al. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med.188:373–386.

Doucet P y Lowenstein M. (2006). Activation de l'ostéoclasie par les endotoxines bactériennes au cours des maladies parodontales. Médecine sciences, vol. 22, n° 6-7, p. 614-618.

Droghetti P, Cruzat F, Smith Ferrer P, Oyarzún Droguett A. (2010). Role of MT1-MMP in the Remodeling of the Periodontal Ligament During Tooth Movement. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 3(3); 113-117.

Du N, Feng J, Hu L, Sun X, Sun H, Zhao Y, et.al. (2012). Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling. *Oncol Rep.* 27(6):1893-903.

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. (2000). Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.* 11 (3): 362–371.

Dumitrescu A, Abd El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson L. (2004). A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol.* 31: 596–603.

Dumitrescu A. (2006). Histological comparison of periodontal inflammatory changes in two models of experimental periodontitis in the rat. A pilot study. *TIMISORA Med J.* 56; 211-217.

Egido J y Alcázar R. (1999). «Las quimocinas». En: *Manual de Inflammation*. Ed: Medical and Marketing Communications, S.L. Madrid. pp. 67-83.

Egido J. (1996). Vasoactive hormones and renal sclerosis (*Nephrology Forum*). *Kidney Int.* 49:578-597.

El Bekay R, Alvarez M, Monteseirín J, Alba G, Chacón P, Vega A, et.al.(2003). Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood.* 102(2):662-671.

Ellis S, Tucci M, Serio F, Johnson R. (1998). Factors for progression of periodontal diseases. *Journal Oral Pathology & Medicine.* 27,101 105.

Embery G, Waddington R. (1994). Gingival crevicular fluid: biological markers of periodontal tissue activity. *Adv. Dent. Res.* 8:329-336.

Erdös B, Broxson Ch, King M, Scarpace P, Tümer N. (2006). Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H- oxidase- dependent production of

superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. *Journal of Hypertension*. 24:109-116.

Ertugrul A, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. (2012). Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01500.x.

Esen C, Alkan B, Kirnap M, Akgül O, Işıkoğlu S, Erel O. (2012). The Effects of Chronic Periodontitis and Rheumatoid Arthritis on Serum and Gingival Crevicular Fluid Total Antioxidant/Oxidant Status and Oxidative Stress Index. *J Periodontol*. 83(6):773-779

Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, et.al. (2004). Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 15(6):1514-1529.

Evans K, y Fox S: (2007). Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol* 8:4.

Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy T, Ackert-Bicknell C, Hart C, Rosen C, Nanes M, Rubin J. (2004). Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*. 145 (2):751-759.

Fang L, Chen M, Xiao Z, Yu G, Chen X, Xie X. (2011). The effect of endothelial progenitor cells on angiotensin II-induced proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 58(6):617-625.

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*. 2:19 –24.

Figueredo C, Rescala B, Teles R, Teles F, Fischer R, Haffajee A, et.al. (2008) Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 23, 173-176.

Figueredo C, Ribeiro M, Fischer R, Gustafsson A. (1999). Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol*. 70: 1457-1463.

Finocchietto P, Franco M, Holod S, Gonzalez A, Converso D, Antico Arciuch V, Serra M, Poderoso J, Carreras M. (2009). Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Exp Biol Med*. 234:1020-1028

Fleisch H. (1997). Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann. Med*. 29: 55–62.

Flohé L, Günzler W. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105:114-121.

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.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 64:97–112.

Friedland J, Setton C, Silverstein E. (1977). Angiotensin converting enzyme: induction by steroids in rabbit alveolar macrophages in culture. *Science*. 1;197(4298):64-65.

Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. (2005). IL-1-induced receptor activator of NF κ B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. *Bone*. 36(2):267–275

FUNDACREDESA. (1987). Estudio sobre Crecimiento y Desarrollo de la Población Venezolana. Proyecto Venezuela. Caracas.

Gaddis D, Michalek S, Katz J. (2009). Requirement of TLR4 and CD14 in dendritic cell activation by Hemagglutinin B from *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Immunol* 46:2493-2504.

Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. (2009). Targeting innate immunity protein kinase signaling in inflammation. *Nature*. 8: 480-499.

Gaffen S y 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.

Gajardo M., Silva N., Gomez L., Leon R., Parra B., Contreras A., Gamonal J. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J. Periodontol*. 76: 289-294.

Galvão M, Chappier A, Rösing C, Ferreira M, de Souza M. (2003). Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras*. 17(1):56-62.

Gamble J, Harlan J, Klebanoff S, and Vadas M. (1985). Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci*. 82:8667-8671.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. 2000 Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 71(10):1535-1545

García B, García J, De la Peña R, García A, Saldaña A, Rodríguez V, et.al. (2005) Efecto de un extracto de *Mangifera indica* L. (Vimang) sobre la enfermedad periodontal por ligadura en perros beagle. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 24(2).

Garcia de Aquino S, Manzolli Leite F, Stach-Machado D, da Silva J, Spolidorio L, Rossa C Jr. (2009). Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci*. 84(21-22):745-754.

Geivelis M, Turner C, Pederson E, Lamberts B. (1993). Measurements of IL-6 in gingival crevicular fluid from patients with destructive periodontal disease. *J Periodontol*. 64:980-983.

Gelani V, Fernandes A, Gasparoto T, Garlet T, Cestari T, Lima H, et.al. (2009). The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Periodontol. 80: 2010-2019.

Gemmell E, Carter C, Seymour J. (2001). Chemokines in human periodontal disease tissues Clin Exp Immunol 125:134-141.

Gemmell E, Marshall R, Seymour G. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000. 14:112–143.

Genco R. (2000). Is periodontitis a risk for general health. J Clin Periodontol. Suppl.1.27:29.

Gerald S y Carranza Jr. (1993). Introducción. Antecedentes históricos de la periodontología. Periodontología Clínica de Glickman, séptima edición. Interamericana McGraw-Hill p. 1-13.

Gerondakis S; Grumont R, Banerjee A. (2007). «Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals». Immunology and Cell Biology 85 (6): pp. 471–475.

Giannopoulou C, Kamma J, Mombelli A.(2003). Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. J Clin Periodontol. 30:145- 153.

Giannopoulou C, Krause K, Muller F. (2008). The NADPH oxidase NOX2 plays a role in periodontal pathologies. Semin Immunopathol. 30:273- 278.

Gibbons G, Pratt R, Dzau V (1992) Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-1 expression determines growth response to angiotensin II. J Clin Invest. 90:456–461.

Girardini S., Hugot J, Sansonetti P. (2003). Lessons from Nod2 studies: towards link between Crohn's disease and bacterial sensing. Trends Immunol. 24:652-658.

Gowen M, Nedwin M, Mundy G. (1986). Preferential inhibition of cytokine-stimulated bone resorption by recombinant interferon gamma. J. Bone Miner. Res. 1:469-474.

Grandvaux N, Soucy-Faulkner A, Fink K: (2007). Innate host defense: Nox and Duox on phox's tail. *Biochimie*. 89:1113-1122.

Grant M, Brock G, Matthews J, Chapple I. (2010). Crevicular fluid glutathione levels in periodontitis and the effect of non-surgical therapy. *J Clin Periodontol*. 37(1):17-23.

Graves D y Cochran D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 74(3): 391-401.

Graves D, Kang J, Andrianakaja O, Wada K, Rossa C Jr. (2012). Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol*. 15:117-132.

Graves D, Oates T, Garlet G. (2011) Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology* 3: 5304

Graves D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 79:1585-1591.

Graves D, Oates T, Garlet G. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 17;3.

Greaves D, Wang W, Dairaghi D, Dieu M, Saint-Vis B, Franz-Bacon K, et.al. (1997). CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med*. 186:837–844.

Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukay M. (2000). NAD(P)H oxidase, role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 86:494-501.

Griendling K. (2004). Novel NAD(P)H oxidase in the cardiovascular system. *Heart*. 90:491-493.

Griendling K. (2006). NADPH Oxidase: New Regulators of Old functions. *Antioxid Redox Signal*. 8(9-10): 1443-1445.

Guan X, Zhou Y, Li J. (2011) Reciprocal Roles of Angiotensin II and Angiotensin II Receptors Blockade (ARB) in Regulating Cbfa1/RANKL via cAMP Signaling Pathway: Possible Mechanism for Hypertension-Related Osteoporosis and Antagonistic Effect of ARB on Hypertension-Related Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 12(7):4206-4213.

Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini A, Calandriello M. (1991). Enhanced superoxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res Commun*. 15(1):11-16.

Guijarro C y Egido J. (2001). Transcription factor- κ B (NF- κ B) and renal disease. *Kidney Int*. 59: 415-424.

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.

Güllu C, Ozmeric G, Tokman B, Elgün S, Balos K. (2005). Effectiveness of scaling and root planning versus modified widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 40 (2): 168-175.

Guo R, Yang L, Li M, Liu B, Wang X. (2006). Angiotensin II induces NF- κ B activation in HUVEC via the p38MAPK pathway. *Peptides*. 27(12):3269-3275.

Guo Z, Wang S, Xu M, Jiao Q, Gao F. (2009). Protective effects of rhu TNFR: Fc against the lipopolysaccharide induced intestinal damage of rats and its underlying mechanism]. *Yao Xue Xue Bao*. 44(6):586-590.

Gustafsson A y Asman B. (1996). Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta- receptor stimulation. *J. Clin. Periodontol*. 23:38-44.

Guzik T, West N, Black E, McDonal D, Ratnatunga C, Pillai R, et.al. (2000). Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 86: E85-E90.

Haba D, Teslaru S, Ungureanu D, Hodorog D, Alecu C, Benghiac A, et.al. (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.

Haddad J. (2002). Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor- κ B. *Crit Care*. 6(6):481-490.

Halleivi H, Hazan-Halevy I, Paran E. (2007). Modification of neutrophil adhesion to human endothelial cell line in acute ischemic stroke by dipyridamole and candesartan. *Eur. J. Neurol*. 14:1002–1007.

Halliwell B y Gutteridge J. (1990). Role of the free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.

Halliwell B. (1991). Electron transfer. Switches in enzymes. *Nature.* 21;354(6350):191-192.

Hamed M, Belibasakis G, Cruchley A, Rangarajan M, Curtis M, Bostanci N. (2009). *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants differentially regulate interleukin-1 β and interleukin-18 in human monocytic cells. *Cytokine.* 45(2):99-104.

Hatton R, Stimpel M, Chambers T. (1997). Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol.* 1997 Jan;152(1):5-10.

Harokopakis E, Hajishengallis G. (2005). Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur J Immunol.* 35:1201-1210.

Harrison D. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 100: 2153-2157.

Hart T y Kornman K. (1997). Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 14:202–215.

Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, et.al. (2006). RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J.* 20(2):401-403.

Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. (2003). Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol.* 18(1):14-23.

Hattori H, Subramanian K, Sakai J, Luo H. (2010). Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Commun Integr Biol.* 3(3):278-281.

Hayden M y Ghosh S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26(3):203-234.

Hayes J, Havaleshko D, Plachinta R, Rich G. (2004). Isoflurane pretreatment supports hemodynamics and leukocyte rolling velocities in rat mesentery during lipopolysaccharide-induced inflammation. *Anesth Analg*. 98(4):999-1006.

Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, et.al. (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.

Herr A, Hatch A, Throckmorton D, Tran H, Brennan J, Giannobile W, Singh A. (2007). Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proc Natl Acad Sci*. 104:5268–5273.

Hill P y Orth M. (1998). Bone remodeling. *Brit J Orthod*. 25:101-107.

Hiromichi 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.

Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. (2001). Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol*. 72 (5): 590–597.

Hofbauer L yHeufelder A. (2001). Role of receptor activator of nuclear factor-kB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*. 79:243-253.

Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et.al. (2008). Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta*. 395(1-2):137-141.

Horwood N, Elliott J, Martin T, Gillespie M. (2001). IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro. *J Immunol*. 166:4915-4921.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Murakami K, Miyake Y, et.al. (2005). CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clin Exp Immunol*. 141(3): 467–474.

Hosokawa Y, Nakanishi T, 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(3): 548–554.

Ilieva I, Ohgami K, Jin X, Susuki Y, Shiratori K, Yoshida K, et.al. (2006). Captopril suppresses inflammation in endotoxin-induced uveitis in rats. Experimental Eye Research. 83; 651-657.

Infante-Duarte C, Horton H, Byrne M, Kamradt T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. J Immunol. 1;165(11):6107-6115.

Irwin C, Myrillas T. (1998). The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. Oral Dis. 4:43-47.

Ishimi Y, Miyaura C, Jin C, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et.al. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. Journal of Immunology. 145:3297-3303.

Ito H, Takemori K, Suzuki T. (2001). Role of angiotensin II type 1 receptor in the leukocytes and endothelial cells of brain microvessels in the pathogenesis of hypertensive cerebral injury. J Hypertens. 19:591-597.

Ito H., Honda T., Domon H., Oda T., Okui T., Amanuma R., et.al. (2005). Gene expression analysis of the CD41 Tcell clones derived from gingival tissues of periodontitis patients. Oral Microbiology and Immunology. 20, 382–386.

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.

Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, et.al. (2009). Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. J Biol Chem. 284(8):4857-4864.

Jablonska E, Izycka A, Wawrusiewicz N. (2002). Effect of IL-18 on IL-1 β and sIL-1RII production by human neutrophils. Arch Immunol Ther Exp. (warsz) 50, 139-141.

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.

Jing L, Wu Q, Wang F. (2007). Glutamine induces heat-shock protein and protects against *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in rats. *Crit Care*. 11(2):R34.

Johnson R, Wood N, Serio F. (2004). Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 75:37–43.

Johnson R, Serio F. (2005). Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 76(5):785-790

Jonassen T, Graebe M, Promeneur D, Nielsen S, Christensen S, Olsen N. (2002). Lipopolysaccharide-induced acute renal failure in conscious rats: effects of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*. 303(1):364-374.

Jotwani R, Moonga B, Gupta S, Cutler C. (2010). Nuclear factor-kappaB p50 subunits in chronic periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1192:278-285.

Jung K, Chu K, Lee S, Kim S, Song E, Kim E, Park D, Sinn D, Kim J, Kim M, Roh J. (2007). Blockade of AT1 receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 322:1051–1058.

Kamma J, Giannopoulou C, Vasdekis V, Mombelli A. (2004). Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol*. 31(10):894-902.

Kaneko K, Ito M, Fumoto T, Fukuhara R, Ishida J, Fukamizu A, et.al. (2011). Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 26(12):2959-2966.

Kang Y, Ma Y, Zheng J, Elks C, Sriramula S, Yang Z, (2009). Francis J. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res.* 82(3):503-512.

Kawai T, Akira S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 17,338-344.

Keles G, Acikgoz G, Ayas B, Sakallioglu E, Firatli E. (2005). Determination of systemically and locally induced periodontal defects in rats. *Indian J Med Res.* 121(3):176-184.

Kendall H, Haase H, Li H, Xiao Y, Bartold P. (2000). Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 35 (4):194-200.

Kendall H, Marshall R, Bartold P. (2001). Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis.* 7(1): 2-10.

Key L, Wolf W, Gundberg C, Ries W. (1994). Superoxide and bone resorption. *Bone.* 15(4):431-436.

Khalili J, Biloklytsa H. (2008). Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Dis.* 14(8):754-760.

Khosla S. (2001). The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 142:5050-5055.

Kim J, Heo H, Ha Y, Ye B, Lee E, Choi Y, et.al. (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, et.al. (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.

Kim S, Ha M, Choi E, Choi J, Choi I. (2004). Prevotella intermedia lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res.* 39 (6): 424-431.

Kirkwood K, Li F, Rogers J, Otremba J, Coatney D, Kreider J, et.al. (2007). p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther.* 320(1):56-63.

Kitaura H, Tatamiya M, Nagata N, Fujimura Y, Eguchi T, Yoshida N, Nakayama K. (2006). IL-18 induces apoptosis of adherent bone marrow cells in TNF-alpha mediated osteoclast formation in synergy with IL-12. *Immunol Lett.* 15;107(1):22-31.

Kobori H, Nangaku M, Navar L, Nishiyama A. (2007). The intrarenal reninangiotensin system: from physiology to the pathophysiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59:251–287.

Konermann A, Beyer M, Deschner J, Allam J, Novak N, Winter J, et.al. (2012). Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. *Cell Immunol.* 272(2):137-143.

Kong Y, Boyle W, Penninger J. (2000). Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunology Today.* 21: 495- 502.

Kong Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Moroni S, et.al. (1999a). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 402: 304-309.

Kong Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H, Timms E, Capparelli C, et.al. (1999b). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 397: 315-323.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et.al. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 103, 1345-1352.

Kramer J, y Gaffen S. (2007). Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol.* 78(6):1083-1093. Review.

Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. (1999). Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:826–828.

Krejcy K, Eichler H, Jilka B. (1996). Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. *Can J Physiol. Pharmacol.* 74: 9-14.

Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kagami S, Izawa Y, Fujita Y, et.al. (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.* 65:832– 841.

Lacey D , Timms E, Tan H, Kelley M, Dunstan C, Burgess T, et.al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93:165-176.

Lafati J. (2003). Fisiologia y fisiopatología ósea. *Anales Sis San Navarra* Vol. 26, supl.3.

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 G, Raisz M, Gideon A, Roldan M. (2001). Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin N Am* 32;15-24

Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a001651.

Lee H, Kang I, Chung C, Choi S. (1995). The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 22:885- 890.

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: 74–81.

Leitao R, Ribeiro R, Chavez H, Rocha F, Lima V, Brito G. (2005). Nitric Oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology.* 76, 956-963.

Lerner, U. H. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 19:107

Leung P. (2004). The peptide hormone angiotensin II: Its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci.* 5:267-273.

Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta J. (2000). Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation.* 102(16):1970-1976.

Li H, Yin H, Zhang H, Cao X, Wang Z, She M. (2002) Effect of NF-kappaB on the induction of PDGF-B transcription by angiotensin II in the ECV304 cell line. *Chin Med J (Engl).* 115(3):433-438.

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.

Li X, Meng Y, Wu P, Zhang Z, Yang X. (2007). Angiotensin II and Aldosterone stimulating NF-kappaB and AP-1 activation in hepatic fibrosis of rat. *Regul Pept.* 138(1):15-25.

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 alpha. *J Immunol.* 162:186–194.

Lim H, New L, Han J, Molkentin J. (2001). Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 276(19):15913-15919.

Lima H, Gelani V, Fernandes A, Gasparoto T, Torres S, et.al. (2010). The essential role of TLR4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *J Clin Periodontol.* 37: 248-254.

Lima V, Bezerra M, Alencar V, Vidal F, Rocha F, Brito G, et.al. (2000). Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci.* 108: 123-129.

Lima V, Vidal F, Rocha F, Brito G, Ribeiro R. (2004). Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *Journal Periodontal Research*. 75, 162-168.

Linden G, McClean K, Woodside J, Patterson C, Evans A, Young I, et.al. (2009). Antioxidants and periodontitis in 60-70-year-old men. *J Clin Periodontol*. 36(10):843-849.

Linden G, McClean K, Young I, Evans A, Kee F. (2008). Persistently raised C-reactive protein levels are associated with advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 35(9):741-747.

Lindhe J y Karring T. (2000). Anatomía del periodonto. En: Lindhe J. editor. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 3era Edición. 19-68.

Liu D, Xu J, Figliomeni L, Huang L, Pavlos N, Rogers M, et.al. (2003). Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*. 11(1):17-21.

Liu H, Wei X, Sun R, Cai Y, Lou H, Wang J, et.al. (2006) Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 via an AT1 receptor/nuclear factor-kappaB pathway in brain microvascular endothelial cells. *Life Sci*. 78(12):1293-1298.

Liu L, Qiu H, Yang Y, Wang L, Ding H, Li H. (2009). Losartan, an antagonist of AT1 receptor for angiotensin II, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat. *Arch Biochem Biophys*. 481(1):131-136.

Locksley R, Killeen N, Lenardo M. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104:487-491.

Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, et.al. (1998). Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 123, 353-360.

Lowry H, Rosebrough N, Farr A, Randall R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.

Lu Q y Jin L. (2010). Human gingiva is another site of C-reactive protein formation. *J Clin Periodontol*. 37(9):789–796.

Lundeland B, Gundersen Y, Opstad P, Thrane I, Zhang Y, Olaussen R, et.al. (2012). One week of multifactorial high-stress military ranger training affects Gram-negative signalling. *Scand J Clin Lab Invest*. [Epub ahead of print].

Lundergan W, Ferry D, Kobayashi H, Snowdowne K. (1999). Angiotensin-II increases cytoplasmic calcium, cell number and total DNA for human periodontal ligamental cells *in vitro*. *J Periodontal Res*. 34(4):223-228.

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.

Lynn H, Kwok T, Wong S, Woo J, Leung P. (2006). Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese. *Bone*. 38, 584–588.

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.

Magnusson M y Mosher D. (1998). Fibronectin. Structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 18:1363-1370.

Malamud D, Bau H, Niedbala S, Corstjens P. (2005). Point detection of pathogens in oral samples. *Adv Dent Res*. 18:12–16.

Manabe S, Okura T, Watanabe S, Fukuoka T, Higaki J. (2005). Effects of angiotensin II receptor blockade with valsartan on pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 46(6):735-739.

Manolagas S y Jilka B. (1995). Bone Marrow, cytokines and bone remodelling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*. 332 (5): 305-311.

Manukhina E., Downey H., Mallet R. (2006). Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Adaptation to Intermittent Hypoxia. *Exp Biol Med* 231:343–365.

Marsh P y Martin M. (2000). *Oral Microbiology*. Fourth edition. Wright. England.

Martinez J. (2008). Papel de las células, citoquinas, factor de necrosis tumoral (TNF), RANK y RANKL en la enfermedad periodontal. *Revista Europea de Odontostomatología*. REDOE.

Mashayekhi F, Aghahoseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. (2005) Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J Contemp Dent Pract*. 6:46-53

Matejka M, Partyka L, Ulm C, Olar P, Sinzinger H. (1998). Nitric oxide synthesis is increased in periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 33 (8): 517-518.

Matera G, Muto V, Vinci M, Zicca E, Abdollahi-Roodsaz S, van de Veerdonk F, et.al. (2009) Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. *Clin Vaccine Immunol*. 16(12):1804-1809.

Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et.al. (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol*. 6(6):587-592.

McCord J, Fridovich I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 243:5753–5760.

McCord J, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem*. 244:6049–6055.

Medicherla S, Ma J, Mangadu R, Jiang Y, Zhao J, Almirez R, et.al. (2006). A selective p38 α mitogen-activated protein kinase inhibitor reverses cartilage and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 318(1):132–141.

Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449(7164):819-826.

Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E.(2000). p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279(2):H741-51.

Menezes A, Rocha F, Chaves H, Carvalho C, Ribeiro R, Brito G. (2005) Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal Periodontal Research*. 76, 1909-1919.

Metha P y Griendling K. (2006). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol*. 292:C82-C97.

Miller C, Foley J, Bailey A, Campbell C, Humphries R, Christodoulides N, et.al. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*. 4:1–18.

Miller C, King C, Langub M, Kryscio R, Thomas M. (2006). Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J. Am. Dent. Assoc*. 137(3):322–329.

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.

Mitra A, Gao L, Zucker I. (2010). Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression: sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*. 299(3):C561-599.

Miyasaki K. (1991). The neutrophils: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J. Periodontol.*; 62: 761-774.

Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. (2004). Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 83: 166-169.

Mohamed S, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz H, et.al. (2007). Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone*. 41:592-602.

Mollnau H, Wendt M, Szöca K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, et.al. (2002). Effects of Angiotensin II Infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxidase/cGMP signaling. *Circ Res*. 90:e58-e65.

Moncada S, Palmer R, Higgs E. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev*. 43:109–142.

Moreno J, Kaczmarek M, Keegan A, Tondravi M. (2003). IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood*. 102(3):1078-1086.

Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y. (2003). Immunohistochemical localization of toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbial Immunol*. 18:54-68.

Mundy G. (1991) Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res*. 26:213-217.

Muñoz M, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca J, Mosquera J. (2011). Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 12(4):404-12.

Murayama R, Kobayashi M, Takeshita A, Yasui T, Yamamoto M. (2011) MAPKs, activator protein-1 and nuclear factor- κ B mediate production of interleukin-1 β -stimulated cytokines, prostaglandin E₂ and MMP-1 in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 46(5):568-75

Murphy, K. y Stockinger, B. (2010) Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature Immunology*. 11, 674–680.

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.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H (2001) Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 53-72.

Nakano Y, Watanabe K, Morimoto I, Okada Y, Ura K, Sato K, et.al.(1994). Interleukin-4 inhibits spontaneous and parathyroid hormone-related protein-stimulated osteoclast formation in mice. *J Bone Miner Res.* 9(10):1533-1539.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et.al. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(3):768-775.

Napimoga M, Nunes L, Maciel A, Demasi A, Benatti B, Santos V, et.al. (2011) Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects. *Scand J Immunol.* 74(6):596-602.

Nguyen D y Martin J. (2008). Common dental infections in the primary care setting. **Am Fam Physician.** 77(6):797-802.

Novack D. (2011). Role of NF-kB in the skeleton. *Cell Res.* 21: 169–182.

Novak M y Donley T. (2002). Using host response modifiers in the treatment of periodontal disease. *Pract Proced Aesthet Dent.* 14(9):suppl 3-10.

Oberley L y Spitz D. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth.Enzymol.* 105:457-464.

Ocasio F, Jiang Y, House S, Chang S. (2004). Chronic morphine accelerates the progression of lipopolysaccharide-induced sepsis to septic shock. *J Neuroimmunol.* 149(1-2):90-100.

Oda T, Yoshie H, Yamazaki K (2003) Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kB ligand in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 18, 30-36.

Ohtsu H, Mifune M, Frank G, Saito S, Inagami T, Kim-Mitsuyama S, et al. (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.* 25:1831–1836.

Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, et.al. (2004). Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 137(3):281-289.

Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, et.al. (2009). The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* 88(7):633-638.

Oikawa A, Okamatsu Y, Shinki T, Kamijo R, Yamamoto M, Hasegawa K. (2007). Mitogen-activated protein kinases mediate interleukin-1 β -induced receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research.* 42(4):367-376.

Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, et.al. (2004). *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun.* 72(3):1706–1714.

O'Neill L y Dinarello C. (2000). The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today.* 21(5):206-209.

O'Neill L. (2002). Signal transduction pathways activated by the IL-1receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol.* 270:47-61.

Orcel P, Feuga M, Bielakoff J, De Vernejoul M. (1993). Local bone injections of LPS and M-CSF increase bone resorption by different pathways in vivo in rats. *Am. J. Physiol.* 264: E391–E397.

Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour G. (2006) Interleukin-1 β , interleukin 12 and interleukin-18 levels in gingival crevicular fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 21, 256-260.

Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour G. (2007). Interleukin 18 and periodontal disease. *J Dent Res.* 86(7):586-593. Review.

Oztürk A y Yildiz L. (2011). Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 1 and toll-like receptor 4 in aggressive periodontitis and in chronic periodontitis. J Periodontal Res. 46(4):475-482

Page R, Offenbacher S, Schröder H, Seymour G, Kornman K. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000. 14:216–248.

Page R, Offenbacher S, Schroeder H. (2000). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontology. 14:216-248.

Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et.al. (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.

Pan L, Li Y, Jia L, Qin Y, Qi G, Cheng J, et.al. (2012). Cathepsin S deficiency results in abnormal accumulation of autophagosomes in macrophages and enhances Ang II-induced cardiac inflammation. PLoS One. 7(4):e35315.

Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran C. (2005) Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. Cellular and Molecular Biology Letters. 10, 255 264.

Paraskevas S, Huizinga J, Loos B. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. J Clin Periodontol. 35(4):277–290

Park H, Jung H, Park E, Kim J, Lee W, Bae Y. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. J Immunol. 173:3589–3593.

Park-Min K, Ji J, Antoniv T, Reid A, Silver R, Humphrey M, et.al. (2009) IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling

during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *J Immunol.* 183:2444-2455.

Patil C, Rossa C, Kirkwood K. (2006). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiology and Immunology.* 21(6):392–398.

Patil C, Zhu X, Rossa C, Kim Y, Kirkwood K. (2004). p38 MAPK regulates IL-1 β induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunological Investigations.* 33(2):213–233.

Pattacini L, Casali B, Boiardi L, Pipitone N, Albertazzi L, Salvarani C. (2007). Angiotensin II protects fibroblast-like synoviocytes from apoptosis via the AT1-NF-kappaB pathway. *Rheumatology (Oxford).* 46(8):1252-1257.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86:747-803.

Pavlatou M, Mastorakos G, Margeli A, Kouskouni E, Tentolouris N, Katsilambros N, et.al. (2011). Angiotensin blockade in diabetic patients decreases insulin resistance-associated low-grade inflammation. *Eur J Clin Invest.* 41(6):652-658.

Peeters A, Netea M, Kullberg B, Thien T, Van der Meer J. (1998). The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. *Immunology.* 94:376-379.

Pepys M, Hirschfield G. (2003). C reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111(12):1805-1812.

Pérez-Díaz I, Hiriart M, Olivares-Reyes J, Robles-Díaz G. (2006). Receptores para la Angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2 características y su papel en el funcionamiento celular. *REB.* 25(2):55-60.

Phillips M y Kagiya S. (2002). Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Current Opinion in Investigational Drugs.* Vol 4. No.4 569-577.

Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz A, Esplugues J, et.al. (2000). Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT1 and AT2 receptor-mediated P-selectin unregulation. *Circulation*. 102: 2118-2123.

Pitaru S, Soldinger M, Madgar D, Metzger Z. (1987). Bacterial endotoxin inhibits migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts in vitro and delays collagen gel contraction. *J Dent Res*. 66:1449–1455.

Pradeep A, Hadge P, Chowdhry S, Patel S, HappyD. (2009). Exploring the role of Th1 cytokines: interleukin-17 and interleukin-18 in periodontal health and disease. *J Oral Sci*. 51(2):261-266.

Pradeep A, Roopa Y, Swati P. (2008). Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 43(6):712-716.

Prego E, Balboa J, Ela C, Miranda E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Rev Cub. Invest. Biomed*. 16(1):10-15.

Preshaw P yTaylor 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.

Price A, Lockhart J, Ferrell W, Gsell W, McLean S, Strurrock R. (2007). Angiotensin II type 1 receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. Vol. 56 no. 2 pp. 441-447.

Quan N, Banks W. (2007). Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*. 21(6):727-735.

Qvarnstrom M, Janket S, Jones J, Jethwani K, Nuutinen P, Garcia R, et.al. (2010). Association of salivary lysozyme and C-reactive protein with metabolic syndrome, *J Clin Periodontol*. 37(9):805–811.

Raetz C y Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 71: 635-700.

Rakugi H, Wang D, Dzau V, Pratt R. (1994) Potential importance of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition in preventing neointima formation. *Circulation*. 90:449-455.

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.

Ramamurthy N, Vernillo A, Lee H, Golub L, Rifkin B. (1990). The effect of tetracyclines on collagenase activity in UMR 106-01 rat osteoblastic osteosarcoma cells. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 70:323-335.

Rasmussen L, Hanstrom L, Lerner U. (2000). Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 27: 41-52.

Reddi D, Brown S, Belibasakis G. (2011). *Porphyromonas gingivalis* induces RANKL in bone marrow stromal cells: involvement of the p38 MAPK. *Microb Pathog.* 51(6):415-420.

Reher V, Zenóbio E, Costa F, Reher P, Soares R. (2007). Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *J Oral Sc.* 49 (4): 271-276.

Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. (2003). Airway epithelial cells release MIP-3 α / CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28:648–654.

Reilly C, Tewksbury D, Schechter N, Travis J. (1982). Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem.* 257(15):8619-8622.

Reinhardt R, Masada M, Kaldahl W, DuBois L, Kornman K, Choi J, et.al. (1993). Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 20(3):225-231.

Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. (2006). Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens.* 24(3):581-589.

Repeke C, Ferreira S, Vieira A, Silveira E, Avila-Campos M, da Silva J, et.al. (2011). Dose-response met-RANTES treatment of experimental periodontitis: a narrow edge between the disease severity attenuation and infection control. *PLoS One.* 6(7):e22526.

Revel M. (1989). Host defense against infections and inflammations: role of the multifunctional IL-6/IFN- β 2 cytokine. *Experientia.* 45:549-557.

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.

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.

Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Sanchez-López E, Plaza J, et.al. (2005). Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 97(2):125-34.

Rogers J, Li F, Coatney D, Rossa C, Bronson P, Krieder J, et.al. (2007) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 78(3):550-558.

Ross G, Boyce B, Oreffo R, Bonewald L, Poser J, Mundy G. (1990). Oxygen-derived free radicals stimuli osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 85: 632-639.

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 C, Jr., Min L, Bronson P, Kirkwood K. (2007). Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. *Journal of Endotoxin Research*. 13(2):85–93.

Rossa C, Liu M, Kirkwood K (2008). A dominant function of p38 Mitogen Activated Protein Kinase signaling in Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand expression and osteoclastogenesis induction by *A.actinomycetemcomitans* and *E. coli* LPS. *J Periodontal Res*. 43(2): 201–211.

Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. (2000). Angiotensin II induces nuclear factor- κ B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 32(10):1767-1778.

Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez- Vita J, Carvajal G. et.al. (2006). Renal and vascular hypertension induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15:159-166.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. (2000). Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int.* 57(6):2285-2298.

Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez- López E, Carvajal G, et al. (2006a) Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21:16-20.

Ruiz-Ortega R, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J: (2001). Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10: 321-329.

Sadoshima J y Izumo S (1993) Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73:413–423.

Salzet M, Deloffre L, Breton C, Vieau D, Schoofs L. (2001). The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 35-45.

Sánchez N, Rodriguez A, Solorzano E, Quiñonez B. (2010) Efecto del óxido nítrico en la periodontitis. *Revista Odontológica de los Andes.* 5:55-66.

Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Larrayoz I, Zhou J, Baliova M, et.al. (2009a). Angiotensin II AT1 blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296(5):R1376-1384.

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, et.al. (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, et.al. (2009) Characterization of a local Renin-Angiotensin System in rat gingival tissue. *Journal of Periodontology.* 80, 130-139.

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.

Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Inoue N, Fujita F, Nakanishi M. (2005). Cutting edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174:27-30.

Sato E, Choudhury T, Nishikawa T, Inoue M. (2008). Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. *J Clin Biochem Nutr.* 42: 8-13.

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.

Scheres N, Laine M, Sipos P, Bosch-Tijhof C, Crielaard W, de Vries T, et.al. (2011). Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 46(4):407-416.

Schutysse E, Struyf S, Van Damme J. (2003). The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:409–426.

Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson C, et.al. (1997). Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest.* 100:439–448.

Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiya H, Furuyama S. (2003). Angiotensin II induces prostaglandin E(2) release in human gingival fibroblasts. *Life Sci.* 3;72(7):795-803.

Sezer U, Kara M, Erciyas K, Ozdemir H, Ustün K, Ozer H, et.al. (2012). Protective effects of ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand.* Jan 16. [Epub ahead of print]

Shaddox L, Wiedey J, Calderon N, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell J, et.al.. (2011). Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 90(9):1140-1144.

Shang L, Sanyal S, Pfahnl A, Jiao Z, Allen J, Liu H, Dudley S Jr. (2008). NF-kappaB-dependent transcriptional regulation of the cardiac *scn5a* sodium channel by angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294(1):C372-C379.

Shapira L, Borinski R, Sela M, Soskolne A. (1991). Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 18:44-48.

Shimada K y Yakazi Y. (1978). Binding sites for angiotensin II in human mononuclear leucocytes. *J Biochem.* 84:1013-1015.

Shimizu H, Nakagami H, Morita S, Tsukamoto I, Osako M, Nakagami F, et.al. (2009). New treatment of periodontal diseases by using NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides via prevention of bone resorption and promotion of wound healing. *Antioxid Redox Signal.* 11(9):2065-75.

Shimizu H, Nakagami H, Osako M, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, et.al. (2008). Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J.* 22(7):2465-2475.

Shimizu H, Nakagami H, Osako M, Nakagami F, Kunugiza Y, Tomita T, et.al. (2009). Prevention of osteoporosis by angiotensin-converting enzyme inhibitor in spontaneous hypertensive rats. *Hypertens Res.* 32(9):786-790.

Shishido T, Konta T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Takasaki S, et.al. (2011). Suppressive effects of valsartan on microalbuminuria and CRP in patients with metabolic syndrome (Val-Mets). *Clin Exp Hypertens.* 33(2):117-123.

Siqueira J y Rôças I. (2007). Bacterial pathogenesis of apical periodontitis. *Braz Dent J.* 18(4): 267-280 267.

Sironi L, Gelosa P, Guerrini U, Banfi C, Crippa V, Brioschi M, et.al. (2004). Anti-inflammatory effects of AT1 receptor blockade provide end-organ protection in stroke-prone rats independently from blood pressure fall. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 311:989–995.

Skučaitė N, Pečiulienė V, Mačiulskienė V. (2009). Microbial infection and its control in cases of symptomatic apical periodontitis: a review. *Medicina (Kaunas).* 45(5)343-350.

Skurk T, van Harmelen V, Hauner H. (2004). Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(7):1199-1203.

Smith M, Braswell L, Collins J, Boyd D, Jeffcoat M, Reddy M, et.al. (1993) Changes in Inflammatory Mediators in Experimental Periodontitis in the Rhesus Monkey. *Infection and immunity*. 61, 1453-1459.

Socransky S, Haffajee A. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current Concepts. *J Periodontol*. 36: 322-331.

Sodek J y McKee M. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol*. 24: 99-126.

Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus R, Szöcs K, Sorescu G, et.al. (2002). Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 105(12):1429-1435.

Souza P, Fukada S, Cunha F, Costa C, Costa C. (2007). Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regulatory Peptides*. 140;27-31.

Souza P, Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hånström L, Souza J, et.al. (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, Ficarelli 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.

Suda T., Takahashi N, Udagawa N, Jimi E., Gillespie M, Martin T. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev*. 20:345-357.

Sumners C, Fleegal M, Zhu M. (2002). Angiotensin AT-1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29:483-490.

Sun C, Sellers K, Sumners C, Raizada M. (2005). NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res*. 96:659-666.

Sun Y, Shu R, Lun Li C, Zhu 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. 81:1488-1496.

Suzuki J, Bayna E, Li H, Molle E, Lew W. (2007). Lipopolysaccharide activates calcineurin in ventricular myocytes. J Am Coll Cardiol. 49(4):491-499.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C, Tomino Y, Egido J. (2003a). Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? Nephrol Dial Transplant. 18(8):1423-1426. Review.

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.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et.al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci USA. 101(10):3516-3521.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane D, Kitetsu S. (2005). The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. J Clin Periodontol. 32:369–374.

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.

Takahashi N, Udagawa N, Suda T. (1999). A new member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/ TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun. 256: 449-455.

Tang L, Zhou X, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Huang DM (2011).TNF receptor-associated factor 6 suppression inhibits inflammatory response to Porphyromonas gingivalis in human periodontal ligament cells. Quintessence Int. 42(9):787-96.

Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley M, Pfahnl C, et.al. (2004). Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol. 287(2):C494-C509.

Taubman M y Kawai T. (2001). Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med. 12: 125-135.

Taubman M, Valverde P, Han X, Kawai T. (2005). Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*. Vol. 76, No. 11-s, Pages 2033-2041.

Taylor G, Manz M, Borgnakke W. (2004). Diabetes, periodontal diseases, dental caries, and tooth loss: a review of the literature. *Compend Contin Educ Dent*. 25:179–84,186-190.

Teitelbaum, S. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289:1501.

Téllez, N, Aguilera N, Quiñónez, B, Silva, E, González LE, Hernández L. (2008). Arginine and glutamate levels in the gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis. *Braz Dent J*. 19 (4): 318-322.

Teng Y, Nguyen H, Cao X, Kong Y, Gorczynski R, Singh B, et.al. (2000). Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest*. 106: 59-67.

Teng Y. (2006a) Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1- Innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res*. 85(3): 198-208.

Teng Y. (2006b) Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 2- T cell-mediated immunity in the periodontium. *J Dent Res*. 85 (3): 209-219.

The American Academy of Periodontology. (2001). Glossary of periodontal terms, 4th edn. Chicago: The American Academy of Periodontology. 1–53.

Thompson D, Pepys M, Wood S. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 7 (2):pp.169–177.

Tipton D, Gay D, DeCoster V. (2007). Effect of a cyclooxygenase-2 inhibitor on interleukin-1 β -stimulated activation of the transcription factor nuclear factor-kappa B in human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 78(3):542-549.

Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, et.al. (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 80(11):1799-1808.

Touyz R y Schiffrin E. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacolog Rev.* 52:639-672.

Touyz R (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 37:1263–1273.

Trinchieri G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3(2):133-146.

Trindade S, Olczak T, Gomes-Filho I, Moura-Costa L, Cerqueira E, Galdino-Neto M, et.al. (2012). Induction of interleukin (IL)-1 β , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodontal Res.* 47(1):27-32.

Tsai C, Chen H, Ho Y, Ho K, Wu Y, Hou L. (2003). Periodontopathogens and oxidative stress in periodontal diseases. Paper 0595, 81st General Session of International Association for Dental Research 25-28.

Tsan M y Gao B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leu Koc Bio.* 76: 514-519.

Tsai I, Tsai C, Ho Y, Ho K, Wu Y, Hung C. (2005). Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine.* 31(1):34-40.

Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirono Y, Tateno T, Sugiyama T, Hirata Y. (2006). Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in rat preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291(4):E771-E778.

Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. (2009). Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 80(6):969-976.

Uehara A, Sugawaea S, Takadan H. (2002). Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in responses to lipopolisaccharides, lipoteichoic acids and peptidic acids. *J Med Microbiol.* 51:626-634.

Undeerhill D, Ozinsky A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol.* 14:103-110.

van Beelen A, Zelinkova Z, Taanman-Kueter E, Muller F, Hommes D, Zaat S, et.al. (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 y Dave S. (2005). Risk Factors for Periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 7(1): 3–7.

Van Dyke T. (2008). The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol*. 79(8 Suppl):1601-1608.

Vardar S, Buduneli E, Turkoglu O, Berdeli A, Baylas H, Baskessen A, et.al. (2004) Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 75, 1640 1646.

Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela M, Gamonal J. (2004). Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J. Periodontol*. 75: 1592-1597.

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.

Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. (2006). The CNS rennin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*. 326 (2):599-616.

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.

Watford W, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14(5):361-368.

Wang P y Ohura K. (2002). *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblast-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13(2):132-142.

Wang X y Quinn P. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in lipid research*. 49(2):97-107.

Wassmann S, Czech T, Van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenning G. (2004). Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation*. 110;3062-3067.

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.

Weber H, Taylor D, Molloy C. (1994). Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest*. 93:788–798.

Wei D, Zhang X, Wang Y, Yang C, Chen G. (2010). Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J*. 55(1):70-78.

Wei S, Wang M, Teitelbaum S, Ross F. (2002). Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*. 277:6622-6630.

Wei-Guo Z, Hui Y, Shan L, Yun Z, Wen-cheng N, Fu-lin Y, et.al. (2010). PPAR-gamma agonist inhibits Ang II-induced activation of dendritic cells via the MAPK and NF-kappaB pathways. *Immunol Cell Biol*. 88(3):305-312.

Weiss D, Sorescu D, Taylor W (2001) Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 87:25C–32C.

Wilton J, Bampton J, Griffiths G, Curtis M, Life J, Johnson N, et.al. (1992). Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *J Clin Periodontol*. 19(1):53-7.

Wiswedel I. (2009). (2)-isoprostanes: sensitive biomarkers of oxidative stress in vitro and in vivo: a gas chromatography-mass spectrometric approach. *Methods Mol Biol*. 580:3-16

Wolf G, Bohlender J, Bondeva T, Roger T, Thaïss F, Wenzel U. (2006). Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 17(6):1585-1593.

Wolf G, Wenzel U, Burns K, Harris R, Stahl R, Thaiss F. (2002). Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.* 61:1986-1995.

Woods J, Katschke K, Volin M, Ruth J, Woodruff D, Amin M, et.al. (2001). IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol.* 15;166(2):1214-1222.

Wu J, Yang X, Zhang Y, Zhou S, Zhang R, Dong X, et.al. (2009). Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells. *Inflamm Res.* 58(8):473-482.

Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. (2011). NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res.* 21: 146–158.

Yaghooti H, Firoozrai M, Fallah S, Khorramizadeh M. (2011). Angiotensin II induces NF- κ B, 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.

Yamakawa H, Jezova M, Ando H, Saavedra J. (2003). Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23:371–380.

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.

Yang C, Shin D, Lee H, Son J, Lee S, Akira S, et.al. (2008). ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signalling. *Cell Microbiol.* 10(3):741-754.

Yu J, Gaffen S. (2008a). Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci.* 13:170–177.

Yu J, Ruddy M, Conti H, Boonantananasarn K, Gaffen S. (2008b). The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *Infect Immun*. 76(9):4206-4213.

Yuan Q, Wang J, Fang Q, Liu Y, Fan J, Zhang S, et.al. (2011). Attenuating effect of pretreatment with Yiqifumai on lipopolysaccharide-induced intestine injury and survival rate in rat. *J Inflamm (Lond)*. 2;8:10.

Yuan Z, Schreurs O, Gjermo P, Helgeland K, Schenck K. (1999). Topical distribution of Fc gamma R1, Fc gamma R2 and Fc gamma R3 in inflamed human gingiva. *J Clin Periodontol*. 26:441–447.

Yücel O, Berker E, Gariboğlu S, Otlı H. (2008). Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 35(5):365-370.

Zhang G y Ghosh S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-κB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*. 107, 13-19.

Zhang H, Ding J, Fan Q, Liu S. (2009). TRPC6 up-regulation in Ang II-induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234(9):1029-1036.

Zhou J, Ando H, Macova M, Dou J, Saavedra J. (2005). Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J. Cereb. Blood. Flow Metab*. 25:878–886.

Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, Žekonis J. (2011). Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. *Medicina (Kaunas)*, 47(4):193-199.

Zimmerman M, Sharma R, Davisson R. (2005). Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension*. 45: 717-723.