BELLA LUNA COLOMBINI ISHIKIRIAMA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE COMPONENTES DO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA POR FIBROBLASTOS DE
GENGIVA E LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANOS**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

BAURU - SP

2012

BELLA LUNA COLOMBINI ISHIKIRIAMA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE COMPONENTES DO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA POR FIBROBLASTOS DE
GENGIVA E LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

VERSÃO CORRIGIDA

BAURU - SP

2012

C717e Colombini-Ishikiriama, Bella Luna
Estudo da expressão e produção de componentes do sistema renina-angiotensina por fibroblastos de gengiva ligamento periodontal humanos. / Bella Luna Colombini Ishikiriama. – Bauru, 2012.
131 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

A versão original desta Tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru, 25 de Fevereiro de 2012.

Projeto de Pesquisa aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Proc.nº 080/2008.

Bauru, 25 de fevereiro de 2012.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Bella Luna Colombini Ishikiriama

20 de Fevereiro de 1982

Nascimento João Pessoa – PB

Filha de Danilo Roberto Colombini e Sandra Amélia Luna.

2001-2004

Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

2005-2007

Curso de Especialização em Periodontia, pela Sociedade de Promoção do Fissurado Lábio-palatal (PROFIS) - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Universidade de São Paulo.

2007-Atual

Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado Direto, área de concentração, Biologia Oral, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

*“O segredo é não correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você.”*

Mário Quintana

Dedicatória

Dedico

Ao meu pai **Danilo (Feio)** *in memoriam*,

Lembro como se fosse hoje àquele dia de fevereiro de 2001... foi a primeira vez que pus os pés nesta faculdade, e você estava lá, ao meu lado, orgulhoso como todos os pais. Quatro anos se passaram, chegou a formatura...e você estava lá mais uma vez, comemorando com o coração cheio de orgulho pela filha " doutora" . Nunca vou esquecer quando você me ligou e disse que a noite do baile de formatura havia sido o dia mais feliz da sua vida... isso me mostrou o tamanho do orgulho e da felicidade que você estava sentindo de mim naquele momento. Quando esta etapa acabou resolvi ir embora trabalhar, mas não encontrei a felicidade neste caminho, e você, mais uma vez, me permitiu voltar à Faculdade, sem hesitar, para encarar esse desafio,

E agora, chego aqui, no momento tão esperado, e infelizmente você não está aqui para comemorar. Mas sei que onde você está o seu coração está cheio de orgulho por me ver cumprir mais esta etapa da vida com sucesso. Se eu cheguei até aqui, PAI, é por que a força do seu orgulho e todo o suporte que você me deu me permitiram.

Por isso, à você PAI QUERIDO, eu dedico o meu amor eterno, os resultados de meus esforços, de meus estudos, minhas felicidades e lutas durante todos estes anos...

Amo Você!

Agradecimentos

Este trabalho só pôde ser realizado graças ao envolvimento direto das pessoas a quem qualquer agradecimento é muito pequeno:

À Deus,

Onipotente e onipresente, por me dar saúde, força e sabedoria nesta caminhada. Agradeço por mais esta conquista em minha vida.

Ao Kiyoshi, meu Mestre, Amigo e Amor,

Ao Mestre, que nunca hesitou em dividir comigo todo o seu conhecimento e sempre me abriu as portas, me dando a chance de crescer profissionalmente ao seu lado;

Ao amigo, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou nas decisões e momentos mais difíceis sem hesitar, e que também compartilhou comigo incontáveis momentos de alegria;

E ao meu Amor, que deu a minha vida uma razão especial de ser. Me mostrou a felicidade e me deu de presente os meus dois maiores tesouros: a NOSSA FAMÍLIA e o GUI.

Por tudo que você é, pelo que representa para mim, por todo esforço, companheirismo, amor e dedicação, eu te agradeço demais. TE AMO!

Ao Gui, filho lindo do meu coração.

Nunca imaginei que o AMOR pudesse ser um sentimento tão sublime. Que fosse tão fácil amar tanto alguém que nunca se viu. Obrigada por me dar todos os dias a felicidade de ver esse sorriso lindo e ouvir o mais maravilhoso dos sons : "mamãe". **Amo Você!**

À Mamãe Querida e a Azamor,

Vocês formaram a base sólida que foi capaz de sustentar a construção da pessoa que sou hoje. Os exemplos que tive de vocês dois, só me ensinaram a ser uma pessoa perseverante, trabalhadora, que valoriza e sabe o poder que o conhecimento e a sabedoria têm de transformar a vida das pessoas. Mas mais do que isso, vocês me ensinaram que o amor dos que nos cercam é o que nos move na direção do bem e é que importa verdadeiramente. Pelo amor, incentivo e compreensão eu os agradeço do fundo do meu coração. **Amo Vocês!**

À minha querida irmã Esther e meu cunhado Alexandre,

Vocês, “branquinha” e Alê, são um exemplo nesta vida acadêmica de competência, profissionalismo e qualidade, mas, mais do que isso, vocês são pessoas incríveis que só iluminam a minha vida e a tornam mais feliz. Muito Obrigada por partilharem a vida conosco e seguirem juntos nos incentivando por estes caminhos, às vezes, árduos e tortuosos. Amo Vocês!

À minha querida Voinha Lili,

A distância não permite que a senhora acompanhe de perto o que faço, mas nem por isso se desinteressa. Cada nova conquista nossa aqui é motivo de orgulho para a Sra., que eu sei. É esse orgulho que a Sra. sente que me estimula e impulsiona a alcançar objetivos cada vez mais desafiadores. **Muito Obrigada, voinha!**

À minha irmãzinha Isis,

Enquanto eu fazia essa tese você cresceu e se tornou uma mulherzinha, mas para mim, você continua sendo a minha irmãzinha do coração. Obrigada por fazer nossas vidas mais felizes. **Amo você!**

Aos Meus sogros, Áquira e Lúcia,

Que sempre foram verdadeiros pais, não só para mim, como também, e principalmente, para o Gui. Foram vários os dias e as noites em que vocês deixaram seus compromissos para que eu pudesse cumprir os meus, me divertir ou simplesmente, dormir. Quantas vezes o colinho da “Batyan e do Dityan” acalentaram o chorinho do meu neném e serviram de brinquedo para os momentos de alegria.

Pelo apoio, pelos incentivos e por dizerem sempre, vá! Obrigada por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui!

Aos meus cunhados(as) Miwa, Dú e minha sobrinha Tiemi,

Obrigada por todo apoio e incentivo na realização deste trabalho. O companheirismo de vocês e a alegria que vocês trazem para a minha vida torna qualquer tarefa mais fácil. **Muito Obrigada!**

Ao **Cebola**, meu querido amigo e orientador.

Chefe incisivo, nunca ríspido, amigo de conciliar tormentas e revoltas. Inquieto, pesquisando, estudando e ensinando. Confiante em plantar e regar as sementes do conhecimento por onde passa, sempre íntegro, prestativo, profissional, incansável... de dedicação imensurável. Tão agitado no trabalho e tão espiritualizado no conviver. Pudera todos conhecessem a magnitude do ser humano e profissional que é!

Orgulho-me de ser sua orientada e agradeço muito pela confiança depositada e por todos os momentos compartilhados. **Muito Obrigada!**

Ao **Professor Paulo Afonso Silveira Francisconi**, meu primeiro orientador,

Que me deu a primeira chance de conhecer o mundo acadêmico. A oportunidade que você me deu naquele momento foi fundamental para que eu estivesse aqui hoje. Muito Obrigada!

Ao **Professor Flávio Augusto Cardoso de Faria**,

Eu sempre disse que “queria ser igual a você quando crescesse”, porque para mim você é um exemplo. Transmitir o conhecimento como você, com ciência e clareza, mas principalmente com humildade e amor pelo que faz é o que me inspira nesses caminhos da academia. Muito Obrigada!

Aos meus amigos do “**RAS TEAM**”, **Thaís Marchini**, **Marta da Cunha Lima** e **Caio Márcio Figueredo**, eu só tenho a agradecer. Quando resolvi sair da clínica e adrentar ao mundo “das bancadas de laboratório” imaginei um mundo solitário e triste, mas vocês três fizeram cada momento dedicado ao RAS ser alegre e engraçado sem perder a seriedade necessária. Espero poder dividir muitos mais momentos como estes com vocês. Obrigada!

À minha querida amiga **Karin**,

Você é uma amiga muito especial na minha vida. Onze anos de amizade já se passaram até aqui e neles você esteve sempre ao meu lado, comemorando os momentos mais felizes e me acalutando nos de mais profunda dor. Em quase tudo o que fiz nestes anos, você esteve comigo. Desde a graduação, passando pelo estágio, o mestrado e por fim o doutorado direto... eu na Farmaco e você, na Farmaco e na Dentística. Por isso, chegar até aqui e concluir mais esta etapa da vida com você (como havíamos sonhado!) faz esse momento ser mais especial!

Não tenho palavras para agradecer toda amizade, carinho e amor que você dedica a mim e a minha família. Tenha certeza que mesmo que a vida nos afaste fisicamente, eu estarei sempre aqui. Muito Obrigada, Loira!

Ao amigo **Thiago Dionísio**,

Companheiro de muitos anos de Farmaco, você sempre foi o meu porto seguro. Saber que você está por perto torna tudo mais fácil. Muito Obrigada por tudo.

À amiga **Carol Morandini**,

Por muitas vezes lhe disse que não saberia como agradecer por toda a ajuda científica e moral que você me deu durante as fases mais difíceis deste trabalho. Com certeza a sua sabedoria e o seu discernimento me ensinaram muito e me engradeceram a vida. Que você possa dividir sempre com outros amigos e alunos todo o conhecimento e a dedicação que você tem pelo que faz. Por tudo, Muito Obrigada!

À amiga **Carla Sipert**,

O que seria deste trabalho sem as células? Muito Obrigada por me ensinar, com todo o seu cuidado impecável e destreza, a cuidar destas “criaturinhas” tão sensíveis, delicadas e fascinantes. Obrigada também pelos muitos momentos divididos durante todos estes anos no laboratório.

Aos **amigos da Farmacologia, Lucimara Teixeira, Adriana Calvo, Fernanda Veronese, Rubens Maciel, Viviane Parisi, Thaís Garbieri, Daniel Brozowski**. Vocês são pessoas especiais. Conviver dia a dia com vocês torna o trabalho sempre mais prazeroso e divertido. Obrigada!

À **Vera Rufino**,

Mais que uma secretária *super* eficiente e uma boleira de mão cheia, você é uma amiga. Sua força, garra e dedicação a tudo o que faz são um exemplo para mim. Muito Obrigada por tudo que você fez por mim durante todos estes anos!

Aos **amigos da Disciplina de Histologia, Marcela Claudino, Élcia, Cadu Repeke, Gabriela Genaro, Bruna e Ricardo; Aos professores Gustavo Garlet, Gerson Francisco de Assis e Rumiú Taga; e as funcionárias Dani e Tânia**, por toda a gentileza e educação com que me trataram nos muitos momentos em que estive neste Departamento. Quando estive entre vocês eu só ganhei... conhecimento nas disciplinas, e muitos amigos nos laboratórios. Obrigada.

Aos **colegas do Departamento de Periodontia, Mônica e Roberta; aos Professores Adriana Passanezi, Sebastião Gregghi, Euloir Passanezi e Maria Lúcia Rubo; e as Funcionárias Edilaine e Ivânia.** Muito obrigada por todo o carinho com o qual receberam a mim e ao GUL. Carregar aquela barriga, assistir aulas, atender na clínica e apresentar os seminários necessários ficou bem mais fácil com o carinho e a compreensão de vocês.

Aos **colegas do Departamento de Dentística, Flávia, Leslie, Marcela, Luciana, Carol, Larissa, Kiki e Guilherme; aos Professores Eduardo Franco, Rafael Mondelli, José Mondelli, Maria Tereza Atta, Linda Wang, Eduardo Frascischone e Maria Fidela Navarro; aos Funcionários Elizabeth Cariani, Rita Capossi, Elísio, Natália, Zuleica, Nelson e Lúgia.** Não sei dizer se passo mais tempo na Farmacologia ou na Dentística. Lá tenho amigos maravilhosos de pós-graduação, que compartilham comigo as muitas alegrias e as mesmas aflições e também, mestres excelentes que não hesitam em dividir seu conhecimento e são exemplos a serem seguidos. Por tudo meu Muito Obrigada!

Aos **colegas do Departamento de Microbiologia, Belai, Cláudia, Karine, Thaís Gasparoto e Hayana; À Profa. Dra. Ana Paula Campanelli; e aos Funcionários André, Dalva, Livia e Edilena,** por estarem todos sempre disponíveis a ajudar-me e por disponibilizar seus equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos **colegas da Disciplina de Bioquímica, Aline, Bruna, Cristiane e Flávia; aos professores Marília Buzallaf, Ana Carolina Magalhães e Rodrigo Cardoso e aos funcionários Telma e Ovídio,** pela amizade, conhecimento transmitido e disponibilidade na utilização dos equipamentos.

Aos **Pacientes** doadores que contribuíram para esta pesquisa doando mais que fragmentos de tecido, mas também sua simpatia e boa vontade.

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. João Grandino Rodas.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira, minha Escola, onde vivo intensamente cada dia da minha história.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOB/USP**, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, por proporcionar aos alunos que aqui chegam uma escola de pós-graduação humana e de qualidade.

À **Capes** pela bolsa a mim concedida, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **colegas, professores e funcionários** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a confecção deste trabalho e para a minha formação profissional,

Muito Obrigada!

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

Autor Desconhecido

RESUMO

O Sistema Renina-angiotensina (SRA), é um sistema capaz de gerar hormônios peptídeos com grande impacto na regulação cardiovascular e na patogênese das doenças cardiovasculares. Este sistema opera, por meio das ações da Angiotensina II, tanto em nível sistêmico (endócrino) quanto tecidual (local, parácrino/autócrino) controlando importantes funções, várias delas relacionadas à facilitação da instalação e progressão do processo inflamatório. Por este motivo, a produção desta proteína nos tecidos pode estar relacionada à patogênese de muitas doenças, dentre elas a doença periodontal (DP), tendo em vista seu caráter infeccioso-inflamatório e os achados da literatura que mostram que a inibição da formação de Ang II, diminui a perda óssea da DP em animais. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos: Avaliar *in vitro*, a) A expressão de componentes do SRA (ANGT, RENINA, ECA, ECA-2, AT₁, AT₂ e Mas) por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos, por RT-qPCR; b) A produção de componentes do SRA (RENINA, ECA, ECA-2) no sobrenadante de culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos, por ELISA; c) A produção dos receptores do SRA (AT₁, AT₂ e Mas), nestes fibroblastos, por Imunofluorescência e d) Se a expressão e a produção dos componentes do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos, se alteram com a estimulação por LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*. Após a coleta, os dados foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0. por meio da análise de variância à 2 critérios (ANOVA-two way) seguida do pós teste de Bonferroni, com nível de significância de 5% para a verificação das possíveis diferenças. Foi detectada a expressão gênica para alguns dos componentes do SRA (ANGT, RENINA, ECA, AT₁) por fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal. Foi detectada ainda uma expressão gênica diferenciada entre fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal para a ECA, sendo significativamente maior nos fibroblastos da gengiva. Houve imunomarcagem positiva tanto nos fibroblastos de gengiva quanto de ligamento periodontal compatível com a presença dos receptores AT₁ e Mas. Pôde-se observar por fim que o contato com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*, na concentração de 10 µg/mL/24 h, não alteram a expressão dos componentes do SRA. Portanto, pôde-se concluir que os fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal apesar de não expressarem e produzirem todos os componentes do SRA necessários para a formação local de Ang II, poderiam contribuir, ainda que parcialmente, com outras células do microambiente dos tecidos periodontais para a formação e ação locais da Ang II, e assim, para a instalação e progressão da DP.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Sistema Renina-Angiotensina, Fibroblastos, Gengiva, Ligamento Periodontal.

ABSTRACT

Study of expression and production of the renin-angiotensin system components by gingival and periodontal ligament human fibroblasts

The Renin-angiotensin system (RAS) can generate hormones that have a high-impact on cardiovascular regulation as well as in the pathogenesis of cardiovascular disease. This system acts through both systemic (endocrine) and local (paracrine/autocrine) effects of Angiotensin II, controlling important functions related to the facilitation of installation and progression of the inflammatory process. For this reason, this protein's production in tissues can be associated to the pathogenesis of many diseases, including periodontal disease (PD). In the PD setting, a infectious-inflammatory characterized disease, the literature findings shows that inhibition of the Ang II formation can decrease the bone loss in animals. In this context, the aims of the present study were: to investigate *in vitro*: a) the expression of RAS components (ANGT, RENIN, ECA, ECA-2, AT₁, AT₂ and Mas) by human gingival and periodontal ligament fibroblasts by RT-qPCR; b) the production of RAS receptors (AT₁, AT₂ and Mas) by human cultured gingival and periodontal ligament fibroblasts by Immunofluorescence and d) the production of RAS components (RENIN, ECA, ECA-2) if the expression and production of RAS components by gingival and periodontal ligament fibroblasts modify under *P. gingivalis* and *E. coli* LPS stimulation. After collected, the data were analysed using GraphPad Prism 5.0, by the two way ANOVA followed by Bonferroni post test with a significance level of 5%. Gene expression was detected for some of the RAS components (ANGT, RENIN, ECA, AT₁) by both gingival and periodontal ligament fibroblasts. It was detected a differential gene expression between gingival and periodontal ligament fibroblasts for ECA, being significantly higher in gingival fibroblasts. There was a stain in Immunofluorescence compatible with the production of RAS receptors (AT₁ and Mas). It must be noted that the stimulation with *P. gingivalis* and *E. coli* LPS, in a concentration of 10 µg/mL/24 h, did not altered the expression of RAS components. In conclusion, despite of neither gingival or periodontal ligament fibroblasts express all components of RAS, needed to local formation of Ang II, they might also contribute to the local formation and action of Ang II and in consequence, to the installation and the progression of DP.

Key words: Periodontal Disease, Renin-Angiotensin System, Fibroblasts, Gingival Tissue, Periodontal Ligament.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Visão simplificada do SRA circulante 'clássico'.....	24
Figura 2	- Visão atual do SRA.....	25
Figura 3	- O Periodonto e seus componentes.....	29
Figura 4	- Mecanismo de formação da bolsa periodontal a partir do acúmulo de biofilme bacteriano sobre a superfície dental.....	32
Figura 5	- Ações da Angiotensina II na Inflamação.	38
Figura 6	- Representação esquemática da organização dos grupos experimentais de acordo com o paciente doador (MCB, TCS, RDL) tipo de tecido (Gengiva ou Ligamento periodontal) e estímulo aplicado (LPS de <i>P. gingivalis</i> ou <i>E. coli</i> na concentração de 10 µg/mL/24h).....	51
Figura 7	- Grupos experimentais delineados para a avaliação da citotoxicidade dos estímulos empregados (LPS <i>P.</i> <i>gingivalis</i> e <i>E. coli</i> na concentração de 10 µg/mL por 24 horas).....	52
Figura 8	- Representação esquemática dos alvos a serem estudados nos respectivos ensaios.....	53
Figura 9	- Dispositivos utilizados para cultura das células durante os experimentos de Imunofluorescência.	60

Figura 10 - Grupos experimentais delineados para a detecção por imunofluorescência da produção dos receptores do sistema renina-angiotensina – receptor de angiotensina II tipos 1 e 2 (AT ₁ , AT ₂) e receptor Mas (Mas).....	61
Figura 11 - Cultura de Fibroblastos de Gengiva e Ligamento Periodontal humanos.....	67
Figura 12 - Efeito da estimulação com LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i> sobre a atividade mitocondrial de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos.	71
Figura 13 - Expressão de RNAm para Angiotensinogênio (ANGT) por fibroblastos humanos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> e de <i>E. coli</i>	75
Figura 14 - Expressão de RNAm para Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) por fibroblastos humanos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> e de <i>E. coli</i>	79
Figura 15 - Expressão de RNAm para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT ₁) por fibroblastos humanos de gengiva e de ligamento periodontal estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> e de <i>E. coli</i>	83
Figura 16 - Detecção da expressão do receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT ₁) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos.....	87
Figura 17 - Detecção da expressão do receptor Mas (Mas) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alvos da PCR quantitativa e códigos dos ensaios inventoriados (Applied Biosystems®) utilizados nos experimentos.....	57
Tabela 2 - Gene alvo utilizado como controle positivo.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C = graus Celsius

AGTN = angiotensinogênio

Ang 1-5 = angiotensina 1-5

Ang 1-7 = angiotensina 1-7

Ang 1-9 = angiotensina 1-9

Ang 3-8 = angiotensina 3-8

Ang I = angiotensina I

Ang II = angiotensina II

Ang IV = angiotensina IV

AT₁ = receptor de angiotensina tipo 1

AT₂ = receptor de angiotensina tipo 2

AT₄ = receptor de angiotensina tipo 4

cDNA = ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂ = gás carbônico

Ct = *cicle threshold* ou ciclo limiar

DEPC = dietil pirocarbonato

DMEM = *Dulbeco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbeco)

DNA = ácido desoxirribonucleico

DP = Doença Periodontal

ECA = enzima conversora de angiotensina

ECA-2 = enzima conversora de angiotensina-2

ELISA = Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

et al. = e colaboradores

g = força *g*

GV = gengiva

h = hora(s)

IL (1/6/8/10) = interleucina (1/6/8/10)

IL-1 β = interleucina-1beta

LAFFIC = laboratório de fisiologia e farmacologia clínica

LP= ligamento periodontal

LPS = lipopolissacarídeo

LTA = ácido lipoteicóico

µg = micrograma(s)

µl = microlitro(s)

Mas= receptor Mas

mg = miligrama(s)

min = minuto(s)

mL = mililitro(s)

mm = milímetro(s)

MTT = 2,5 difenil brometo de tetrezolium

NaCl = cloreto de sódio

NEP: peptidase neutra (neprisilina)

qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativo

PBS = solução salina tamponada com fosfato

PEP= prolil peptidase

PGE₂ = prostaglandina E₂

PGI₂= prostaciclina

RNA_m = RNA mensageiro

rpm = rotações por minuto

RT = transcrição reversa

RT-PCR = transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SNC = Sistema Nervoso Central

SRA = sistema renina-angiotensina

TDP = tetradcapeptídeo substrato de renina

TGF-β = fator de crescimento transformador- beta

VEGF= fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	- INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	21
1.1	- Sistema Renina-Angiotensina (SRA) Clássico	23
1.2	- Sistema Renina-Angiotensina (SRA) Local.....	27
1.3	- Sistema Renina-Angiotensina Local no Periodonto.....	28
1.4	- Sistema Renina-Angiotensina e a Doença Periodontal.....	30
2	- PROPOSIÇÃO.....	43
3	- MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1	- Coleta de Biópsias de Tecido Gengival e de Ligamento Periodontal Humanos.....	49
3.2	- Cultura Primária dos Fibroblastos Gengivais e do Ligamento Periodontal	49
3.3	- Estimulação dos Fibroblastos Gengivais e do Ligamento Periodontal por LPS de <i>P. gingivalis</i> e de <i>E. Coli</i>	50
3.4	- Avaliação do efeito citotóxico do LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i> sobre fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal (Ensaio de MTT)	51
3.5	- Avaliação da Expressão e Produção de componentes do Sistema Renina-angiotensina por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados ou não por LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i>	52
3.5.1	- Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados ou não por LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i>	54
3.5.1.1	- Extração de RNA total.....	54
3.5.1.2	- Quantificação do RNA Total e Avaliação da Qualidade do RNA Total.....	54
3.5.1.3	- Tratamento do RNA total com DNase.....	55
3.5.1.4	- Transcrição Reversa.....	55
3.5.1.5	- PCR quantitativa	55
3.5.2	- Avaliação da Produção de enzimas do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal por ELISA e dos receptores AT ₁ e AT ₂ e Mas por IMUNOFLUORESCÊNCIA	58
3.5.2.1	- ELISA	58
3.5.2.1.2	-Renina.....	58
3.5.2.1.2	-ECA	59
3.5.2.1.3	-ECA-2	59
3.5.3	- IMUNOFLUORESCÊNCIA	60
3.6	- Análise Estatística	62

4	- RESULTADOS.....	63
4.1	- Cultura dos Fibroblastos	65
4.2	- Avaliação do efeito citotóxico do LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i> sobre fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal (Ensaio de MTT)	69
4.3	- Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados ou não por LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i>	73
4.3.1	- Expressão de RNAm para o Angiotensinogênio	73
4.3.2	- Expressão de RNAm para a Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA).....	77
4.3.3	- Expressão de RNAm para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT ₁)	81
4.3.4	- Expressão de RNAm para Renina, Enzima Conversora de Angiotensina- 2 (ECA-2), receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT ₂) e receptor Mas (Mas)	85
4.4	- Análise da produção dos receptores AT ₁ , AT ₂ e Mas por Imunofluorescência.....	86
4.4.1	- Imunofluorescência para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT ₁) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> , <i>E. coli</i> (10 µg/mL/24 h) e IL-1β (1 ng/mL/8 h)	86
4.4.2	- Imunofluorescência para o receptor Mas (Mas) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> , <i>E. coli</i> (10 µg/mL/24 h) e IL-1β (1 ng/mL/8 h)	89
4.4.3	- Imunofluorescência para o receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT ₂) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> , <i>E. coli</i> (10 µg/mL/24 h) e IL-1β (1 ng/mL/8 h)	93
4.5	- Detecção da produção de ECA, ECA-2 e Renina por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, estimulados ou não com LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i> , por ELISA.....	93
5	- DISCUSSÃO	95
6	- CONCLUSÃO.....	109
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO	129

Introdução e
Síntese Bibliográfica

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1.1 - Sistema Renina-Angiotensina (SRA) Clássico

O controle da pressão arterial nos humanos é um mecanismo importante e complexo responsável por manter a perfusão do sangue nos diferentes órgãos e tecidos. Este controle envolve uma série de mecanismos fisiológicos inter-relacionados de natureza neural ou hormonal, que podem agir de forma rápida, pela ação do sistema nervoso autônomo sobre o coração e os vasos, ou ainda de forma lenta, por meio da liberação de hormônios. O principal mecanismo envolvido no controle hormonal da pressão arterial é o que envolve o Sistema Renina-angiotensina (**Mauad et al., 1997**).

O Sistema Renina-angiotensina (SRA) clássico, também chamado de Sistema Renina-angiotensina-aldosterona, é um sistema fisiológico, presente em todos os vertebrados. Este sistema consiste de uma cascata enzimático-hormonal, que regula a função cardiovascular, adrenal e renal, controlando o balanço eletrolítico e a pressão arterial (**Carey & Siragy, 2003**).

O ponto de partida desse sistema é a formação da renina, uma glicoproteína sintetizada no aparato juxtaglomerular dos rins, liberada na circulação durante estados hipovolêmicos e de hipotensão (**Harris & Gomez, 1997**), que atua clivando o angiotensinogênio (ANGT) plasmático, produzido e liberado fundamentalmente pelo fígado, dando origem ao decapeptídeo inativo, Angiotensina I – ANG I ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-His}^9\text{-Leu}^{10}$). Esta por sua vez é hidrolisada pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) na circulação pulmonar, dando origem ao octapeptídeo biologicamente ativo Angiotensina II - ANG II ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$) o qual, através dos receptores de angiotensina tipo 1 (AT_1) e tipo 2 (AT_2), promove suas ações biológicas (**Peach, 1977**).

A principal ação da Angiotensina II como peptídeo endócrino circulante é a regulação da pressão arterial por meio do controle do fluxo sanguíneo, do volume de fluidos e do balanço eletrolítico (**Oparil, 1974**), mas ela também participa da regulação de algumas funções celulares. Assim, quando interage com os receptores AT_1 é capaz de provocar:

vasoconstrição, hipertensão, diminuição do fluxo renal e aumento da atividade noradrenérgica periférica, além de regular os mecanismos de fibrose, crescimento e migração celular. Ao interagir com os receptores AT_2 , os efeitos observados são diferentes e antagônicos àqueles observados para o AT_1 : vasodilatação, inibição da proliferação e crescimento celular e modulação da matriz extracelular (Skrbic & Igic, 2009) (Figura 1).

Figura 1 – Visão simplificada do SRA circulante ‘clássico’. Neste, o produto final Ang II é gerado a partir da ação da renina sobre o angiotensinogênio plasmático, dando origem à inativa Ang I, que por sua vez sofre a ação da ECA. Uma vez formada, Ang II interage com receptores específicos (AT_1 e AT_2). ECA: Enzima Conversora de Angiotensina.

Esta visão relativamente simples do SRA que foi gerada pelo acúmulo de evidências ao longo das décadas, se expandiu significativamente graças aos achados mais recentes da literatura, que aumentaram a complexidade deste sistema. Diferentes receptores para ANG II (AT_1 , AT_2 , AT_4) e para os diferentes peptídeos (como o receptor Mas para a Ang 1-7), além de um receptor para (Pro)renina (Nguyen *et al.*, 2002) e, vias de transdução de sinal têm

sido caracterizadas. Além disso, peptídeos truncados formados na cascata do SRA, foram identificados como biologicamente ativos - Ang 2-8 (um heptapeptídeo também chamado de Ang III) possui ações similares às da Ang II, enquanto o hexapeptídeo Ang 3-8 (Ang IV) exerce suas ações via receptores regulados por insulina e a Ang 1-7 tem ações opostas às da Ang II. Adicionalmente, vias alternativas para a formação de ANG II, como por exemplo, pela ação da Quimase e da Elastase-2 (Santos *et al.*, 2004; Becari *et al.*, 2011) e de outros peptídeos ativos, também foram propostas. No entanto, acredita-se que novos componentes e funções do SRA ainda permanecem desconhecidas (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Figura 2 – Visão atual do SRA. Vários peptídeos, receptores e vias enzimáticas alternativas foram descritos. ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA-2, Enzima Conversora de Angiotensina-2. NEP, peptidase neutra (neprililina); PEP, prolil peptidase; TDP, Tetradecapeptídeo Substrato de Renina.

Neste modelo de SRA, existem enzimas alternativas à Renina e à ECA já conhecidas que atuam na formação dos diferentes peptídeos, como caliceína, tonina, quimase, tripsina, bem como um número de aminopeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases (Campbell, 2003). A partir da Ang II, estas enzimas podem gerar vários peptídeos bioativos de

angiotensina, que desempenham várias atividades fisiológicas. Estes peptídeos incluem angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)], angiotensina 2-8 [Ang III], angiotensina 3-8 [Ang IV]. Neste contexto, a ECA-2, um homólogo da ECA, foi recentemente identificada e é predominantemente expressa nas células endoteliais vasculares dos rins e do coração (**Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000**). Esta enzima, assim como a ECA, funciona como uma carboxipeptidase quebrando o único resíduo da Ang II para produzir Ang (1-7) (**Tipnis et al., 2000**). Ang 1-7 pode ser gerada também a partir da Ang I pelas propil endopeptidase (PEP) e endopeptidase neutra (NEP). Este peptídeo bioativo formado pela ECA-2 tem mostrado ser essencial para a regulação da função cardíaca já que a ligação deste ao seu receptor específico (Mas) gera no tecido ações que antagonizam os efeitos da Ang II (**Crackower et al., 2002**).

Por outro lado, Ang II pode ser degradada, para dar origem ao heptapeptídeo Ang III, pelas aminopeptidases. Sabe-se que Ang III atua nos receptores AT₁ e AT₂, podendo atuar ainda em receptores específicos para Ang III (**Campbell, 2001**). No entanto, o papel deste receptor ainda não foi muito bem determinado. Além disso, este heptapeptídeo resultante pode ser convertido pela aminopeptidase em um fragmento de hexapeptídeo bioativo, chamado Ang IV. Embora pouco se saiba sobre as funções da Ang IV, tem sido sugerido que ela esteja envolvida no processo cognitivo e na aquisição da memória, já que ela se liga especificamente aos receptores AT₄ que se localizam predominantemente no cérebro (**Chai et al., 2000; Pederson et al., 1998; Wright et al., 1999**). Estudos recentes mostraram ainda, que os ligantes de AT₄ inibem de forma dose-dependente a atividade catalítica da aminopeptidase reguladora de insulina (IRAP) e, que por isso, este peptídeo possa estar envolvido no processo de captação da glicose e conseqüentemente possua implicações sobre o diabetes mellitus (**Albiston et al., 2001; Sbodio et al., 2002**). Mesmo assim, potenciais funções destes peptídeos bioativos gerados neste sistema ainda precisam ser melhor compreendidas.

Esta maior complexidade observada permitiu que, mecanismos fundamentais no controle de diversos processos biológicos e patológicos do organismo, relacionados à produção de Ang II, principalmente aqueles ligados ao sistema cardiovascular, pudessem ser compreendidos e modificados para o tratamento de doenças. Assim, o SRA tornou-se um importante alvo para o tratamento da hipertensão e falência cardíaca, o que vem sendo demonstrado pelos benefícios clínicos que as drogas que afetam este sistema vêm

apresentando até os dias de hoje. Inibidores da ECA (por exemplo: Captopril, Enalapril), antagonistas dos receptores AT₁ (por exemplo: Losartan) e inibidores da ação da renina (Alisquireno) são os grupos de drogas mais utilizadas com esta finalidade (**Bader, 2010; Nussberger et al., 2008**).

1.2 - Sistema Renina-Angiotensina (SRA) Local

Adicionalmente ao aumento na complexidade do SRA descrita pela literatura, evidências científicas foram surgindo de que em adição ao “SRA circulante” existem “SRA teciduais” em muitos órgãos e tecidos de diferentes espécies animais (**Campbell & Habener, 1986; Fleming et al., 2006; Paul et al., 2006**). Este conceito se baseou em achados que observaram a presença de componentes do SRA em locais incomuns, ou seja, em tecidos onde sua presença não estava correlacionada às ações do SRA endócrino, anteriormente descritas. Trabalhos mostraram existir a presença de componentes do SRA como angiotensinogênio, ECA, renina e receptores de angiotensina em tecidos do coração, cérebro, rins, paredes dos vasos, tecido adiposo, entre outros (**Paul et al., 2006**). Assim, foi possível formular novas hipóteses e conceitos a respeito da funcionalidade destes sistemas locais, baseando-se em sua capacidade de gerar Ang II.

Estes sistemas locais contêm todos os componentes necessários para a formação de Ang II e outros peptídeos de angiotensina, além de seus respectivos receptores, exercendo várias ações em muitos órgãos. Em alguns deles, operam de forma independente do SRA circulante (glândulas adrenal e cérebro), enquanto em outros locais (coração e rins) operam de forma intimamente relacionada, sendo que os sistemas locais e teciduais parecem operar de forma complementar entre si (**Paul et al., 2006**).

Assim, o SRA circulante é visto como um regulador do volume sistêmico, do balanço eletrolítico e da homeostasia da pressão arterial, enquanto os SRA locais mostraram estar envolvidos com múltiplas novas ações teciduais relacionados com anti-proliferação, crescimento, apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio, secreção hormonal, ações pró-inflamatórias e pró-fibróticas, vasoconstrição, vasodilatação, bem como síntese de proteínas e funções orgânicas, em tecidos como, rins, pâncreas, coração, cérebro, órgãos reprodutivos, órgãos digestivos, artéria carótida, músculo esquelético, tecido adiposo,

cordão umbilical e polpa dental (Campbell & Habener, 1986; Leung & Chappell, 2003; Leung, 2004; Paul *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 2007).

Isso fez com que o SRA fosse então considerado não só um sistema endócrino, mas também um sistema capaz de exercer funções parácrinas e autócrinas (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Evidências da literatura sugerem ainda a existência de um SRA intracelular, completo e funcional (De Mello, 2006; Re & Cook, 2006). Segundo os trabalhos, este SRA intracelular estaria relacionado ao controle do fluxo de Ca^{+2} e ao controle dos genes nas células (Haller *et al.*, 1996). No entanto, os mecanismos pelos quais a Ang II é gerada no âmbito intracelular e exerce suas ações não estão completamente entendidos e, portanto, o papel deste SRA intracelular ainda não é muito claro.

Assim, acredita-se que mudanças nestes SRA teciduais específicos podem estar associadas à fisiologia ou ainda à patofisiologia dos respectivos tecidos e órgãos onde estes são encontrados. Isso permite a possibilidade de que drogas que atuem nestes SRA “locais” possam ser benéficas também para o tratamento de muitas outras doenças existentes (Leung, 2004; Zimmerman & Dunham, 1997).

1.3 - Sistema Renina-Angiotensina Local no Periodonto

Dentre os diferentes ‘SRA locais’ descritos, um de grande relevância para a literatura odontológica é aquele que envolve os tecidos periodontais, como o ligamento periodontal e os tecidos ósseo e gengival com seus componentes celulares (**Figura 3**).

Figura 3 – O Periodonto e seus componentes. O periodonto de Sustentação é formado pelos tecidos que implantam e sustentam os dentes nos ossos dos maxilares (Osso Alveolar, Cemento e Ligamento Periodontal – LP) e o Periodonto de Proteção é composto pelos tecidos que recobrem e circundam o Periodonto de Sustentação (Gengiva e seus componentes).

Artigos recentemente publicados têm demonstrado evidências que demonstram a presença do SRA em tecidos dentais e periodontais de diferentes espécies animais. Trabalhos mostram a existência de alguns componentes do SRA no tecido gengival e em células gengivais de ratos, coelhos, porcos da Índia e em células da gengiva e da polpa de humanos. Nestes relatos os componentes mais frequentemente observados são os receptores de Ang II, sendo que foi possível identificar, nestas células, a presença principalmente do receptor AT_1 e em menor grau do receptor AT_2 (Berggreen & Heyeraas, 2003; Nickenig *et al.*, 1997; Ohuchi *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2007).

Além disso, outros trabalhos demonstram os efeitos da ação da Ang II sobre estes tecidos e células (Ohuchi *et al.*, 2002; Segawa *et al.*, 2003). Segundo estes trabalhos a ação de Ang II nestes tecidos estaria envolvida com o controle da produção de vários mediadores químicos, como a indução da produção de PGE_2 por fibroblastos de gengiva humana (Segawa *et al.*, 2003) e ainda, com funções celulares como proliferação, por exemplo de células do ligamento periodontal humano (Lundergan *et al.*, 1999) e da gengiva de coelhos e porcos da Índia, controle do fluxo sanguíneo, entre outras. A maior parte destas funções

estaria ligada à ação da Ang II sobre os receptores AT₁, o que pôde ser observado pela utilização de drogas antagonistas específicas (**Berggreen & Heyeraas, 2003; Ohuchi *et al.*, 2004; Ohuchi *et al.*, 2002**).

Recentemente, estudos de nosso laboratório demonstraram a existência de um SRA local no tecido gengival de ratos. Experimentos utilizando a técnica de RT-PCR mostraram que neste tecido existe a expressão de RNAm para todos os componentes do SRA – Angiotensinogênio, Renina, Receptores AT_{1a}, AT_{1b} e AT₂ e ECA sendo que estes mostraram-se funcionais e capazes de gerar peptídeos de Angiotensina, incluindo a Ang II (**Santos *et al.*, 2009**). Adicionalmente, outro estudo recente de nosso laboratório confirmou a existência do RNAm para alguns destes componentes do SRA (Receptores AT_{1a}, AT_{1b} e AT₂ e ECA), mostrando ainda indícios da presença da enzima Elastase-2 no mesmo tecido. Demonstrou ainda, por meio de experimentos de imunoistoquímica, a presença de algumas destas proteínas (AT₁, AT₂, Renina e ECA) também no tecido gengival de ratos (**Lima, 2011**).

A presença de alguns destes componentes também já foi observada no tecido gengival humano. O trabalho mais recente publicado na literatura (**Nakamura *et al.*, 2011**) demonstrou, por meio de PCR convencional e de Western Blot, a presença do RNAm e da proteína do receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁), em fibroblastos de gengiva humana em cultura. Além disso, foi possível observar a expressão do RNAm para ECA, Catepsina D e Angiotensinogênio nestas mesmas células (**Nakamura *et al.*, 2011**).

1.4 - Sistema Renina-Angiotensina e a Doença Periodontal

Classicamente o Sistema Renina-angiotensina vinha sendo considerado influente apenas na patogênese das doenças que acometiam os tecidos cardiovascular e renal até que, atividades ‘renina-like’ dentro de outros tecidos e órgãos foram identificadas nas últimas duas décadas (**Paul *et al.*, 2006**), tornando possível a investigação do papel desse sistema na patogênese de várias outras doenças.

Uma vez que existem relatos na literatura da presença dos componentes do SRA (principalmente dos receptores de Ang II) e da possível formação e ação da Ang II nos tecidos periodontais (gengiva e ligamento periodontal) de várias espécies animais, inclusive na humana, uma das patologias que começou a ter o papel do SRA investigado foi a Doença Periodontal (DP).

A DP compreende um grupo de doenças que afetam as estruturas de proteção e suporte dos dentes. É uma das causas mais significantes de perda de dentes em adultos e a mais prevalente forma de doença óssea em humanos, podendo ser também um fator modificador da saúde sistêmica dos indivíduos **(Fleming et al., 2006; Garlet et al., 2006)**.

A DP engloba um grupo de doenças infecciosas, nas quais periodontopatógenos iniciam respostas inflamatórias e imunológicas que determinam a manifestação clínica da doença. A patogênese da DP consiste em um processo inflamatório que envolve as respostas imunes, inata e adaptativa. É caracterizada pela destruição dos tecidos moles, mediada pelo hospedeiro, causada pela indução da produção e ativação de enzimas líticas, e, estimulação da osteoclastogênese **(Graves, 2008; Graves & Cochran, 2003)**. Isso leva à presença de um intenso infiltrado inflamatório associado à perda de tecido ósseo alveolar e dos tecidos de inserção do periodonto que podem levar à perda do elemento dental **(Garlet et al., 2006)**.

O conceito atual da etiologia da periodontite considera que três fatores determinam se a doença irá ocorrer com o indivíduo: a suscetibilidade do hospedeiro, a presença de espécies patogênicas e a ausência ou proporção pequena de “bactérias benéficas”. As manifestações clínicas da destruição periodontal resultam, então, de uma complexa relação entre os agentes etiológicos, neste caso, patógenos específicos do biofilme dentobacteriano, e os tecidos do hospedeiro. Quando o equilíbrio entre a carga bacteriana e a resposta do hospedeiro é alterado, seja ele com respostas imunológicas mais exacerbadas, ou com respostas imunológicas deficientes, a destruição periodontal pode ocorrer **(Wang & Ohura, 2002; Williams et al., 1985)**.

O principal fator etiológico da doença periodontal é o biofilme dentobacteriano que se acumula sobre a superfície dentária, ao nível supra e/ou subgengival. Este biofilme, carregado de espécies bacterianas patogênicas, quando em íntimo contato com os tecidos moles **(Page & Schroder, 1981; Rowe & Bradley, 1981; Schroder & Lindhe, 1980)**, pode dar início a uma intensa reação inflamatória no tecido gengival (Gengivite) que culmina com a geração de proteases, que degradam a matriz extracelular, e levam à reabsorção do osso alveolar (Periodontite). Com a progressão da doença, os tecidos moles perdem sua inserção na superfície dentária resultando na lesão característica da periodontite crônica – a bolsa periodontal **(Listgarten, 1987; Page, 1991; Van Dyke & Serhan, 2003; Wilson, 1995)** **(Figura 4)**.

Figura 4 – Mecanismo de formação da bolsa periodontal a partir do acúmulo de biofilme bacteriano sobre a superfície dental. A perda dos tecidos de suporte leva à formação da lesão característica da periodontite: a bolsa periodontal, caracterizada clinicamente pelo aumento na profundidade de sondagem como visualizado na figura.

Graças a essa capacidade de dar início ao processo inflamatório da DP, a participação dos microrganismos na etiopatogenia da doença vem sendo amplamente elucidada pela literatura. A presença de espécies bacterianas, tais como, *Porhyromonas gingivalis*, *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, em conjunto no biofilme subgingival, tem sido associada à periodontite crônica e, dentre estas bactérias, a *Porhyromonas gingivalis* é reconhecida por ser a mais fortemente associada à gravidade da doença (Liu *et al.*, 2008).

Porhyromonas gingivalis é um bacteróide gram-negativo, com pigmentação negra, isolado principalmente de áreas de bolsa periodontal profundas e, especialmente em sítios com doença ativa, sendo o biofilme seu nicho ecológico. Esta espécie tem sido associada a quadros patológicos sintomáticos como abscessos tanto de origem endodôntica como periodontal, pericoronarites e complicações pós-exodontia. Tem sido descrito ainda como um dos microrganismos mais patogênicos encontrados na cavidade bucal (Wang *et al.*, 2002).

Bactérias periodontopatogênicas, como a *P.gingivalis*, possuem muitos materiais bioativos como as membranas citoplasmáticas, peptidoglicanos, proteínas externas de membrana, lipopolissacarídeo (LPS), cápsulas e fímbrias na superfície de sua célula que

induzem respostas do hospedeiro, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Offenbacher, 1996).

Dentre estes materiais, o LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas que é capaz de exibir intensa imuno-estimulação e atividade inflamatória (Darveau et al., 1995; Liu et al., 2008) e com isso, induz a produção excessiva de citocinas, podendo modular a rede de citocinas nos tecidos periodontais durante a instalação e progressão da DP (Genco & Slots, 1984).

Trabalhos mostraram que o soro de pacientes com DP é positivo para anticorpos contra vários componentes estruturais da *P.gingivalis*, incluindo as proteínas externas de membrana, cápsula e fímbria, e para anticorpos contra produtos bacterianos biologicamente ativos, incluindo LPS, hemaglutinina e proteases 'tripsina-like'. LPS fica adsorvido à superfície radicular dos dentes e aos tecidos gengivais de pacientes com DP (Wang & Ohura, 2002).

LPS são moléculas transmembrana de algumas bactérias, formadas por três porções: a porção da 'O-cadeia lateral' é a parte mais externa da molécula e é ela quem proporciona à bactéria sua assinatura antigênica; o domínio Core, uma parte da molécula composta de oligossacarídeos que se ligam diretamente à porção mais interna, e o Lipídeo A, a parte da molécula que guarda a atividade de endotoxina (Liu et al., 2008).

Algumas células residentes do tecido conjuntivo e ainda células oriundas do sistema imune possuem receptores (TLR4) e moléculas (CD14 e MD-2) em sua superfície (Tabeta et al., 2000; Wang et al., 2000; Wang et al., 1998) que as permite reconhecer estes LPS bacterianos e reagir a esta estimulação com a geração de uma cascata de sinalização intracelular. Esta cascata leva à ativação de fatores de transcrição (ex. NFkB, ativador de proteína-1 (AP-1) e p38) e a produção de várias citocinas, muitas das quais estimulam direta ou indiretamente a formação dos osteoclastos (Wang et al., 1998).

Os LPS dos periodontopatógenos tem se mostrado capazes de estimular várias células do hospedeiro a produzir citocinas, incluindo macrófagos e fibroblastos (Kent et al., 1998). Fibroblastos são as células residentes mais abundantes nos tecidos moles periodontais (gengiva e ligamento periodontal). Estas células tem como função primordial produzir proteínas colagênicas e não-colagênicas fundamentais para a manutenção da estrutura do tecido conjuntivo. No entanto, possuem em sua superfície celular os receptores e moléculas necessárias para o reconhecimento da invasão bacteriana, podendo assim,

responder com a ativação de cascatas intracelulares necessárias para levar à produção de citocinas e participar dos mecanismos de defesa que envolvem o tecido conjuntivo (**Lindhe et al., 2005**).

Graças a essa capacidade, a resposta dos fibroblastos do tecido conjuntivo do periodonto frente a estímulos microbianos tem sido estudada em situações diversas, como fibroblastos gengivais estimulados por lipopolissarídeos (**Coil et al., 2004**), ácido lipoteicóico (LTA) (**Higerd et al., 1978**), extrato sonicado de bactérias (**Tokuda et al., 2002**), por sobrenadante de bactérias bucais (**Abbas & Lichtman, 2003**), ou ainda, pela bactéria inteira (**O'Brien-Simpson et al., 2009**).

Quando incubados com LPS de *P. gingivalis*, fibroblastos gengivais foram capazes de liberar IL-6 e IL-10 e ainda de induzir a expressão do mRNA para IL-8 (**Distel et al., 2002**). Fibroblastos de ligamento periodontal também mostraram um aumento na liberação de IL-6 e IL-8 quando estimulados por LPS de *P. gingivalis* (**Ginsburg, 2002**).

Originalmente, estas citocinas seriam produzidas neste processo inflamatório, principalmente por macrófagos (**Dinarello, 1989**). No entanto, estudos mostram que fibroblastos periodontais (gengivais e do ligamento periodontal) produzem várias citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α e SDF-1 e ainda fatores de crescimento como, TGF- β em resposta à estimulação por LPS de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *E. coli*. (**Agarwal et al., 1995; Ara et al., 2009; Kent et al., 1999; Morandini et al., 2010; Morandini et al., 2011**) sendo que a liberação de citocinas pode apresentar-se até seis vezes maior do que a liberação constitutiva, com estes estímulos. Algumas destas citocinas, como IL-1 β é capaz ainda de estimular, nestas células, a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6 (**Nakamura et al., 2011**).

Fibroblastos gengivais humanos, quando estimulados por outras citocinas inflamatórias ou por componentes das células bacterianas (**Okada & Murakami, 1998**) secretam também uma variedade de citocinas imunorreguladoras e mediadores químicos, como o fazem as células de defesa (**Abbas & Lichtman, 2003; Coil et al., 2004**), podendo funcionar como um regulador de citocinas nos tecidos periodontais (**Takada et al.**).

Da mesma forma, os fibroblastos do ligamento periodontal também possuem a capacidade de produzir tais citocinas e mediadores químicos (**Zlotnik & Yoshie, 2000**). Estes achados indicam, portanto, que os fibroblastos, além de proporcionar suporte estrutural ao

tecido como sua função primordial, podem funcionar também como células acessórias do sistema imunológico e desempenhar um importante papel nas reações inflamatórias bem como na amplificação da resposta imune (**Agarwal et al., 1995**).

Assim, as interações entre os patógenos microbianos presentes no biofilme e os vários sistemas de resposta do hospedeiro, incluindo aqueles que envolvem a resposta dos fibroblastos, desempenham um papel crítico no desenvolvimento e na progressão da doença periodontal via liberação de vários mediadores inflamatórios e imunológicos (**Ebersole, 2003; Page, 1991**). A inflamação e a destruição tecidual são eventos iniciais e constantes durante o processo mediado pelo hospedeiro em resposta à invasão bacteriana (**Delima et al., 2002; Listgarten, 1987; Van Dyke & Serhan, 2003**).

Algumas das citocinas produzidas pelos fibroblastos do tecido periodontal (gengival e do ligamento periodontal), em resposta ao reconhecimento bacteriano, contribuem para o desenvolvimento da reabsorção óssea induzida pelo processo inflamatório da doença periodontal, pois possuem a capacidade de estimular um ou mais passos da reabsorção óssea, incluindo o recrutamento, a diferenciação, ou a fusão de células precursoras para formar osteoclastos, podendo ainda aumentar a sobrevivência destas células (**Silva et al., 2007**). Estas citocinas podem também afetar a perda de osso periodontal graças à sua capacidade em recrutar células, como neutrófilos, que protegem o tecido contra a invasão bacteriana (**Graves, 2008**).

Dentre as várias citocinas pró-inflamatórias relacionadas à iniciação e à progressão da DP citadas na literatura, algumas merecem destaque. Trabalhos mostram que a inibição da ação de IL-1 e IL-6 sobre os tecidos periodontais, diminuem de forma significativa a inflamação, a perda de tecido conjuntivo de inserção e a perda óssea induzida pelos patógenos, bem como a osteoclastogênese, em ratos (**Baker et al., 1999; Delima et al., 2002**).

Estudos relatam também o papel do TNF- α como uma citocina com papel significativo na perda óssea característica da doença periodontal (**Graves et al., 2001**). Quando a ação desta citocina é inibida experimentalmente em ratos, por meio da deficiência do receptor, a osteoclastogênese induzida pelo LPS de *P. gingivalis* é reduzida, o que também acontece com a inflamação e a perda óssea em ratos *Knockout* para TNF (TNFR-1-KO) em resposta à presença da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (**Garlet et al., 2007**). Esta

citocina, mostrou ser capaz também de estimular a expressão do RNAm para outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , INF- γ e RANKL, enquanto a administração da TNF recombinante humana (rh-TNF- α) também foi capaz de acelerar a progressão da periodontite em ratos (**Gaspersic et al., 2003**), mostrando a grande relevância desta citocina na resposta inflamatória induzida pelos microrganismos periodontopatogênicos.

IL-1 β , uma citocina pleiotrópica, que não só exerce seus efeitos em muitas células-alvo, como também é produzida por uma variedade de células, é um dos mediadores mais importantes liberado durante o processo inflamatório da DP. Esta citocina é considerada um potente mediador da reabsorção óssea, e acredita-se que aumentos em sua produção estejam associados à perda irreversível de osso observada na DP severa (**Birkedal-Hansen, 1993; Masada et al., 1990; Stashenko et al., 1991**). Ela possui ainda a capacidade de estimular a expressão e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 por fibroblastos de gengiva humana (**Nakamura et al., 2011**).

Assim como a estimulação bacteriana leva à produção de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias extremamente importantes para a destruição tecidual observada na DP, a Ang II, o componente bioativo final do SRA, também pode contribuir para a inflamação e destruição tecidual no periodonto, como um mediador chave, exibindo características de uma verdadeira citocina nestes processos (**Marchesi et al., 2008; Suzuki et al., 2003**).

Embora existam poucos trabalhos na literatura acerca do papel do SRA na iniciação e na progressão da DP, a atividade biológica de seus componentes sugere seu potencial para contribuir com a patogênese das periodontites (**Gurkan et al., 2009**). Por isso, alguns trabalhos da literatura tentam estabelecer uma correlação entre alterações (polimorfismos) que acometem os genes que codificam as proteínas do SRA, que poderiam provocar algum tipo de alteração na produção de Ang II, e o desenvolvimento e progressão das diferentes formas de manifestação da DP. No entanto, os achados descritos até aqui apenas sugerem, de forma inconsistente, que algumas destas variações genéticas (nos genes para ANGT, ECA e AT₁), podem estar relacionadas a um maior risco para o desenvolvimento destas enfermidades (**Gurkan et al., 2009; Gurkan et al., 2009**).

Vários trabalhos publicados na presente década trazem relatos que revelam que a Ang II possui uma grande variedade de propriedades biológicas além daquelas já descritas para o controle da homeostasia da pressão arterial (**Egido, 1996; Ichikawi & Harris, 1991**).

Nesta relação de efeitos biológicos é notável que os eventos celulares relacionados às novas propriedades descritas para a Ang II possuem muita coincidência com passos chave na inflamação de cada órgão.

A resposta inflamatória engloba dois aspectos, a inflamação e o reparo. Após o estímulo ambiental (injúria primária), a resposta inflamatória põe em movimento uma complexa série de eventos com a finalidade de reconstruir o dano tecidual, por meio da resposta das células mesenquimais (resposta primária) que inclui hipertrofia, hiperplasia e produção de matriz extracelular. Depois, a injúria inflamatória (injúria secundária) inicia e sustenta o processo de cicatrização (resposta secundária), frequentemente com a formação de menos tecido cicatricial especializado. Independentemente da etiologia do estímulo primário, a inflamação universalmente possui três passos: (1) alterações vasculares (mudanças no calibre/fluxo, incremento da permeabilidade vascular); (2) extravasamento de leucócitos (adesão/transmigração, quimiotaxia); e (3) reconstituição e crescimento celular. Sabe-se que Ang II possui funções que estão relacionadas a todas estas etapas da cascata inflamatória (**Suzuki *et al.*, 2003**).

A Ang II possui ações relacionadas a todos os passos da sequência de eventos que envolvem a geração e manutenção do processo inflamatório. Ang II aumenta a permeabilidade vascular que inicia o processo inflamatório, contribui para o recrutamento de células inflamatórias e, pode ainda, ativar diretamente a infiltração de células imunocompetentes, possuindo também influência sobre a inflamação induzida imunologicamente (**Suzuki *et al.*, 2003**) (**Figura 5**).

Figura 5 – Ações da Angiotensina II na Inflamação. Ang II exerce ações que podem influenciar todas as etapas do processo inflamatório, desde a permeabilidade vascular, a infiltração de células inflamatórias ao reparo e remodelação teciduais. PG: Prostaglandina; VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular.

O aumento local da permeabilidade vascular, que resulta em infiltração celular e exsudação de fluidos ricos em proteínas, é o evento mais importante na fase inicial da inflamação. Acreditava-se que Ang II participaria da regulação da permeabilidade vascular pelos mecanismos mediados por injúrias mecânicas ao endotélio (nos estados hipertensivos). No entanto, estudos morfológicos demonstraram a discrepância entre a permeabilidade e as camadas de endotélio intactas (Ross, 1993). Além disso, evidências crescentes sustentam a idéia de que Ang II pode influenciar localmente a permeabilidade do endotélio vascular independentemente dos mecanismos relacionados a alterações hemodinâmicas, já que Ang II induz a produção de outros mediadores que também podem influenciar esta permeabilidade.

Dois candidatos, prostaglandinas (PGs) e, mais recentemente, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), podem explicar estes efeitos da Ang II. Eicosanóides (Leucotrieno C₄, PGE₂, PGI₂) são classicamente conhecidas como mediadoras da permeabilidade vascular, sendo que Ang II estimula sua síntese e pode, assim, modular a permeabilidade vascular **(Chua et al., 1998; Ferrara et al., 1992)**. Por outro lado, o VEGF, que é um potente indutor da mitogênese endotelial e um agente que atua na permeabilidade, quando induzido pela Ang II também pode contribuir para a patogênese por meio do aumento da permeabilidade vascular **(Ichikawi & Harris, 1991; Schlondorff et al., 1985; Schramek et al., 1995)**.

Neste contexto, outro estudo de nosso laboratório mostrou que a inibição da enzima cicloxigenase-2, por meio do tratamento com drogas inibidoras seletivas desta enzima (meloxicam na dose de 3mg/Kg/dia), leva à diminuição significativa da expressão do RNAm para o VEGF bem como a diminuição da perda óssea gerada pela DP induzida em ratos. Nestes animais foi possível perceber ainda que uma maior expressão da proteína VEGF era encontrada nos tecidos de animais que apresentavam um maior grau de doença instalada, sugerindo que, de fato, o VEGF possa estar relacionado à progressão da DP. No entanto, não foi investigada neste momento, sua correlação com a presença dos componentes do SRA **(Oliveira et al., 2008)**.

Outro passo crítico da reação inflamatória, que pode ser influenciado pela ação da Ang II, é o extravasamento dos leucócitos do lúmen dos vasos para o interstício. A adesão de leucócitos e a transmigração nas veias são determinadas por um processo sequencial de muitos passos que acontece entre os leucócitos e a superfície das células endoteliais **(Carlos & Harlan, 1994)**. Este processo pode ser dividido em: (1) marginação celular (rolamento e adesão); (2) transmigração; e (3) migração através de estímulos quimiotáticos **(Suzuki et al., 2003)**. Ang II pode contribuir nestas etapas para o recrutamento de células inflamatórias porque é capaz de regular a produção de moléculas de adesão e de quimiocinas por células residentes, como L-selectina, P-selectina, entre outras **(Gibbs et al., 2001; Prasad et al., 2001; Tayeh & Scicli, 1998)**. Trabalhos mostram que a infusão de Ang II causa um aumento no fluxo do rolamento, adesão e migração de leucócitos, e que esse aumento é abolido pela inibição da ação de P-selectina e pela terapia combinada com antagonistas de AT₁ e AT₂, sugerindo que Ang II induz, via ambos os receptores, a expressão de selectinas e a adesão de leucócitos **(Piqueras et al., 2000)**.

Ang II pode ainda estimular a produção de citocinas quimiotáticas como MCP-1 **(Rahman et al., 2002)**, MIP-1 α , IL-8 **(Dol et al., 2001; Suzuki et al., 2002)**, osteopontina **(Xie et al., 2001)** e RANTES **(Wolf et al., 1997)**, todas elas importantes para a atração de células imunológicas para o sítio da inflamação.

Por fim, Ang II participa ainda no processo de reparo do tecido, que é o principal resultado do processo inflamatório. Vários estudos têm discutido o envolvimento do SRA no reparo tecidual, e o que se observa é que o bloqueio do SRA diminui a fibrose e o crescimento celular, bem como a produção de proteínas da matriz extracelular, sendo que nestas funções seus efeitos parecem ser indiretos, mediados pela ação de fatores de crescimento e outras citocinas e fatores, como TGF- β , PDGF e fator ativador do plasminogênio (PAI-1) **(Egido, 1996; Mezzano et al., 2001; Wolf & Neilson, 1993)**.

Ang II, que é, portanto, de natureza pró-inflamatória, modula, como já visto, a expressão de várias moléculas como as citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, moléculas de adesão, endotelina-1, prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e ciclooxigenase-2, mostrando que de fato Ang II é uma molécula extremamente importante em todas as etapas do processo de iniciação e manutenção da inflamação, e que por este motivo pode estar de alguma forma relacionada ao desenvolvimento da DP, uma doença de caráter inflamatório, como já mostrado **(Phillips & Kagiya, 2002; Suzuki et al., 2003)**.

No mesmo trabalho realizado em nosso laboratório, no qual foi possível se observar a presença de componentes do SRA no tecido gengival de ratos, foi possível se observar também a influência de algumas drogas que afetam o SRA sobre a iniciação e a progressão da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. Quando um inibidor da enzima Renina (Alisquireno) foi administrado aos animais, na dose de 30mg/Kg/dia, por 7 ou 14 dias, a perda óssea observada foi significativamente menor do que aquela quantificada nos animais que não receberam a droga. Os mesmos achados se repetiram quando um antagonista do receptor AT₁ (Losartan) foi administrado na dose de 50mg/Kg/dia pelo mesmo período. No entanto, a ação sistêmica de uma droga inibidora da ECA (Enalapril), na dose administrada de 10mg/Kg/dia, não foi capaz de reverter o processo de perda óssea induzida por ligadura, dando indícios de uma possível ação de vias alternativas à da ECA para formação de Ang II **(Lima et al., 2011)**.

Estes dados mostram, de forma inequívoca, a influência do SRA sobre os processos de iniciação e progressão do processo inflamatório que culminam com a reabsorção do osso alveolar na DP. Portanto, uma melhor compreensão do papel do SRA, bem como dos eventos moleculares envolvidos neste processo pode proporcionar oportunidades importantes para a pesquisa clínica e para o tratamento deste processo patológico, de tanta importância para a odontologia, seja por meio do uso de drogas que afetam o SRA, ou ainda de outras drogas que afetam o processo inflamatório.

Assim, tendo em vista os trabalhos publicados na literatura que revelam a expressão de componentes do SRA nos tecidos gengivais de diferentes espécies, acredita-se que estes também possam ser expressos no tecido gengival e no ligamento periodontal humanos. Uma vez que os fibroblastos são as células mais numerosas na composição do tecido conjuntivo do periodonto, estas células podem ser as possíveis responsáveis pela expressão destas proteínas que, uma vez presentes no tecido gengival e no ligamento periodontal humanos, podem contribuir, de forma ainda não completamente esclarecida, provavelmente por meio da interferência nas diversas etapas do processo inflamatório, para uma facilitação da instalação e progressão da doença periodontal.

*P*roposição

2 Proposição

Justificativa: A Doença Periodontal é uma doença de caráter inflamatório, cuja inflamação é elicitada pela reação imunológica causada por componentes bioativos das membranas de bactérias periodontopatogênicas, como o lipopolissacarídeo (LPS) de *P. gingivalis*. Alguns tipos celulares possuem a capacidade de reconhecer e reagir a estes estímulos bacterianos, como os fibroblastos do tecido conjuntivo da gengiva e do ligamento periodontal. Esta reação dá origem a uma série de citocinas e mediadores inflamatórios, que levam à destruição dos tecidos moles e a reabsorção do osso alveolar, que culmina com a formação da lesão característica da DP, a bolsa periodontal. Assim como as citocinas podem estimular o processo inflamatório que leva à doença, angiotensina II, o peptídeo efetor do SRA, também pode influenciar de forma direta ou indireta todas as etapas da reação inflamatória. Este peptídeo pode ser formado localmente em vários tecidos, dentre eles os tecidos periodontais de várias espécies animais, e uma vez formado pode exercer sua atividade pró-inflamatória. Como existem relatos na literatura da presença de alguns dos componentes do SRA em tecidos periodontais humanos, e sabendo-se que os fibroblastos são as células mais numerosas na composição do tecido conjuntivo do periodonto, estas células podem ser as possíveis responsáveis pela expressão destas proteínas que, uma vez presentes no tecido gengival e no ligamento periodontal humanos, podem contribuir, de forma ainda não completamente esclarecida, provavelmente por meio da interferência nas diversas etapas do processo inflamatório, para uma facilitação da instalação e progressão da doença periodontal inflamatória. Portanto, uma melhor compreensão da expressão, produção e do papel do SRA presente nos fibroblastos do tecido gengival e do ligamento periodontal pode proporcionar oportunidades importantes para a pesquisa clínica e para o tratamento deste processo patológico, de tanta importância para a odontologia. Desta forma, o presente trabalho teve como **objetivos:**

Avaliar *in vitro*,

- a) A expressão de componentes do SRA (ANGT, RENINA, ECA, ECA-2, AT₁, AT₂ e Mas) por fibroblastos oriundos de biópsias do tecido gengival e do ligamento periodontal humanos, por meio de RT-q PCR;

- b) A produção de componentes do SRA (RENINA, ECA, ECA-2) no sobrenadante de culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos, por ELISA;
- c) A produção dos receptores do SRA (AT₁, AT₂ e Mas) por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos, por IMUNOFLUORESCÊNCIA;
- d) Se a expressão e a produção dos componentes do SRA por fibroblastos, de gengiva e ligamento periodontal humanos, se alteram com a estimulação por LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 - Coleta de Biópsias de Tecido Gengival e de Ligamento Periodontal Humanos

Biópsias de tecido gengival e de ligamento periodontal humanos, saudáveis, de três pacientes livres de doenças sistêmicas, foram obtidas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Clínica (LAFFIC) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, durante exodontias de terceiros molares inferiores de dentes previamente indicados para extração. As autorizações para a realização das biópsias foram feitas pelos pacientes em formulário específico devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP (Processo nº 080/2008 – COMPROVANTE ANEXO).

Após a exodontia, a superfície externa do cimento radicular foi cuidadosamente raspada com uma cureta periodontal estéril, removendo-se o tecido mole correspondente ao ligamento periodontal. Assim como o ligamento periodontal, os fragmentos de gengiva do mesmo paciente, após coletados, foram armazenados imediatamente em meio para cultura de células - *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Gibco, *Invitrogen Corporation*, Califórnia, EUA).

3.2 - Cultura Primária dos Fibroblastos Gengivais e do Ligamento Periodontal

Os tecidos coletados foram imediatamente picotados para o crescimento dos fibroblastos e imersos separadamente (gengiva e ligamento periodontal) em meio de cultura, acondicionados numa placa de Petri de 100x10 mm (diâmetro x altura) e mantidos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 1 hora.

Em seguida, os tecidos foram picotados com lâmina de bisturi 15c permanecendo imersos em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro bovino fetal, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (DMEM completo 20%). Os fragmentos de tecido foram coletados, centrifugados (200 g; 5 min; 18 °C), ressuspensos com novo meio de cultura e armazenados em garrafas para cultura de 25 cm², sendo mantidos em estufa a 37 °C e a 5% CO₂. As culturas

provenientes das biópsias foram mantidas até os fibroblastos alcançarem confluência, sendo que durante este período foram realizadas trocas do meio de cultura a cada 2-3 dias. Após atingirem confluência, os fibroblastos foram repicados e a utilização dos mesmos nos experimentos ocorreu somente a partir da 4ª passagem. Foram seguidos os protocolos para a cultura dos fibroblastos conforme estabelecido por trabalhos anteriores do laboratório (Morandini *et al.*, 2010, Morandini *et al.*, 2011).

3.3 - Estimulação dos Fibroblastos Gengivais e do Ligamento Periodontal por LPS de *P. gingivalis* e de *E. Coli*

Após a 4ª passagem, as células foram semeadas em placas de 6 poços numa quantidade de 5×10^4 células por poço e deixadas para aderirem e se multiplicarem até atingirem confluência. Meio de cultura contendo 10 µg/mL de LPS de *P. gingivalis* (Invivogen/San Diego, USA) ou de *E. coli* (Controle Positivo) (Sigma Aldrich/Saint Louis, USA) foi adicionado aos poços em triplicata num volume final de 1 mL/poço (grupo experimental). Meio de cultura somente foi adicionado aos poços, também em triplicata, num volume final de 1 mL, como controle (grupo controle) (**Figura 6**). Após 24 horas, o sobrenadante e as células foram coletados e submetidos às diferentes análises descritas a seguir.

Figura 6 – Representação esquemática da organização dos grupos experimentais de acordo com o paciente doador (MCB, TCS, RDL) tipo de tecido (Gengiva ou Ligamento periodontal) e estímulo aplicado (LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli* na concentração de 10 µg/mL/24h).

3.4 – Avaliação do efeito citotóxico do LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* sobre fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal (Ensaio de MTT)

Previamente à realização dos experimentos para verificação da expressão e produção dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina nas células, procedeu-se a avaliação da citotoxicidade dos estímulos empregados - LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* - sobre os fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. Para isso, estes foram semeados, em triplicata, em placas de 96 poços, numa quantidade de $1,25 \times 10^4$ células por poço, e deixadas em estufa a 35 °C e 5% de CO₂ por 24 horas antes da realização dos estímulos. Posteriormente as células foram estimuladas com os LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* na concentração de 10 µg/mL por 24 horas, em um volume final de 200 µl por poço (**Figura 7**).

Figura 7: Grupos experimentais delineados para a avaliação da citotoxicidade dos estímulos empregados (LPS *P. gingivalis* e *E. coli* na concentração de 10 µg/mL por 24 horas). Para comparação do efeito, grupos de fibroblastos cultivados não sofreram estimulação.

Após 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e descartados e a solução de MTT foi adicionada (2,5 difenil brometo de tetrezolium, Invitrogen). A solução foi utilizada na concentração de 5 mg/mL (5 mg de MTT diluídos em 1 mL de PBS estéril), na proporção de 20 µL da solução de MTT e 180 µL de meio de cultura, por poço, onde permaneceu incubada por um período de 4 horas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂, protegida de luz. Decorrido esse período, a solução foi retirada dos poços e descartada. Álcool isopropílico (100 µL) foi adicionado aos poços, e a placa deixada em mesa agitadora, em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após essa etapa, a placa foi levada ao leitor de microplaca (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech/ Ortenberg- Germany) com comprimento de onda ajustado para 570nm, no qual a leitura de absorbância foi realizada.

3.5 – Avaliação da Expressão e Produção de componentes do Sistema Renina-angiotensina por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados ou não por LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*

Após a verificação da ausência de citotoxicidade dos estímulos sobre as culturas de fibroblastos de ligamento periodontal e gengiva, a expressão de RNAm para os componentes do SRA – Angiotensinogênio (ANGT), Renina, Enzima Conversora de

Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), Receptores de angiotensina tipos 1 e 2 (AT₁ e AT₂) e Receptor Mas - foi avaliada por transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa. Adicionalmente, a produção das enzimas Renina, Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), foi quantificada no sobrenadante destas mesmas culturas, por ELISA e a produção dos receptores (AT₁, AT₂ e Mas) foi realizada por IMUNOFLOUORESCÊNCIA (**Figura 8**).

Figura 8 – Representação esquemática dos alvos a serem estudados nos respectivos ensaios. Nos ensaios de PCR quantitativa foi realizada a detecção de RNAm para: angiotensinogênio (ANGT), Renina, Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), receptor de angiotensina II tipos 1 e 2 (AT₁ e AT₂) e receptor Mas. Por ELISA foi realizada a quantificação no sobrenadante das culturas para as enzimas: Renina e Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2).

3.5.1 – Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados ou não por LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*

3.5.1.1 - Extração de RNA total

O RNA total foi extraído a partir de 5×10^4 células utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). A extração de RNA total foi feita pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio conforme descrito na literatura e reproduzido pelo nosso grupo (Santos et al., 2003; Morandini et al., 2010, Morandini *et al.*, 2011). Os fibroblastos foram homogeneizados e armazenados em tubos de microcentrífuga, depois incubados por 5 min a 4 °C e então um volume de 30% de clorofórmio foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo em seguida centrifugados a 13000 g por 15 minutos a 4 °C. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 300 µL e transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 600 µL de isopropanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso em TA por 10 minutos. Após centrifugação a 13000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 75% [em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%], em seguida os tubos foram agitados vigorosamente. Foi realizada uma nova centrifugação a 8000 g por 5 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se outra centrifugação, agora com 500 µL de etanol 100% a 8000 g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, para permitir a secagem das amostras, o sobrenadante foi descartado e os tubos deixados abertos em temperatura ambiente. Para ressuspender o RNA total, 12 µL de água tratada com DEPC 0,1% foram adicionados aos tubos de microcentrífuga.

3.5.1.2 - Quantificação do RNA Total e Avaliação da Qualidade do RNA Total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro, colocando-se 1 µL de cada amostra no aparelho Nanodrop® 1000

(Thermo Scientific, Wilmington, EUA). As leituras foram realizadas em comprimento de onda entre 260 (A260) e 280 nm (A280) e a concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/ μ L. A qualidade do RNA total foi considerada boa se a relação entre A260 e A280 (A260/A280) estivesse entre 1,9 e 2,1.

3.5.1.3 - Tratamento do RNA total com DNase

Para evitar a possibilidade de contaminação do RNA total por DNA genômico, procedeu-se o tratamento de todas as amostras com 1 μ g de RNA total cada com DNase (gDNase Wipeout Buffer, Qiagen, Alemanha), durante 2 minutos a 42 °C. Este procedimento foi realizado seguindo-se as orientações do fabricante, conforme documentado em trabalho do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas (**Santos *et al.*, 2009; Lima, 2011**).

3.5.1.4 - Transcrição Reversa

Imediatamente após o tratamento com DNase, a transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA foi realizada por meio do kit comercial QuatiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, 1 μ L da enzima transcriptase reversa, 4 μ L de tampão Quantscript RT e 1 μ L de RT primer foram adicionados por amostra e uma nova incubação foi realizada a 42 °C por 30 minutos seguida de 95 °C por 3 minutos num volume final de reação de 20 μ L.

3.5.1.5 - PCR quantitativa

A expressão quantitativa do RNAm para os componentes do SRA - angiotensinogênio (ANGT), Renina, Enzima conversora de angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), Receptor de Angiotensina II tipos 1 e 2 (AT₁ e AT₂) e Receptor Mas - foi analisada por meio de reações de PCR quantitativa, utilizando-se o sistema Taqman® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho ViiA7 (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA). Foram utilizados primers e sonda inventoriados disponibilizados

pela mesma empresa, listados na **Tabela 1**. Como gene constitutivo, foi utilizada a amplificação do gene para RPL13A listado na **Tabela 2**.

Foi utilizado 1 µL de cDNA, sintetizado a partir do RNA total, de cada amostra juntamente com reagentes *Taqman Gene Expression Mastermix*[®] (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA), primers e sondas como determinado pelo fabricante, com um volume final de reação de 5 µL. A reação de amplificação compreendeu 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, quarenta e cinco ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, conforme recomendado pelo fabricante. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação a um controle interno (RPL13A) e então, comparados a um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas, obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1 – Alvos da PCR quantitativa e códigos dos ensaios inventoriados (Applied Biosystems®) utilizados nos experimentos.

Alvo	Código
AGTN	Hs00982555_ m1
Renina	Hs01586213_ m1
ECA	Hs01104600_ m1
ECA-2	Hs00174179_ m1
AT₁	Hs01096942_ m1
AT₂	Hs00169126_ m1
Mas	Hs00332805_ m1

Tabela 2: Gene alvo utilizado como controle positivo

Alvo	Primers	Sonda
RPL13A	Sense CCGCTCTGGACCGTCTCAA Anti-sense CCTGGTACTTCCAGCCAACCT	(VIC) TGACGGCATCCCACCGCCCT (TAMRA) – 3'

3.5.2 – Avaliação da Produção de enzimas do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal por ELISA e dos receptores AT₁ e AT₂ e Mas por IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.5.2.1 – ELISA

3.5.2.1.1 – RENINA

A quantificação da produção extracelular de renina no sobrenadante das culturas dos fibroblastos foi realizada com o auxílio do Kit **Human Renin DuoSet® ELISA** (DY4090 - R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Placas de 96 poços foram cobertas e incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-renina (*Anti-human Renin Capture Antibody- Part 843522*) na concentração de 1 µg/mL, diluído em PBS. Após a incubação, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS contendo Tween® 20 0,05% (Wash Buffer – Catalog # WA126) e bloqueadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com solução para bloqueio fornecida com os kits (Reagent Diluent – PBS BSA 1% – Catalog # DY995). As placas, então, foram lavadas com PBS-T e incubadas, em duplicata, com os sobrenadantes coletados das células ou com quantidades conhecidas de Renina recombinante (Standard – Part 843524) (curva-padrão) durante 2 horas em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário biotinilado (*Detection Antibody – Part 843523 - Catalog # DY4090*), na concentração de 500 ng/mL diluído em PBS BSA, por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS-T e após a incubação com streptavidina-HRP (*Streptavidin-HRP - Part 890803*) por 20 minutos, protegidas da luz, as placas foram novamente lavadas e o substrato (Catalog # DY999) adicionado aos poços. Após 20 minutos de incubação, a solução de paralisação da reação (H_2SO_4 2N – # DY994) foi adicionada e as placas levadas para leitura em espectrofotômetro (ELISA microplate reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ajustado para o comprimento de onda de 450 nm.

3.5.2.1.2 – ECA

A produção da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) extracelular no sobrenadante das culturas dos fibroblastos foi realizada com o auxílio do Kit **Quantikine® Human ACE Immunoassay** (DACE00 - R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Placas de 96 poços pré-recobertos e pré-bloqueados para ECA, foram incubadas, em uma mesa agitadora, a temperatura ambiente por 2 horas, com quantidades conhecidas de ECA recombinante e com 50 µL do sobrenadante coletado das células, em duplicata.

Após esse período as placas foram lavadas por 4 vezes, com a solução de lavagem fornecida pelo kit (Wash Buffer Concentrate – Part 895003), e então incubadas com o anticorpo secundário conjugado (ACE Conjugate – Part – 892644), também sob agitação, por 2 horas. Passado este período as placas foram novamente lavadas e então, 50 µL do substrato (Substrate Solution – Part 895000 e 895001) foram adicionados a cada poço, e incubados sob proteção da luz, por 30 minutos, após os quais a reação foi paralisada por meio da adição da solução de paralisação (H₂SO₄ 2N - Part 895032). As placas foram então levadas ao espectrofotômetro para a leitura no comprimento de onda de 450nm.

3.5.2.1.3 - ECA-2

A ECA-2 produzida e secretada pelos fibroblastos no sobrenadante das culturas foi quantificada com o auxílio do kit **ACE2 (human) ELISA Kit** (AG-45A-0022EK-KI01, AdipoGenTM, Korea).

Placas pré-recobertos e pré-bloqueados para ECA-2, foram incubadas com 50 µL de amostra dos sobrenadantes, em duplicata, ou com as diferentes concentrações da proteína recombinante (Human ACE2 Standard) por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, estas foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem fornecida com o kit e então, 50 µL do anticorpo secundário (Detection antibody) foram adicionados, seguindo-se uma incubação a 37 °C por 1 hora. Novamente as placas foram lavadas por 3 vezes e 50 µL do detector (Detector 100X – HPR Labeled streptavidin) foram adicionados e incubados por 1 hora a 37 °C, sendo que depois as placas foram lavadas por 5 vezes consecutivas. Posteriormente, 50 µL da solução TMB foram adicionados aos poços e após 30 minutos protegidos da luz, estes tiveram a reação paralisada por 50µL da solução de paralisação (Stop Solution). Assim como para os outros alvos, as leituras também foram realizadas no comprimento de onda de 450nm.

3.5.2.2 - IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para análise da produção dos receptores do SRA - Receptor de Angiotensina II tipos 1 e 2 (AT₁ e AT₂) e Receptor Mas (MAS) pelos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos, foi realizada marcação por imunofluorescência para os mesmos.

Assim como nos outros experimentos realizados, as células foram semeadas com 24 horas de antecedência, desta vez numa quantidade de 10⁴ células por poço e sobre lâminas específicas para este fim (Lab-Tek™ II Chambered Coverglass – Cat No. 155409) (**Figura 9**), e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Passado este período, as células foram estimuladas, em duplicata, com LPS de *P. gingivalis*, *E. coli* (10 µg/mL por 24 horas) ou IL1-β (1 ng/mL por 8 horas) (**Figura 10**).

Figura 9: Dispositivos utilizados para cultura das células durante os experimentos de Imunofluorescência.

Figura 10: Grupos experimentais delineados para a detecção por imunofluorescência da produção dos receptores do sistema renina-angiotensina – receptor de angiotensina II tipos 1 e 2 (AT_1 , AT_2) e receptor Mas (Mas). Neste experimento as células foram estimuladas com LPS de *P. gingivalis*; *E. coli* (10 μ g/mL/24 h), IL-1 β (1 ng/mL/8 h) ou ainda, não-estimuladas (Controle).

Cabe salientar neste momento que a estimulação com IL-1 β foi realizada para que estas servissem de controle positivo para a análise da produção do receptor AT_1 , visto que, a literatura mostra que este estímulo é capaz de elevar a expressão do RNAm e a produção da proteína para um destes receptores (AT_1), de maneira dose-dependente, e que não possuíamos culturas de células disponíveis que sabidamente expressassem e produzissem os alvos buscados (Nakamura et al., 2011).

Passados os períodos de estimulação, as lâminas foram lavadas com PBS e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% (diluído em PBS 4x), por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas 3 vezes com PBS e seguiu-se uma incubação com cloreto de amônio (NaCl 50 mM) por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram bloqueadas com PBS BSA 3% (3 lavagens de 5 minutos cada). Após incubação *overnight* com os anticorpos primários anti- AT_1 (SC1173; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), anti- AT_2 (SC9040; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) ou anti-Mas (SC107718; Santa

Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) diluídos a 1:100, as lâminas foram lavadas com PBS e um novo bloqueio foi realizado com PBS BSA 3% por 15 minutos. Seguiu-se então a incubação com os anticorpos secundários específicos – para AT₁, MAS (*Fluorescein Anti-Goat IgG* (FI-5000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e AT₂ (*Fluorescein Anti-Rabbit IgG* (FI-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na diluição de 1:400 por 1 h em temperatura ambiente, protegido da luz. Após 10 lavagens (3 min cada) com PBS, as paredes que formavam os poços das lâminas foram removidas, assim como o excesso de PBS, e estas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD *Hard-Set Mounting Medium with DAPI* (H-1500; Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) e 2 lamínulas de vidro, fixadas com esmalte para unhas incolor (Risque[®]). Posteriormente, estas foram analisadas no microscópio confocal a laser (TCS model, SPE, Leica[®], Mannheim, Germany) com o auxílio de uma lente objetiva de 63x e sob um zoom de 2x.

3.6 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por meio da análise de variância à 2 criterios (ANOVA-two way) seguida do pós teste de Bonferroni. Foi adotado nível de significância de 5% para a verificação das possíveis diferenças entre os grupos.

***R**esultados*

4 Resultados

4.1 – Cultura dos Fibroblastos

A técnica para a realização de culturas primárias de fibroblastos a partir de biópsias de tecido gengival e coleta do ligamento periodontal humanos, empregada nesta tese, se mostrou passível de reprodução durante a execução do trabalho. A **Figura 11** ilustra culturas de fibroblastos de ligamento periodontal e de gengiva humanos de acordo com o tempo de cultura a partir da remoção dos tecidos da cavidade oral (7,14 e 21 dias). Imagens realizadas em microscópio óptico invertido com 100X de aumento.

Figura 11: Cultura de Fibroblastos s de Gengiva e Ligamento Periodontal humanos. Cultura primária obtida a partir de *explants* de gengiva (A,C,E) e de ligamento periodontal (B,D,F) de um único indivíduo. Aspecto dos fibroblastos de gengiva e ligamento após 7 dias (A,B) e 14 dias (C,D) do início da cultura, e em confluência aos 21 dias (E,F). Visualização em microscópio óptico invertido com aumento de 100X.

4.2 – Avaliação do efeito citotóxico do LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* sobre fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal (Ensaio de MTT)

O efeito citotóxico da estimulação com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*, numa concentração de 10 µg/mL por um período de 24 horas, sobre o crescimento de fibroblastos de ligamento periodontal e gengiva humana em cultura, foi avaliado pelo método de MTT.

Quando a viabilidade das culturas de fibroblastos, tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal, que sofreram estimulação com LPS de *P. gingivalis* ou de *E. coli* (10 µg/mL/24 h), foi comparada aquelas que não receberam estímulo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Fibroblastos tanto de ligamento periodontal quanto de gengiva dos três pacientes, não demonstraram sensibilidade ao efeito citotóxico da concentração (10 µg/mL) de ambos os LPS (*P. gingivalis* ou *E. coli*) empregados por 24 horas. A **Figura 12** ilustra os resultados da medida da atividade mitocondrial da média da triplicata experimental das culturas dos fibroblastos dos três pacientes doadores e dos dois tecidos estudados.

Figura 12: Efeito da estimulação com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* sobre a atividade mitocondrial de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. Fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal foram semeados em placas de 96 poços ($1,25 \times 10^4$ células/poço) e mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas antes da estimulação. Estes foram então estimulados, em triplicata, com LPS de *P. gingivalis* (GV LPS Pg/LP LPS Pg) ou *E. coli* (GV LPS Ec/LP LPS Ec) (ambos a 10 µg/mL/24 h), ou não sofreram estímulo (GV CLE). Valores representativos da densidade óptica média da triplicata experimental dos três pacientes. GV= gengiva; LP= ligamento periodontal; CLE= controle.

4.3-Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados ou não por LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*

A expressão quantitativa do RNAm para os componentes do SRA - Angiotensinogênio (ANGT), Renina, Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA), Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), receptor de Angiotensina II tipos 1 e 2 (AT₁ e AT₂) e receptor Mas - foi analisada por meio de reações de PCR quantitativa.

4.3.1 - Expressão de RNAm para o Angiotensinogênio

Os resultados da PCR revelaram a presença de RNAm para o Angiotensinogênio tanto nos fibroblastos oriundos de ligamento periodontal quanto de gengiva humana dos três doadores analisados. Os fibroblastos tanto de ligamento periodontal quanto de gengiva apresentaram uma expressão constitutiva de angiotensinogênio (Grupo Controle) sendo que foi observada uma tendência de maior expressão nas células da gengiva do que nas do ligamento periodontal ($P=0,053$). Esta expressão não foi aumentada de forma significativa pelo contato das células com ambos os estímulos bacterianos, já que nem o LPS de *P. gingivalis*, nem o de *E. coli* na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ por 24 horas, foram capazes de elevar os níveis do RNAm para esta proteína. Quando os tecidos foram comparados entre si (Ligamento periodontal X Gengiva) também não foram observadas diferenças significativas em relação à expressão de RNAm para nenhum dos grupos. A **Figura 13** revela os resultados da expressão gênica para angiotensinogênio das duplicatas experimentais realizadas a partir de triplicatas biológicas utilizadas para cada tecido de cada um dos três doadores.

Figura 13: Expressão de RNAm para Angiotensinogênio (ANGT) por fibroblastos humanos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de *P. gingivalis* e de *E. coli*. Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram estimulados, em triplicata, com LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli* na concentração de 10 µg/mL por 24 horas. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de Angiotensinogênio (ANGT) foi analisada por PCR quantitativa. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene constitutivo RPL13A de cada tecido.

4.3.2 – Expressão de RNAm para a Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

Com relação à expressão de RNAm para a Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA), revelou-se uma expressão constitutiva diferenciada entre os fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal. Nas células provenientes do tecido gengival foi observada uma expressão constitutiva maior de RNAm para a ECA em comparação à quantificada nas provenientes do ligamento periodontal, sendo que esta diferença mostrou-se ser estatisticamente significativa ($P < 0,01$). Quando as células dos dois tecidos (Gengiva x Ligamento Periodontal) foram estimuladas pelos LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli*, e estes foram comparadas entre si, pôde-se observar que esta diferença tornou-se ainda mais significativa ($P < 0,0001$) para ambos os estímulos.

No entanto, quando se observou, isoladamente, a influência do estímulo realizado com o LPS das bactérias *P. gingivalis* ou *E. coli*, na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ por 24 horas, nos tecidos separadamente, percebeu-se que este não foi capaz de alterar a expressão do RNAm para esta enzima, tanto nos fibroblastos do ligamento periodontal quanto da gengiva. A **Figura 14** revela os resultados da expressão gênica para ECA das duplicatas experimentais realizadas a partir de triplicatas biológicas utilizadas para cada tecido de cada um dos três doadores.

Figura 14: Expressão de RNAm para Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) por fibroblastos humanos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de *P. gingivalis* e de *E. coli*. Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram estimulados, em triplicata, com LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli* na concentração de 10 µg/mL por 24 horas. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) foi analisada por PCR quantitativa. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene constitutivo RPL13A de cada tecido. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P<0,01$) em relação ao controle do ligamento periodontal. (**) indica diferença estatisticamente significativa ($P<0,0001$) em relação aos mesmos estímulos do ligamento periodontal.

4.3.3 – Expressão de RNAm para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁)

Ao analisar a expressão do RNAm para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁) observou-se que, assim como para o ANGT e a ECA, também foi detectada uma expressão constitutiva do RNAm para este receptor em fibroblastos de ambos os tecidos, que não se alterou com a estimulação pelo LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli* na concentração de 10 µg/mL por 24 horas. Quando os tecidos que deram origem aos fibroblastos (Ligamento periodontal X Gengiva) foram comparados entre si, não houve diferença na expressão do RNAm tanto para as células do grupo controle quanto para as células dos grupos estimulados. A **Figura 15** revela os resultados da expressão gênica para AT₁ das duplicatas experimentais realizadas a partir de triplicatas biológicas utilizadas para cada tecido de cada um dos três doadores.

Figura 15: Expressão de RNAm para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁) por fibroblastos humanos de gengiva e de ligamento periodontal estimulados por LPS de *P. gingivalis* e de *E. coli*. Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram estimulados, em triplicata, com LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli* na concentração de 10 µg/mL por 24 horas. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão do receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁) foi analisada por PCR quantitativa. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene constitutivo RPL13A de cada tecido.

4.3.4 - Expressão de RNAm para Renina, Enzima Conversora de Angiotensina- 2 (ECA-2), receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT₂) e receptor Mas (Mas)

Ao analisar a expressão do RNAm para os outros componentes do Sistema Renina-angiotensina -Renina, Enzima Conversora de Angiotensina- 2 (ECA-2), receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT₂) e receptor Mas (Mas) – observou-se que, para todos os alvos, com exceção da Renina - que mostrou uma amplificação positiva, mas muito inconsistente entre as amostras e que não se alterou na presença do estímulo – não foi detectada a presença de RNAm nos fibroblastos de nenhum dos tecidos analisados (Gengiva e Ligamento periodontal). Da mesma forma, não foi observado nenhum tipo de influência do estímulo bacteriano (LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli*/ 10 µg/mL/24 h) sobre a expressão de nenhum destes alvos para nenhum dos tecidos.

4.4 – Análise da produção dos receptores AT₁, AT₂ e Mas por Imunofluorescência

Para análise da produção dos receptores do SRA – receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁), receptor de angiotensina II tipo 2 (AT₂) e receptor Mas (MAS)- fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal foram estimulados, em duplicata, com LPS de *P. gingivalis*, *E. coli* (10 µg/mL/24 h) ou IL-1β (1 ng/mL/8 h) e depois submetidos à reação de imunofluorescência com anticorpos específicos para os receptores-alvo.

4.4.1 – Imunofluorescência para o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de *P. gingivalis*, *E. coli* (10 µg/mL/24 h) e IL-1β (1 ng/mL/8 h)

Como ilustrado nas figuras a seguir, fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal dos três pacientes doadores, exibiram intensidade de fluorescência verde em sua membrana citoplasmática, compatível com a produção do receptor AT₁, quando foram estimuladas, tanto pela proteína recombinante de IL-1β (1 ng/mL/8 h), quanto pelos estímulos bacterianos [LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* (10 µg/mL/24 h)] **Figura 16**. Foi possível perceber, ainda que visualmente, uma maior intensidade de fluorescência, que não foi quantificada, nas culturas estimuladas pela IL-1β do que nas estimuladas pelos diferentes LPS. Quando se comparou a intensidade de marcação entre as células estimuladas com os diferentes LPS (*P. gingivalis* X *E. coli*), pôde-se perceber, também de forma visual e não quantificada, que as culturas estimuladas por LPS de *E. coli* apresentaram uma maior intensidade de fluorescência, assim como um maior número de células marcadas, tanto para ligamento periodontal como para gengiva, dos três pacientes, em comparação as culturas estimuladas com LPS de *P. gingivalis* e as culturas controle. Pôde-se observar em azul a marcação dos núcleos com DAPI. As imagens apresentadas são representativas dos tecidos de um único paciente, tendo em vista a similaridade de marcação apresentada pelas células dos três doadores.

Figura 16: Detecção da expressão do receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT_1) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. Para confirmação da síntese protéica do receptor AT_1 por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, foi realizada marcação por imunofluorescência. A marcação verde (FITC) indica a presença do receptor na membrana citoplasmática das células de *gengiva e ligamento periodontal (superior e inferior)*, respectivamente, e os núcleos das mesmas apresentam-se marcados em azul (marcação DAPI). (A,B) indicam os controles não estimulados, (C,D) controles positivos estimulados com IL-1 β (1 ng/mL/8 h), (E,F) culturas estimuladas com LPS de *P. gingivalis* (10 μ g/mL/24 h) e (G,H) culturas estimuladas com LPS de *E. coli*. Em (I,J), respectivos *controles negativos*. Imagens representativas de três experimentos independentes realizados com células de três pacientes. Imagens obtidas com objetiva de 63x e zoom 2.

4.4.2 - Imunofluorescência para o receptor Mas (Mas) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de *P. gingivalis*, *E. coli* (10 µg/mL/24 h) e IL-1β (1 ng/mL/8 h)

Assim como para o receptor AT₁, os fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal, dos três pacientes doadores, exibiram intensidade de fluorescência verde em sua membrana citoplasmática, compatível com a produção do receptor Mas. Esta marcação se mostrou positiva quando as culturas foram estimuladas tanto pela proteína recombinante de IL-1β (1 ng/mL/8 h) quanto pelos estímulos bacterianos [LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* (10 µg/mL/24 h)] (**Figura 17**). No entanto, em todas as situações experimentais observadas, esta marcação apresentou uma menor intensidade de fluorescência do que a visualizada para o receptor AT₁.

Quando o efeito da estimulação bacteriana sobre a produção deste receptor foi avaliado separadamente, não foi observado nenhum tipo de influência sobre nenhum dos dois tecidos. Vale lembrar que estes relatos são baseados apenas nas observações visuais realizadas, já que estas não foram quantificadas.

Figura 17: Detecção da expressão do receptor Mas (Mas) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. Para confirmação da síntese protéica do receptor Mas por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, foi realizada marcação por imunofluorescência. A marcação verde (FITC) indica a presença do receptor na membrana citoplasmática das células de **gengiva e ligamento periodontal (superior e inferior)**, respectivamente, e os núcleos das mesmas apresentam-se marcados em azul (marcação DAPI). (A,B) indicam os controles não estimulados, (C,D) controles positivos estimulados com IL-1 β (1 ng/mL/8h), (E,F) culturas estimuladas com LPS de *P. gingivalis* (10 μ g/mL/24 h) e (G,H) culturas estimuladas com LPS de *E. coli*. Em (I,J), respectivos **controles negativos**. Imagens representativas de três experimentos independentes realizados com células de três pacientes. Imagens obtidas com objetiva de 63x e zoom 2.

4.4.3 - Imunofluorescência para o receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT₂) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por LPS de *P. gingivalis*, *E. coli* (10 µg/mL/24 h) e IL-1β (1 ng/mL/8 h)

Fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal mostraram não expressar constitutivamente em sua membrana a produção do receptor de angiotensina II tipo 2 (AT₂). Pôde-se perceber também que as diferentes estimulações realizadas (LPS de *P. gingivalis*, *E. coli* e IL-1β) também não foram capazes de induzir a expressão do receptor e consequentemente, sua marcação pelo anticorpo específico.

4.5 - Detecção da produção de ECA, ECA-2 e Renina por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, estimulados ou não com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*, por ELISA

A produção das enzimas do Sistema Renina-angiotensina - Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2) e Renina - no sobrenadante das culturas de fibroblastos de ligamento periodontal e gengiva foi detectada usando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA).

A análise mostrou que tanto os fibroblastos de gengiva quanto de ligamento periodontal apesar de apresentarem uma expressão gênica positiva para as enzimas Renina e ECA, não foram capazes de secretá-las para o ambiente extracelular (sobrenadante), quando estas foram submetidas às condições experimentais testadas neste trabalho (controle não-estimulado, estímulos com LPS de *P. gingivalis* ou *E. coli* 10 µg/mL/24 h).

Discussão

5 Discussão

O Sistema Renina-angiotensina (SRA), é um sistema capaz de gerar hormônios peptídeos com grande impacto na regulação cardiovascular e na patogênese das doenças cardiovasculares. **(Tigerstedt & Bergman, 1898)** descobriram a renina há mais de 100 anos. Esta enzima produzida nos rins metaboliza um único substrato, o angiotensinogênio do plasma, para liberar o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Ang I é então convertida no octapeptídeo angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina I (ECA), que está presente principalmente nas células endoteliais pulmonares. As ações da Ang II são efetuadas por meio de sua ligação a dois receptores acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana, AT₁ e AT₂. No entanto, a maior parte dos efeitos cardiovasculares da Ang II é mediada pelo receptor AT₁ **(Bader, 2010)**. Ang II leva a um aumento no volume do sangue e na pressão arterial por estimular vasoconstrição, retenção de sódio, sede, atividade do sistema nervoso simpático e síntese e secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal. Por sua vez, o hormônio esteróide aldosterona interage com o receptor mineralocorticóide (MR) nos ductos coletores renais e aumenta os efeitos da retenção de sódio, o que também contribui para a elevação dos níveis da pressão arterial **(Thomas et al., 2008)**. Efeitos opostos, como vasodilatação e inibição da proliferação, são gerados ainda pela ação da Ang II sobre o receptor AT₂, contrabalanceando os efeitos principais deste peptídeo sobre o sistema cardiovascular **(Skrbic & Igic, 2009)**.

De fato, Ang II foi considerada por muitos anos o peptídeo efetor mais relevante deste sistema, mas na verdade, ela é somente parte de um complexo sistema fisiológico que envolve outros peptídeos bioativos, enzimas e receptores, que são capazes de exercer suas funções no sistema cardiovascular, mas também em outros sistemas e órgãos do corpo. Adicionalmente, surgiu o conceito de que o SRA opera tanto em nível sistêmico (endócrino) quanto tecidual (local, parácrino/autócrino) e nestes, opera controlando várias funções **(Dzau, 1988)**. Assim, os efeitos do SRA não relacionados ao sistema cardiovascular incluem alterações patofisiológicas associadas com crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento normal dos órgãos, reprodução e apoptose,

sendo que estas ações permanecem como foco de muitas pesquisas atuais (**Igic & Behnia, 2007**).

A descoberta de SRA “locais” capazes de gerar Ang II de forma independente do sistema endócrino estimulou a busca pela ciência de tecidos nos quais este peptídeo pudesse ser produzido e exercesse ações fisiológicas e/ou patológicas. Assim, muitos tecidos foram identificados como possíveis formadores de Ang II, como coração, cérebro, rins, paredes dos vasos, tecido adiposo, entre outros (**Paul *et al.*, 2006**), podendo então ser possível formular novas hipóteses e conceitos a respeito da funcionalidade destes sistemas locais, baseando-se em sua capacidade de gerar Ang II.

Uma das patologias que tiveram seu desenvolvimento e progressão associados de alguma forma à produção local de Ang II foi a Doença Periodontal (DP) (**Lima *et al.*, 2011; Gurkan *et al.*, 2009, 2009**) . Nesta doença, de caráter inflamatório, o contato com componentes bioativos das membranas principalmente de bactérias Gram (-), como *P. gingivalis*, inicia uma resposta inflamatória em combate ao agente infeccioso que leva à formação de uma série de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Esta produção culmina com a destruição dos tecidos de suporte dos dentes e leva à formação de uma lesão característica, chamada bolsa periodontal, o ambiente perfeito para a continuidade do processo que pode levar a perda do elemento dental.

A patogênese desta doença envolve, portanto, um processo inflamatório do qual participam elementos da imunidade inata e adaptativa. Assim, a DP se caracteriza pela destruição dos tecidos moles causada pela indução da produção de enzimas líticas e estimulação da osteoclastogênese. A formação destes osteoclastos é estimulada por fatores secretados (como as citocinas) por células inflamatórias do infiltrado que estimulam a reabsorção óssea.

Sabe-se, no entanto, que além da participação dos vários mediadores inflamatórios no processo de instalação e progressão da DP, a Ang II, o principal peptídeo efetor do SRA pode exercer um papel relevante neste processo. Nos últimos anos muitos trabalhos têm mostrado que Ang II está envolvida com eventos-chave do processo inflamatório, em sua maioria agindo como pró-inflamatória. Portanto, sua presença e atividade no tecido periodontal poderiam de alguma forma favorecer a iniciação e a progressão da inflamação e consequentemente da DP.

Adicionalmente, vale lembrar que em um trabalho recente de nosso laboratório, identificamos, em ratos, uma diminuição significativa da perda de osso alveolar quando

os animais eram tratados com drogas que afetam a produção e ação de Ang II (Alisquireno e Losartan), dando o primeiro indício de que de fato deva haver uma correlação entre o SRA local no periodonto e o processo de instalação e progressão da DP (**Lima *et al.*, 2011**).

Uma vez que se conseguiu estabelecer uma possível relação entre a ação da Ang II e a destruição dos tecidos periodontais no processo de instalação e progressão da DP, graças ao papel fundamental que ela exerce em várias etapas do processo inflamatório, viu-se a necessidade de se conhecer melhor a participação do SRA nestes tecidos. Identificar a presença destes componentes e, portanto, poder predizer sobre sua capacidade em produzir Ang II localmente permitiria estabelecer correlações mais bem fundamentadas entre a presença e atividade do SRA no tecido periodontal e a destruição tecidual observada na DP.

Uma das formas de acessar inicialmente estas informações é por meio da análise do tecido gengival como um todo como fizeram alguns dos trabalhos aqui já citados (**Berggreen & Heyeraas, 2003; Santos *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2007**), mas como se sabe que nestes tecidos, o componente celular mais abundante são os fibroblastos, a análise do comportamento deste tipo celular pode servir como ponto de partida para uma melhor compreensão do funcionamento do macroambiente onde o processo inflamatório se desenvolve, ou seja, no tecido como um todo (**Lundergan *et al.*, 1999; Ohuchi *et al.*, 2004; Ohuchi *et al.*, 2002; Segawa *et al.*, 2003**).

Quando fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal foram analisados neste trabalho foi possível observar que estas células expressam RNAm para alguns dos componentes do SRA. Foi detectada a presença do RNAm para Angiotensinogênio, ECA, e receptor para angiotensina II tipo 1 (AT₁) em ambos os subtipos de fibroblastos. No entanto, outros componentes estudados não tiveram seu RNAm detectado pela técnica de RT-PCR quantitativa, como ECA-2, receptor de angiotensina tipo 2 (AT₂) e receptor Mas (Mas), nestas mesmas células. Foi possível identificar ainda uma expressão positiva, mas inconsistente para o RNAm que codifica a enzima renina tanto nas células da gengiva quanto de ligamento periodontal. Adicionalmente, a produção das enzimas renina, ECA e ECA-2 também não foram detectadas, por ELISA, no sobrenadante das culturas tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal, assim como a marcação para expressão do receptor AT₂, por imunofluorescência. Este mesmo fato não ocorreu com a

marcação para a expressão dos receptores AT₁ e Mas, que foram positivamente identificados.

A maior parte dos trabalhos da literatura que relata a existência de componentes de SRA em tecidos ou células oriundas do periodonto, o fazem principalmente por meio da avaliação dos efeitos da Ang II sobre o tecido/célula alvo, com ou sem o bloqueio do(s) receptor(es) AT₁/AT₂ com a utilização de drogas antagonistas. Assim, estes trabalhos demonstraram a capacidade de fibroblastos de gengiva de porcos da Índia e coelhos, e de ligamento periodontal humano responder às ações da Ang II com o aumento da proliferação celular, via receptor AT₁. Dentre estes trabalhos, **(Ohuchi et al., 2004)** demonstraram ainda por Western Blot, haver a presença dos receptores (AT₁ e AT₂) nos fibroblastos de coelhos enquanto **(Souza et al., 2007)** também demonstraram a presença de AT₁ e uma leve presença de AT₂ no tecido pulpar de ratos. Posteriormente, trabalhos do nosso laboratório demonstraram a presença, por meio de RT-PCR, da mensagem para a produção dos receptores AT_{1a}, AT_{1b} e AT₂, além de outros componentes, como angiotensinogênio, ECA e Elastase-2, em tecidos e em fibroblastos de ratos, bem como a expressão protéica de alvos como Renina, AT₁ e AT₂, por imunoistoquímica **(Lima, 2011; Santos et al., 2009)**.

O único, e mais recente trabalho publicado na literatura que investiga a presença dos componentes do SRA em fibroblastos de gengiva humana, relata a presença de angiotensinogênio, Catepsina D e ECA, detectadas por meio de RT-PCR **(Nakamura et al., 2011)**. No entanto, apesar destes trabalhos utilizando fibroblastos gengivais, não existem relatos na literatura de estudos investigando a presença de quaisquer destes componentes em fibroblastos do ligamento periodontal humano, ressaltando assim, a importância do nosso trabalho, que pela primeira vez detectou, por meio de RT-qPCR e imunofluorescência, a presença de alguns dos componentes do SRA nestas células (ANGT, ECA, AT₁, Mas), bem como em fibroblastos da gengiva humana dos mesmos doadores.

O primeiro dos componentes da cascata do SRA que teve a sua presença avaliada neste trabalho foi a renina, enzima responsável pelo início da cascata de reações que culminam com a formação da Ang II. Pôde-se observar que houve uma expressão gênica positiva do RNAm para esta enzima, mas que mostrou um padrão de expressão muito inconsistente entre as amostras tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal. Além disso, a produção desta enzima, avaliada por ELISA no sobrenadante das culturas, não

foi identificada. **(Nakamura *et al.*, 2011)** em seu trabalho, observaram a expressão de RNAm desta enzima pelos fibroblastos de gengiva humana, somente quando estes eram estimulados por altas concentrações de IL-1 β (1 ng/mL), e ainda, de maneira muito fraca. No entanto, **(Santos *et al.*, 2009)**, baseados nos achados de imunoistoquímica e RT-PCR detectaram a presença da renina no tecido gengival de ratos e nos fibroblastos deste tecido e sugeriram que, a produção de renina encontrada provavelmente seria de origem local.

Algumas controvérsias no SRA tecidual se baseiam na questão da síntese local dos componentes versus a captação da circulação. Um caso em especial representa a controvérsia entre os investigadores que demonstraram a expressão de renina no coração **(Dzau, 1988; Lindpaintner & Ganten, 1991)** e aqueles que questionam a síntese local de renina **(Von Lutterotti *et al.*, 1994)** Esta controvérsia está baseada no fato de que a detecção do RNAm para renina no coração mostrou-se inconsistente, assim como neste trabalho, sugerindo que os estudos que realizavam a medição da renina no coração haviam sido baseados em artefatos de técnica devido à contaminação com renina plasmática ou com a renina ativa recaptada da circulação.

A maior parte dos estudos indica que grande parte, senão toda a renina encontrada nos sistemas locais é derivada da renina renal captada da circulação sistêmica **(Fyhrquist & Saijonmaa, 2008)**. No entanto, trabalhos mostram que a Ang II pode ser formada com ou sem a participação da renina, como por exemplo, por meio da ação da ProAng-12 em tecidos de rato **(Nagata *et al.*, 2006)**. No presente trabalho, como a análise da expressão de renina foi realizada em culturas de células, e esta só aconteceu após a 4ª passagem das culturas, pode-se afirmar que a renina detectada, de fato não é originária da captação sistêmica, sugerindo que os fibroblastos podem, mesmo que de maneira inconsistente, expressar a mensagem para a produção desta enzima.

Desta forma, este fato não ameaça o conceito de SRA local, já que outros mecanismos podem contribuir para a síntese local e ação da Ang II. Isto não exclui, portanto, a possibilidade da formação de renina no tecido gengival e no ligamento periodontal, já que, podem existir outras possíveis vias para a formação de Ang II nestes tecidos, e ainda, pode ocorrer a participação de outras células residentes ou oriundas da circulação, contribuindo com a expressão e/ou produção dos outros componentes não expressos, ou expressos de forma inconsistente, como a renina.

Outro componente fundamental para a iniciação da cascata enzimática que dá origem a formação de Ang II é o ANGT. Esta α -globulina sintetizada principalmente no fígado serve como substrato para renina na formação de Ang I. Por este motivo é importante reconhecer a presença deste componente do SRA nos tecidos e nas células, já que sua presença é fundamental no processo de formação da Ang II.

Neste trabalho, fibroblastos de gengiva e de ligamento periodontal humanos expressaram constitutivamente o RNAm para ANGT. Este fato está de acordo com relato recente da literatura, que também mostrou a expressão constitutiva do RNAm para esta proteína, sendo que o estudo foi realizado somente com fibroblastos da gengiva, enquanto neste trabalho a detecção foi realizada também nas células do ligamento periodontal dos mesmos doadores **(Nakamura *et al.*, 2011)**.

A mensagem para a formação da ECA, que classicamente converte a Ang I em Ang II, também foi encontrada nos fibroblastos tanto da gengiva quanto do ligamento periodontal humano. Dentre todos os componentes do SRA avaliados no presente estudo, somente a ECA mostrou uma expressão diferenciada entre os fibroblastos, sendo que nas células gengivais a presença desta enzima (RNAm) se mostrou significativamente maior do que nas células ligamentares. Estes são os primeiros relatos de expressão gênica diferenciada de componentes do SRA entre fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos e estão de acordo com a literatura que também mostra a expressão deste RNAm nos fibroblastos gengivais **(Nakamura *et al.*, 2011)**.

Estudos mostraram que fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humano apresentam diferenças funcionais específicas na síntese de macromoléculas e proteínas apesar de serem tipos celulares similares no crescimento e em aspectos morfológicos **(Morandini *et al.*, 2010, Morandini *et al.*, 2011)**. A diferença de expressão observada nestes trabalhos pode então ser o reflexo de sua habilidade natural em produzir esta proteína, mas tendo em vista a grande diferença observada, deve-se levar em consideração nesta análise a localização destes tipos celulares no tecido periodontal. Fibroblastos do tecido gengival são células que estão em íntimo contato com a superfície radicular e com o tecido ósseo alveolar, uma vez que se dispõe fisicamente próximo a estes tecidos. Neste ambiente a gengiva entra em contato direto com o biofilme dentobacteriano que se acumula sob a superfície dental, já que esta progride em sentido apical no processo de formação da bolsa periodontal e lá permanece aderido, exigindo do tecido uma resposta defensiva contra a imensa carga bacteriana contida no biofilme,

que acontece com a instalação do processo inflamatório do qual o SRA participa, e portanto, a maior expressão de ECA poderia estar relacionada a esta maior necessidade defensiva.

Apesar da presença do RNAm para ECA, detectado no RT-qPCR, a análise do sobrenadante das culturas dos fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal não revelaram a produção e secreção desta proteína para o ambiente extracelular *in vitro*. Esta ausência pode se dever ao fato de a ECA ser uma enzima localizada fundamentalmente na membrana celular, que pode sofrer a ação de secretases e se tornar solúvel em vários fluidos biológicos como, por exemplo, soro, plasma, fluido seminal e líquido amniótico **(Corvol & Williams, 1998)**. Assim, durante a detecção da ECA por ELISA realizada neste trabalho, esta enzima poderia ter sido produzida pelos fibroblastos e se encontrar aderida a membrana ou solúvel no meio intracelular, não sendo possível detectar sua presença no sobrenadante das culturas. Portanto, outros métodos de detecção da produção desta enzima podem ser empregados, tais como imunofluorescência, ou ainda ELISA a partir do sonicação das células em cultura, para que seja possível compreender melhor a cinética de expressão e produção desta enzima por estas células.

Apesar da existência de vias alternativas à da ECA para produção de Ang II, esta ainda é considerada a principal via enzimática responsável pela formação de Ang II a partir da Ang I e, portanto, sua presença no tecido é um forte indicativo da capacidade deste de dar origem à Ang II formada localmente.

A geração local e ação da Ang II dependem não somente das proteínas clássicas do SRA. Recentemente, vários novos componentes têm sido descritos. Uma enzima homóloga à ECA, ECA-2, foi descoberta e mostrou-se capaz de liberar a fenilalanina C-terminal da Ang II, formando Ang 1-7 **(Tipnis et al., 2000)**. Este peptídeo é o ligante do receptor acoplado à proteína G, Mas (Mas), que é expresso principalmente no cérebro e testículos, mas também nos rins, coração e vasos. O receptor Mas pode dimerizar com AT₁ formando um heterodímero que antagoniza as ações da Ang II neste receptor. Ang 1-7 interage com o receptor Mas estimulando numerosas ações protetoras como vasodilatação, geração de óxido nítrico (NO), além de possuir um efeito anti-trófico e ser capaz de amplificar a ação vasodilatadora da bradicinina. Assim, a ECA-2 é essencial nos efeitos fisiológicos do SRA nos tecidos. A atividade local desta enzima determina os níveis vasoconstrictores e pró-oxidativos da Ang II e os efeitos vasodilatadores e anti-

oxidativos do metabólito Ang 1-7 em seus receptores. Consequentemente, o eixo ECA2-Ang 1-7- receptor Mas contra-regula as ações cardiovasculares do SRA nos órgãos.

Assim, tendo em vista a importância deste eixo na manutenção do equilíbrio entre as ações pró e anti-inflamatórias da Ang II, este estudo se propôs- apesar de não existirem relatos na literatura da presença do receptor Mas nos tecidos periodontais de nenhuma espécie animal, bem como em células oriundas destes tecidos- a avaliar a expressão do RNAm para a formação desta proteína, bem como a presença do receptor na superfície dos fibroblastos de ligamento periodontal e gengiva humana.

Não foi possível detectar a presença constitutiva do RNAm para esta proteína em nenhum dos subtipos de fibroblastos estudados. No entanto, as análises por imunofluorescência revelaram marcação positiva na superfície das membranas de ambos os fibroblastos, o qual é compatível com a presença do receptor na superfície das células. Esta marcação, embora não quantificada, não pareceu apresentar padrão diferencial de expressão entre células de gengiva e ligamento periodontal.

A explicação para a ausência da mensagem para a produção constitutiva do receptor Mas nas células e a presença do receptor, ou seja, entre a ausência da expressão gênica (RNAm) e a presença do receptor (Proteína) na superfície das células pode estar relacionada ao fato de que o processo de transcrição de RNAm consiste de um passo anterior na cinética de formação da proteína, sendo possível então que, no momento da análise por PCR quantitativo o RNAm houvesse sido traduzido em proteínas que foram então detectadas pela análise de imunofluorescência.

Ainda relacionado ao eixo ECA-2-Ang 1-7- receptor Mas, também não foi possível detectar a presença do RNAm para a produção da enzima ECA-2 nas células da gengiva e do ligamento periodontal, tanto de forma constitutiva quanto após a estimulação pelos LPS. Neste caso, a produção da proteína, avaliada por ELISA no sobrenadante das culturas, também não foi detectada. A detecção desta proteína no sobrenadante de culturas de fibroblastos também não é documentada na literatura. Estes dados sugerem que talvez a ação deste eixo neste tipo celular não seja muito efetiva, ou ainda que a formação de Ang 1-7 nestas células, nas quais foi encontrado o receptor, ocorra por meio da ação de outras enzimas, como ECA e endopeptidases (**Crackower *et al.*, 2002**). Tendo em vista seu caráter de contrapor as ações de Ang II, outra hipótese que se pode supor é a de que talvez estes receptores só fossem expressos uma vez iniciado o processo inflamatório.

A ação da Ang II sobre os tecidos também é dependente de sua ligação aos seus receptores específicos, AT₁ e AT₂. A presença destes receptores já foi identificada por vários autores no tecido gengival de diferentes espécies animais, e na maior parte deles influenciando eventos celulares como proliferação e síntese de mediadores inflamatórios (**Lundergan *et al.*, 1999; Ohuchi *et al.*, 2002; Ohuchi *et al.*, 2004; Segawa *et al.*, 2003**). Apesar dos efeitos da ação de Ang II sobre seus receptores nos fibroblastos dos tecidos periodontais serem pouco conhecidas, é de fundamental importância que a presença destes receptores seja reconhecida para que se possa saber se Ang II poderá exercer seus efeitos sobre estas células.

Assim como nos trabalhos citados anteriormente, o receptor AT₁ também foi detectado pelas técnicas utilizadas neste trabalho. Por meio de RT-qPCR se identificou a presença do RNAm para este receptor nos fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal, sem diferenças entre eles. Da mesma forma, a marcação, por imunofluorescência, para a expressão deste receptor na membrana destas células também foi identificada, confirmando o fato de que, fibroblastos de gengiva e ligamento expressam e produzem o receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁).

Em relação ao receptor AT₂, não foram encontrados indícios nem da expressão do RNAm nem da expressão da proteína nos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal. Este fato deve ser observado com atenção já que a ação de Ang II sobre estes receptores gera efeitos que se contrapõem àqueles observados pela ação deste peptídeo sobre os receptores AT₁ e que poderiam minimizar os efeitos nocivos da ação de Ang II, por exemplo, no processo inflamatório da DP.

Como anteriormente visto, a Ang II é uma proteína que agindo em seus receptores, principalmente AT₁, desencadeia ações com características pró-inflamatórias que podem estar envolvidas nos mecanismos de iniciação e progressão da DP. No entanto, o fator chave para iniciar o processo inflamatório que leva à destruição dos tecidos periodontais é o íntimo contato dos tecidos com os agentes microbianos do biofilme dental. **Page e Schroder** mostraram que a reabsorção óssea cessa quando uma área > 2,5 mm é criada entre o biofilme e o osso, concluindo que quanto mais próximo o infiltrado de células inflamatórias está do osso, maior é o número de osteoclastos formados e consequentemente uma maior quantidade de osso é degradada (**Page & Schroder, 1981**).

Este fato ocorre porque neste biofilme estão contidos microrganismos considerados periodontopatogênicos. Eles possuem a capacidade de iniciar nos tecidos periodontais uma intensa resposta inflamatória que leva à produção de citocinas e mediadores inflamatórios que posteriormente desenvolvem e sustentam a inflamação **(Graves, 2008)**. Estes microrganismos considerados periodontopatogênicos são em sua maioria bactérias Gram (-), como *P. gingivalis*, que possuem em sua estrutura celular, vários componentes que podem ser reconhecidos pelas células residentes e do sistema imunológico com a finalidade de produzir uma reação de combate a invasão destes microrganismos **(Garlet et al., 2006; Wang & Ohura, 2002)**. Um destes componentes são os LPS, estrutura transmembrana da bactéria que carrega suas características de imunogenicidade.

Trabalhos mostram que LPS de *P. gingivalis* induzem diferentes tipos celulares do tecido gengival a produzir várias citocinas que estão envolvidas na regulação da inflamação durante o processo da doença **(Offenbacher, 1996)**. Este LPS induz a produção de IL-1 e TNF- α , pela produção de IL-6 **(Agarwal et al., 1995; Kent et al., 1999; Yamazaki et al., 1992)** e estas citocinas por sua vez levam à destruição óssea.

Escherichia coli também é uma bactéria Gram (-), com capacidade de exibir intensa atividade inflamatória, causando ativação celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias. A escolha pelo uso do LPS de *E. coli* como um estímulo neste trabalho se deveu, portanto, ao fato dessa bactéria também ser uma bactéria anaeróbia Gram (-) e seu LPS ser comumente utilizado em ensaios experimentais de indução de resposta imunológica e pró-inflamatória **(Liu et al., 2008)**.

Um dos tipos celulares capaz de reconhecer e reagir ao contato com estes LPS é o fibroblasto, dentre eles aqueles oriundos de gengiva humana. Vários estudos já mostraram a importância desta célula na sustentação do processo inflamatório da DP graças a sua enorme capacidade de produzir citocinas **(Garlet et al., 2007; Garlet et al., 2006; Kent et al., 1998; Morandini et al., 2010, Morandini et al., 2011)**. Ara et al., 2009 demonstraram que estas células não desenvolvem tolerância ao contato com o LPS e provavelmente produzem citocinas durante todo o tempo no qual estão em contato com o agente bacteriano, o que enfatiza ainda mais a importância destas células neste processo.

Assim como estes LPS podem estimular nestas células a produção de diversas moléculas que participam da inflamação, coube o questionamento a respeito da

capacidade destes LPS de alguma forma alterar a expressão dos componentes do SRA nos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal.

Neste estudo, anteriormente à avaliação do efeito destes LPS sobre a expressão e produção dos componentes do SRA, foi realizada a análise a atividade citotóxica das concentrações dos estímulos utilizados sobre os fibroblastos. Este experimento foi realizado no intuito de garantir que os resultados observados não haviam sido alterados pela possível morte celular que estes estímulos poderiam causar. Quando culturas de fibroblastos de gengiva e de ligamento periodontal foram estimuladas pelos LPS tanto de *P. gingivalis* quanto de *E. coli* foi observado no ensaio de MTT atividade mitocondrial compatível com a viabilidade das culturas.

A concentração utilizada foi escolhida com base em trabalhos que mostraram que a concentração de 10 µg/mL de LPS de *E. coli* quando empregada em culturas de células de polpa dental humana é capaz de causar alterações na produção de DNA e de proteína pelas células, o que era o objetivo deste trabalho, mas não a ponto de inibir a produção de ambos (Nakane *et al.*, 1995).

Assim, quando se investigou a influência da estimulação com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* sobre a expressão dos componentes do SRA, pôde-se observar que o contato das células com o LPS destes microrganismos periodontopatogênicos, apesar de ser capaz de estimular a produção de muitas substâncias por estas células, não foi capaz de estimular a expressão do RNAm para nenhuma das proteínas do SRA estudadas.

No entanto, Nakamura *et al.*, 2011 observaram por meio da análise imunohistoquímica haver uma marcação mais intensa e frequente para os receptores AT₁ nos fibroblastos gengivais oriundos de tecidos doentes/inflamados do que naqueles que se originavam de tecidos saudáveis, ou seja, naqueles que encontravam-se em contato com microrganismos, mas não discutem a possível razão da variação observada.

Cabe destacar neste momento que o estímulo empregado fez parte de um delineamento experimental muito específico. Neste trabalho foi empregada uma única concentração de ambos os estímulos (LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* /10 µg/mL) por um único período de tempo (24 horas). Este período pode ter sido muito extenso para que fosse possível detectar a mensagem para a produção destas proteínas, que poderiam após 24 horas, já haverem sido traduzidas em sua forma final.

Por fim, foi observado neste trabalho, ainda que de forma não quantificada, uma marcação mais intensa e numerosa para o receptor AT₁, nos ensaios de

imunofluorescência nos quais as células tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal eram estimuladas com LPS de *E. coli* em comparação com o LPS de *P. gingivalis*. Esta diferença pode ser justificada graças às características de imunogenicidade dos LPS de *P. gingivalis* e de *E. coli*, que são conhecidos por apresentarem diferentes atividades inflamatória. Bactérias consideradas muito agressivas como *P. gingivalis*, apresentam cinco cadeias de lipídeo A em seu LPS, o que as fazem ser cem vezes menos reativas que a *E. coli* que possui seis cadeias de lipídeo A, e portanto, é mais imunogênica (**Hashimoto et al., 2004**).

Outra observação visual deste trabalho que merece comentários é a maior intensidade de fluorescência na marcação para o receptor AT₁ observada nas culturas estimuladas pela IL-1 β do que nas estimuladas pelos diferentes LPS (*P. gingivalis* e *E. coli*). Estudos prévios demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como interleucina -1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), induzem a expressão do receptor AT₁ em diferentes tipos celulares. IL-1 β é capaz de estimular a expressão do receptor AT₁ em fibroblastos de gengiva humana, sem afetar a produção de Ang I e Ang II (**Gurantz et al., 2005; Yoshida et al., 2006**). No entanto, não existem relatos na literatura acerca da influência do estímulo com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* sobre a expressão e/ou produção deste receptor nestas células, não havendo, portanto, uma explicação para esta diferença. Pode-se somente especular que estes resultados estejam relacionados à habilidade destes estímulos em induzir a mensagem e a produção deste receptor, assim como acontece para algumas citocinas pró-inflamatórias, como descrito por **Kent et al., 1999**. Segundo estes autores, IL-1 possui maior habilidade em estimular a elevação da mensagem e da proteína de IL-6 do que o TNF- α , e este por sua vez, maior do que a dos LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* (IL-1 > TNF- α > LPS).

Tomados juntos os resultados deste trabalho e as discussões realizadas até aqui, é possível perceber que apesar dos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal terem mostrado expressar constitutivamente alguns dos componentes do SRA necessários para a formação de Ang II nos tecidos periodontais, o envolvimento e a participação destas células nos processos de iniciação e progressão da DP precisam ser mais estudados. Este trabalho serve, portanto, como um ponto de partida para a melhor compreensão da participação do SRA nesta doença incurável que acomete tantos indivíduos e desafia a ciência periodontal.

Conclusão

6 Conclusão

Nas condições de realização deste trabalho, pode-se concluir que:

- ✓ Fibroblastos de Gengiva e Ligamento Periodontal humanos, *in vitro*, expressam constitutivamente o RNAm para componentes importantes da cascata de formação da Ang II local, tais como, Angiotensinogênio, Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁), sendo que a expressão da ECA é maior nas células do tecido gengival. Estas células também produzem os receptores AT₁ e Mas, os quais estão localizados em sua membrana.
- ✓ A expressão dos componentes do SRA pelos fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal humanos não é alterada pelo contato com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* na concentração de 10 µg/mL durante 24 horas.

Apesar de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos não apresentarem todos os componentes necessários à formação de Ang II elas podem contribuir, ainda que parcialmente, com outras células do macroambiente dos tecidos periodontais, para a formação e ação locais da Ang II, inclusive nestes mesmos tipos celulares, e assim, para a instalação e progressão da DP. Por este motivo mais estudos são necessários a fim de se compreender melhor a influência deste sistema, bem como a participação dos fibroblastos nos processos de instalação e progressão da DP em humanos.

Referências

Referências

Abbas A, Lichtman A (2003). Cytokines. Cellular and molecular immunology. E Philadelphia. Saunders. **5 ed**: 243-74.

Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, *et al*. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. **J Periodont Res. 1995; 30(6):382-9.**

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, *et al*. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. **J Biol Chem. 2001; 276(52):48623-6.**

Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, *et al*. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. **J Periodont Res. 2009; 44:21-7.**

Bader M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010; 50:439-65.**

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. **Infect Immun. 1999; 67(6):2804-9.**

Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. **Braz J Med Biol Res. 2011; Sep;44(9):914-9.**

Berggreen E, Heyeraas KJ. Role of K⁺ATP channels, endothelin A receptors, and effect of angiotensin II on blood flow in oral tissues. **J Dent Res. 2003; Jan;82(1):33-7.**

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J Periodont Res. 1993; Nov;28:500-10.**

Campbell DJ (2001). Angiotensin peptides other than angiotensin II. EMaB H.R. Philadelphia, Hanley and Belfus, Inc: 9-27.

Campbell DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol.** 2003; 35(6):784-91.

Campbell DJ, Habener JF. Angiotensin gene is expressed and differentially regulated in multiple tissue of the rat. **J Clin Invest.** 1986; July;78:31-39.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocr Rev.** 2003; 24:261-271.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood.** 1994; Oct 1;84(7):2068-101.

Chai SY, Bastias MA, Clune EF, Matsacos DJ, Mustafa T, Lee JH, *et al.* Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. **J Chem Neuroanat.** 2000; 20(3-4):339-48.

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. **Biochim Biophys Acta.** 1998; Feb 4;1401(2):187-94.

Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. **J Endod.** 2004; Feb;30(2):88-91.

Corvol P, Williams TA (1998). Handbook of proteolytic enzymes. Ajea Barret. San Diego, Academic Press: 1066-1076.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**. 2002; **417(6891):822-8**.

Darveau RP, Cunningham MD, Bailey T, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, *et al.* Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. **Infect Immun**. 1995; **63(4):1311-7**.

De Mello WC. Cardiac intracrine renin angiotensin systems. Part of genetic reprogramming? **Regul Pept**. 2006; Jan 15; **133(1-3):10-2**.

Delima AJ, Karatzas S, Amar S, Graves DT. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. **J Infect Dis**. 2002; **186:511-16**.

Dinarello CA. Interleukin-1 and its bilogically-related cytokines. **Adv Immunol**. 1989; **44:153-205**.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**. 2002; Oct; **28(10):689-93**.

Dol F, Martin G, Staels B, Mares AM, Cazaubon C, Nisato D, *et al.* Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2001; Sep; **38(3):395-405**.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**. 2000; **87(5):E1-9**.

Dzau VJ. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. **J Hypertens Suppl**. 1988; Dec; **6(3):S7-12**.

Ebersole JL. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. **Periodontol** 2000. 2003; **31:135-66**.

Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. **Kidney Int.** 1996; Feb;49(2):578-97.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev.** 1992; 13(1):18-32.

Fleming I, Kohlsted T, Busse R. The tissue rennin-angiotensin system and intracellular signaling. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 2006; 15:8-13.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine.** 2008; 264:224-36.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, *et al.* The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. **Clin Exp Immunol.** 2007; 147(1):128-38.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, *et al.* Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiol Immunol.** 2006; Feb;21(1):12-20.

Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodont Res.** 2003; Apr;38(2):198-203.

Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal disease. **J Dent Res.** 1984; 63:441-51.

Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GY. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. **Circulation.** 2001; Apr 3;103(13):1746-51.

Gilthorpe MS, Zamzuri AT, Griffiths GS, Maddick IH, Eaton KA, Johnson NW. Unification of the "burst" and "linear" theories of periodontal disease progression: a multilevel manifestation of the same phenomenon. **J Dent Res.** 2003; **82(3):200-5**.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **Lancet Infect Dis.** 2002; **Mar;2(3):171-9**.

Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1982; **9(6):472-81**.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol.** 2008; **79(8):1585-91**.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol.** 2003; **74: 391-401**.

Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, *et al*. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. **J Dent Res.** 2001; **80(10):1875-9**.

Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH. IL-1beta and TNF-alpha upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. **J Mol Cell Cardiol.** 2005; **38(3):505-15**.

Gurkan A, Emingil G, Sayagan BH, Atilla G, Kose T, Baylas H, *et al*. Renin-angiotensin gene polymorphisms in relation to severe chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2009; **36:204-11**.

Gurkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, Kose T, Baylas H, *et al*. Angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensinogen (AGT), and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. **Arch Oral Biol.** 2009; **54:337-44**.

Haller H, Lindschau C, Erdmann B, Quass P, Luft FC. Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Circ Res.** 1996; Oct;79(4):765-72.

Harris J, Gomez R. Renin angiotensin system genes in kidney development. **Microsc Res Tech.** 1997; 39:211-221.

Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. **Int Immunol.** 2004; 16(10):1431-7.

Higerd TB, Vesole DH, Goust JM. Inhibitory effects of extracellular products from oral bacteria on human fibroblasts and stimulated lymphocytes. **Infect Immun.** 1978; Aug;21(2):567-74.

Ichikawi I, Harris RC. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. **Kidney Int.** 1991; Oct;40(4):583-96.

Igic R, Behnia R. Pharmacological, immunological, and gene targeting of the renin-angiotensin system for treatment of cardiovascular disease. **Curr Pharm Des.** 2007; 13(12):1199-214.

Kent LW, Rahemtulla F, Hockett RDJ, Gilleland RC, Michalek SM. Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. **Infect Immun.** 1998; 66(2):608-14.

Kent LW, Rahemtulla F, Michalek SM. Interleukin (IL) 1 and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy or periodontally diseased human gingival fibroblasts. **J Periodontol.** 1999; 70:274-82.

Leung PS, Chappell MC. A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. **nt J Biochem Cell Biol.** 2003; 35(6):838-46.

Leung SP. The Peptide Hormone Angiotensin II: Its New Functions in Tissues and Organs. **Current Protein and Peptide Science.** 2004; 5:267-73.

Lima MC (2011). O sistema renina-angiotensina da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. **Departamento de Ciências Biológicas. Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo**: 113p.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. **Circ Res.** 1991; Apr;68(4):905-21.

Listgarten MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. **J Periodont Res.** 1987; May;22(3):172-8.

Liu R, Desta T, Raptis M, Darveau RP, Graves D. Porphyromonas gingivalis and E. coli Lipopolysaccharide Exhibit Different Systemic but Similar Local Induction of Inflammatory Markers. **J Periodontol.** 2008; 79(7):1241-47.

Lundergan WP, Ferry D, Kobayashi H, Snowdowne KW. Angiotensin-II increases cytoplasmic calcium, cell number and total DNA for human periodontal ligamental cells in vitro. **J Periodontal Res.** 1999; May;34(4):223-8.

Marchesi C, Pardis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacol Sci.** 2008; 29(7):367-74.

Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodont Res.** 1990; 25 (3):156-63.

Mauad H, Cabral AM, Vasquez EC. Controle da pressão arterial / Blood pressure control. **Rev. bras. hipertens.** 1997; 4(4):206-13.

Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. **Hypertension**. 2001; 38(3Pt 2):635-8.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. **Braz Oral Res**. 2011; Apr;25(2):157-62.

Morandini ACF, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SLA, Passanezi E, Rezende MLR, *et al*. Differential Production of Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Stromal-Derived Factor-1, and IL-6 by Human Cultured Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts Challenged With Lipopolysaccharide From *P. gingivalis*. **J Periodontol**. 2010; 81(2):310-17.

Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res Commun**. 2006; Dec 1;350(4):1026-31.

Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1 β -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. **Eur J Oral Sci**. 2011; 119:345-351.

Nakane A, Yoshida T, Nakata K, Horiba N, Nakamura H. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. **J Endod**. 1995; 21(3):128-30.

Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J Clin Invest**. 2002; Jun;109(11):1417-27.

Nickenig G, Geisen G, Vetter H, Sachinidis A. Characterization of angiotensin receptors on human skin fibroblasts. **J Mol Med (Berl)**. 1997; Mar;75(3):217-22.

Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K, Pellegrin M, Hayoz D, Mazzolai L. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression comparison with irbesartan, atenolol and amlodipine. **Hypertension**. 2008; 51:1306-11.

O'Brien-Simpson NM, Pathirana RD, Walker GD, Reynolds EC. Porphyromonas gingivalis RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes penetrate gingival tissue and induce proinflammatory cytokines or apoptosis in a concentration-dependent manner. **Infect Immun.** 2009; Mar;77(3):1246-61.

Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. **Ann Periodontol.** 1996; 1:821-78.

Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, *et al.* Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 2004; Mar;137(3):281-9.

Ohuchi N, Koike K, Sano M, Kusama T, Kizawa Y, Hayashi K, *et al.* Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 2002; Aug;132(4):451-60.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1998; 9(3):248-66.

Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM, Dionísio TJ, Cestari TM, Taga R, *et al.* COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.** 2008; 79(6):1062-69.

Oparil S, Haber E. The renin-angiotensin system (first of two parts). **N Engl J Med.** 1974; 291:389-401.

Oparil S, Haber E. Renin-angiotensin system (second of two parts). **N Engl J Med.** 1974; 291:446-457.

Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodont Res.** 1991; 26(3 Pt 2):230-42.

Page RC, Schroder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. **J Periodontol.** 1981; 52:477-91.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev.** 2006; **86**:747-803.

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Regul Pept.** 1977; **43**(1-2):1-20.

Pederson ES, Harding JW, Wright JW. Attenuation of scopolamine-induced spatial learning impairments by an angiotensin IV analog. **Regul Pept.** 1998; **74**(2-3):97-103.

Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. **Curr Opin in Investigational Drugs.** 2002; **3**:569-77.

Phillips MI, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regul Pept.** 1993; **43**(1-2):1-20.

Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, *et al.* Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. **Circulation.** 2000; Oct 24;**102**(17):2118-23.

Prasad A, Koh KK, Schenke WH, Mincemoyer R, Csako G, Fleischer TA, *et al.* Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. **Am Heart J.** 2001; **142**(2):248-53.

Rahman ST, Lauten WB, Khan QA, Navalkar S, Parthasarathy S, Khan BV. Effects of eprosartan versus hydrochlorothiazide on markers of vascular oxidation and inflammation and blood pressure (renin-angiotensin system antagonists, oxidation, and inflammation). **Am J Cardiol.** 2002; **89**(6):686-90.

Re RN, Cook JL. The intracrine hypothesis: an update. **Regul Pept.** 2006; Jan 15;**133**:(1-3):1-9.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature.** 1993; **362**(6423):801-9.

Rowe DJ, Bradley LS. Quantitative analyses of osteoclasts, bone loss and inflammation in human periodontal disease. **J Periodont Res.** 1981; 16:13-9.

Santos CF, Akashi AE, Dionísio TJ, Sipert CR, Didier DN, Greene AS, *et al.* Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. **J Periodontol.** 2009; Jan;80(1):130-9.

Santos CF, Greene AS, Salgado MC, Oliveira EB. Conversion of renin substrate tetradecapeptide to angiotensin II by rat MAB elastase-2. **Can J Physiol Pharmacol.** 2004; Nov;82(11):1000-5.

Sbodio JI, Lodish HF, Chi NW. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). **Biochem J.** 2002; Feb 1;361(Pt 3):451-9.

Schlondorff D, Perez J, Satriano JA. Differential stimulation of PGE2 synthesis in mesangial cells by angiotensin and A23187. **Am J Physiol.** 1985; 248(1 Pt 1):C119-26.

Schramek H, Coroneos E, Dunn MJ. Interactions of the vasoconstrictor peptides, angiotensin II and endothelin-1, with vasodilatory prostaglandins. **Semin Nephrol.** 1995; 15(3):195-204.

Schroder HE, Lindhe J. Conditional and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. **J Periodontol.** 1980; 51:6-19.

Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiya H, Furuyama S. Angiotensin II induces prostaglandin E2 release in human gingival fibroblasts. **Life Sciences.** 2003; 72:795-803.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: Apical periodontitis and periodontal disease. **J Dent Res.** 2007; 86:306-319.

Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides**. 2009; **Oct;30(10):1945-50**.

Souza PP, Fukada SY, Cunha FQ, Costa CA, Costa-Neto CM. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. **Regul Pept**. 2007; **40(1-2):27-31**.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **J Periodontol**. 1991; **62(8):504-9**.

Suzuki Y, Gómez-Guerrero C, Shirato I, López-Franco O, Hernández-Vargas P, Sanjuán G, *et al*. Susceptibility to T cell-mediated injury in immune complex disease is linked to local activation of renin-angiotensin system: the role of NF-AT pathway. **J Immunol**. 2002; **169(8):4136-46**.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 2003; **35:881-900**.

Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, *et al*. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. **Infect Immun**. 2000; **66(6):3731-5**.

Takada H, Mihara J, Moriashi I, Hamada S Production of cytokines by human gingival fibroblasts. Periodontal disease: pathogens and host immune responses. S Hamada, SC Holt and JR McGhee. Tokyo, **Quintessence Publishing**: 265-76.

Tayeh MA, Scicli AG. Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P-selectin on the surface of endothelial cells in culture. **Proc Assoc Am Physicians**. 1998; **Sep-Oct;110(5):412-21**.

Thomas W, McEneaney V, Harvey BJ. Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron. **Steroids**. 2008; **Oct;73(9-10):979-84**.

Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und kreislauf. **Arch Physiol**. 1898; **8:223-71**.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem.** 2000; **275(43):33238-43**.

Tokuda M, Nagaoka S, Torii M. Interleukin-10 inhibits expression of interleukin-6 and -8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor-kappaB deactivation. **J Endod.** 2002; **Mar;28(3):177-80**.

Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J Dent Res.** 2003; **Feb;82(2):82-90**.

Von Lutterotti N, Catanzaro DF, Sealey JE, Laragh JH. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. **Circulation.** 1994; **Jan;89(1):458-70**.

Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** 2000; **Jul 14;273(3):1161-7**.

Wang PL, Ohura K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2002; **13(2):132-42**.

Wang PL, Sato K, Oido M, Fujii T, Kowashi Y, Shinohara M, *et al*. Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. **Arch Oral Biol.** 1998; **43(9):687-94**.

Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. **Science.** 1985; **227:640-2**.

Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. **Sci Prog.** 1995; **78(Pt 1):19-34**.

Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal growth factor. **J Am Soc Nephrol.** 1993; 3(9):1531-40.

Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, *et al.* Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. **J Clin Invest.** 1997; 100(5):1047-58.

Wright JW, Stubley L, Pederson ES, Kramár EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. **J Neurosci.** 1999; 19(10):3952-61.

Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. **Kidney Int.** 2001; 60(5):1645-57.

Yamazaki K, Ikarashi F, Aoyagi T, Takahashi K, Nakajima T, Hara K, *et al.* Direct and indirect effects of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. **Oral Microbiol Immunol.** 1992; Aug;7(4):218-24.

Yoshida H, Imaizumi T, Tanji K, Sakaki H, Metoki N, Sato Y, *et al.* Interleukin-1beta enhances the angiotensin-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 through angiotensin receptor upregulation in human astrocytes. **Brain Res.** 2006; Feb 16;1073-1074:38-47.

Zimmerman BG, Dunham EW. Tissue renin-angiotensin system: a site of drug action? **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 1997; 37:53-69.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity.** 2000; 12(2):121-7.

*A*nexo

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 080/2008

Bauru, 10 de setembro de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Expressão do sistema renina-angiotensina e de quimiocinas por fibroblastos do tecido gengival humano estimulados por lipopolissacarídeo de Porphyromonas gingivalis"**, de autoria de Bella Luna Colombini, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 27 de agosto de 2008 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos
Docente do Departamento de Ciências Biológicas