UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CAIO MÁRCIO FIGUEIREDO

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA LOCAL
NO TECIDO GENGIVAL HUMANO SADIO E COM DOENÇA
PERIODONTAL**

BAURU
2011

CAIO MÁRCIO FIGUEIREDO

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA LOCAL
NO TECIDO GENGIVAL HUMANO SADIO E COM DOENÇA
PERIODONTAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Versão Corrigida

**BAURU
2011**

Figueiredo, Caio Márcio
F469c Caracterização do sistema renina-angiotensina local no
 tecido gengival humano sadio e com doença
 periodontal. / Caio Márcio Figueiredo. – Bauru, 2011.
 127p : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.

Universidade de São Paulo.

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação 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, 02 de dezembro de 2011.

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Processo número 125/2010.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dados Curriculares

Caio Márcio Figueiredo

17 de maio de 1973
Bauru

Nascimento
Vera Maria Figueiredo

1993 - 1996

Curso de Graduação em Odontologia, na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

1998 - 2000

Curso de Especialização em Implantodontia Osteointegrada, promovido pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC), da Universidade de São Paulo.

2001 - 2005

Curso de Pós-Graduação em Periodontia, em nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

2007-Atual

Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Estomatologia e Biologia Oral, em nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

Associações

Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas
APCD/SP.

*“Você tem que ver a si mesmo no centro do processo criativo.
Você tem que aceitar a responsabilidade por todos os resultados.
Você tem que reconhecer que todo pensamento, por menor que seja, tem
consequências.
Você tem que se identificar com um eu maior do que aquele que vive aqui
e agora, neste corpo físico limitado”.*

Deepak Chopra

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida e as pessoas que colocastes em meu caminho para superação de muitos obstáculos neste plano físico.

À minha adorável e querida mãe Vera por toda a proteção e carinho por mim desde minha existência.

A meus avós Milton (in memoriam), Iracema (in memoriam) que sempre apoiaram meus anseios pelo estudo diante de quaisquer dificuldades, envolvendo-me de amor e carinho durante a infância e adolescência. Essa conquista também pertence a vocês.

Às incontáveis pessoas maravilhosas, parentes e amigas que com bondade no coração sempre me incentivaram com carinho e força dizendo prossiga e supere os obstáculos...como meu sogro Pedro (in memoriam) e minha sogra Palmira, meus amigos até hoje de São José dos Campos no tempo do colégio técnico e a todos com que trabalhei em Bauru, São Paulo e São Bernardo do Campo em consultório.....A cada um dedico esta importante etapa de minha vida.

E indubitavelmente à minha amada esposa Audrey e ao meu amado filho Vinícius, pelo apoio incondicional, compreensão, afeto, amor e carinho a mim destinados mesmo nos momentos em que não pude dar a devida atenção. A vocês, meus grandes amores, dedico este passo da minha vida.

A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade."

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS,

Ao meu prezado e querido orientador Professor Doutor Carlos Ferreira dos Santos, agradeço pela confiança em todos os momentos depositada em mim, por sua sabedoria e dedicação com que conduziu a orientação desse trabalho, pelos ensinamentos científicos e oportunidades de crescimento profissional e acadêmico durante estes anos de convivência. Seus exemplos de conquista e sucesso profissional, aliados aos conselhos sempre oportunos, gradativamente construíram em minha pessoa uma consciência mais focada e ampla, contribuindo sobremaneira para o meu engrandecimento científico e pessoal. Agradeço ainda por todos seus exemplos de respeito, humildade, justiça e trabalho em equipe num ambiente universitário de pós graduação. O meu sincero muitíssimo obrigado.

Ao Professor Doutor Eulair Passanezi, que em suas aulas fez despertar em mim a paixão pela Periodontia, agradeço pelo início da carreira acadêmica e oportunidades na Graduação, Estágio e Mestrado na Periodontia da FOB-USP. Seus ensinamentos são exemplos que ajudam na minha carreira acadêmica no Centrinho no ato de ensinar alunos e que edificaram o caminho para esse doutoramento na Biologia Oral. Ao mestre, cujo amor contagiante à Periodontia sempre foi e é exemplo de motivação profissional, minha sincera gratidão. À Doutora Selma Passanezi estendendo meus agradecimentos pelo carinho e apoio, incentivando-me a iniciar uma carreira acadêmica nos tempos de Graduação.

Aos Professores Doutores Sebastião Luis Aguiar Gregghi e Deoclécio Nahás (in memoriam), pela amizade, atenção e incentivo que sempre me dedicaram. Não posso deixar de lembrar que suas aulas de Graduação e no Mestrado motivaram-me chegar até aqui no Doutorado.

Aos Professores Doutores Heli Benedito Brosco e Maria Lúcia Rubo de Rezende, pela dedicação e carinho ao transmitir-me ensinamentos fundamentais durante a especialização de Implante no HRAC –USP (Centrinho). O meu muito obrigado.

Ao MestreProfessor Doutor Flávio Augusto Cardoso de Faria, exemplo indelével de professor na essência, por me ensinar a ter paixão e seriedade no árduo dever de transmitir conhecimento, pelos ensinamentos transmitidos e pela agradável convivência.

Aos outros professores do curso de Doutorado em Biologia Oral, por transmitirem ensinamentos complexos de Biologia molecular, que tornaram-se claros a mim que veio da área clínica.

Aos meus grandes amigos e colegas, fundamentais em meu doutoramento, Professoras Doutoradas Ana Eliza Akashi e Lucimara Neves. Aos pós graduandos Andréa Senes, Bella Luna Colombini-Ishikiriana, Carla Sipert, Ana Carolina Morandini, Karin Modena, Adriana Calvo, Rubens Maciel e Marta Cunha Lima pela paciência e incentivo nos conhecimentos laboratoriais transmitidos, por ajudas imprescindíveis em experimentos e pela nossa amizade em um período de convivência que germinou um tempo inesquecível de amizade com altíssimo coeficiente de correlação estatisticamente significativa entre nossos sonhos.

À amiga Marta Cunha Lima, pelo incentivo e amizade, meu eterno obrigado por ajudar em fases decisivas dessa tese.

Ao parceiro e amigo, grande Especialista em Laboratório Thiago José Dionísio. Elogiá-lo torna-se difícil, porque é tarefa imensurável. Sou convicto de que seu futuro é brilhante e serei eternamente grato por toda sua dedicação, eficiência e paciência na execução de todos os passos laboratoriais e na redação final desse trabalho. Meu eterno muito obrigado.

Estendo meus agradecimento ao Evandro José Dionísio, funcionário e técnico promissor que ajudou-me sobremaneira na redação da tese, com alegria e amor no que fez.

Aos competentíssimos funcionários da Farmacologia e outros Departamentos da Biologia Oral, mais recentemente na convivência: Viviane, que é uma recentee promissora Técnica de Laboratório e a Dalva Ribeiro de Oliveira extremamente prestativa.

Aos Profs. Drs. Maria Cristina de Oliveira Salgado e Eduardo Brandt de Oliveira, e a Pós-Doutoranda Cristiane Becari da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela colaboração intensa, prestativa e fundamental na elaboração deste trabalho, principalmente nas análises bioquímicas.

À Vera Rufino, desde muito tempo pelo inesquecível carinho, amizade, competência, seriedade e compreensão com que sempre me tratou e ajudou muito nesses anos de convivência. À Secretária Brilhante, imensamente eu a agradeço.

Aos Funcionários da Bioquímica e Histologia, pelo constante apoio e respeito ao profissionalismo nas fases experimentais da pesquisa.

À Professora Doutora Marília Buzalaf, pelo carinho, competência e espírito sempre elevado e nobre em um ambiente universitário, sempre abrindo-me as portas do Conhecimento e do Departamento de Bioquímica.

À Professora Doutora Thais Marchini de Oliveira, pela amizade e incentivo desde o início de nossa carreira na Odontologia, sempre ajudou-me cientificamente e com conselhos lúcidos nesse e em outros trabalhos em parceria. Sua dedicação e determinação na docência são exemplos para mim. Meu eterno muito obrigado. Estendo meus agradecimentos ao Fabrício Valarelli pelas oportunidades profissionais a mim concedidas e a grande amizade de longa data.

Ao Professor Doutor Gustavo Garlet, pela respeitosa convivência e ensinamentos em disciplinas no Curso de Doutorado. Sua extraordinária contribuição, seu brilhantismo em disciplinas relacionadas a eventos moleculares em tecidos periodontais e seu profissionalismo em orientações durante a execução da imunoistoquímica foram imprescindíveis nesse trabalho e aprofundaram meus conhecimentos de Periodontia e Biologia Oral.

Às competentes biólogas e biomédica, respectivamente, Tânia, Daniele e Patrícia, agradeço imensamente pelos excelentes ensinamentos e serviços prestados de qualidade no Laboratório de Histologia, fundamentais para execução dessa pesquisa. Aos colegas de pós-graduação da Biologia Oral, Élcia, Cadu, Gabriela e Ricardo pela imprescindível ajuda e coleguismo na transmissão de conhecimentos de histologia e imunoistoquímica.

A todos meus colegas, funcionários e Professores da Seção de Reabilitação Clínica Integrada do HRAC (Centrinho) pela compreensão no dia-a-dia e incentivo para que eu pudesse realizar o Doutorado. São eles os Professores José Fernando, João Henrique, Sueli Devides, Ana Almeida, Simone Soares, Mônica Lopes, Rosângela Cerigatto, Roberta Brosco e Flávio Amado. E as secretárias eficientes e parceiras Maria Emília Dallaqua, Adriana Cortez, Roseli dos Santos Pinto e Ivone Macedo. Muito Obrigado de coração.

À amiga Professora Doutora Carla Damante, que sempre incentivou-me a prosseguir na carreira acadêmica e compartilha generosamente seus conhecimentos de Periodontia desde as épocas do Mestrado.

Aos Professores Doutores da FOB-USP, amigos de longa data, Daniela Rios, Linda Wang (XXXII turma de Graduação FOB-USP), Roosevelt (infância), pelos incentivos em momentos de cansaço para perseverar, além de ensinamentos científicos compartilhados. Meu muito obrigado.

Ao Professor Doutor Heitor Honório pela amizade e excelente orientação da Análise Estatística desse trabalho.

Aos Professores Doutores Adriana e Eduardo Sant'ana, Eulázio e RumioTaga, José Mondelli e José Roberto de Magalhães Bastos pelas palavras de incentivo para o início de uma carreira acadêmica. Ao Professor Doutor Eduardo Batista Franco e toda a coletividade do PET, pelos maravilhosos ensinamentos universitários e de cidadania.

Aos meus amigos e praticamente irmãos Marcus e Paulo Colacino, pelo eterno laço de companheirismo e fraternal amizade.

Aos primos e tios de minha família pelo carinho e afeto de cada um.

Aos funcionários da biblioteca da FOB / USP, muitos desses tratando-me muito bem desde 1993 quando entrei na Graduação. Muito obrigado: Cybelle de Assumpção Fontes, Rita de Cássia Paglione, Valéria Cristina Trindade Ferraz, Vera Regina Casari Boccato, Ademir Padilha, Ana Paula Moço Libel, César Augusto do Amaral Campos, Maria Caetano, Jane Pimentel Nogueira e Maria José dos Santos Formenti, sempre dispostos a ajudar da melhor forma, rompendo a seriedade da pesquisa e deixando a biblioteca cada vez mais solidária e fraterna.

Aos funcionários da Pós-Graduação sempre acolhedores, amigos e compreensíveis no andamento de todos os trâmites em todo período de mestrado e doutorado.

A todos os Pacientes e Funcionários dessa nobre instituição de ensino FOB-USP que de diversas maneiras ajudaram na construção desse sonho.

À Comissão de Pós-Graduação, da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, e a todos seus funcionários.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, representada na pessoa do Prof. Dr. José Carlos Pereira, Diretor desta Faculdade.

Ao Daniel Bonné, pela atenção e carinho na formatação final deste trabalho.

.

Resumo

RESUMO

A doença periodontal (DP) compreende um grupo de lesões que afetam os tecidos periodontais de proteção (gingivite) e suporte (periodontite), envolvendo a participação de células residentes, células estruturais e mediadores inflamatórios. Pesquisas recentes do laboratório mostraram a existência de um Sistema Renina-Angiotensina (SRA) local no tecido gengival de ratos e sugeriram que o SRA pode participar do início e da progressão da DP. Portanto, os objetivos deste trabalho foram investigar no tecido gengival humano com saúde clínica (SG, n=12), com gingivite (G, n = 10) e com periodontite (P, n=12): 1) a existência e eventuais diferenças na expressão e localização dos componentes do SRA local; 2) *in vitro*, a funcionalidade deste possível SRA local quanto à formação de peptídeos do SRA. Após a coleta dos tecidos gengivais, foram utilizadas as seguintes técnicas: contagem celular de infiltrado inflamatório, reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), imunoistoquímica, ensaio fluorimétrico para medida da atividade da enzima conversora de Ang I (ECA) e cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (HPLC). Os dados foram analisados por meio de ANOVA a 1 e 2 critérios e adotado nível de significância de 5%. Houve expressão gênica de RNA_m sem diferenças estatísticas entre as três condições testadas para angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2, receptor de Ang I tipo 1(AT1) e receptor do tipo MAS. Houve imunomarcagem para os receptores de angiotensina AT1 e AT2 sem diferenças estatísticas entre as três condições testadas. Os testes fluorimétricos mostraram maior atividade da ECA nas amostras afetadas por gingivite em comparação às amostras com saúde gengival ($p<0,05$). Nos ensaios de HPLC, quando os homogenatos de tecido gengival foram incubados com Ang I, houve formação de Ang 1-7, Ang 1-9 e Ang II. Para as formações de Ang 1-7 e Ang II não houve diferenças estatísticas entre as três condições clínicas, enquanto que para Ang 1-9 houve maior formação nas amostras afetadas por periodontite em comparação às amostras com saúde gengival ($p<0,05$). Pôde-se concluir que existe um SRA local no tecido gengival humano com diferenças entre SG, G e P, com maior atividade nos tecidos gengivais acometidos pela gingivite e periodontite.

Palavras-chave: doença periodontal, sistema renina-angiotensina, inflamação

Abstract

ABSTRACT

Characterization of the local human renin-angiotensin system in healthy and periodontally-affected gingival tissue

Periodontal disease (PD) comprises a group of lesions that affect protection (gingivitis) and support periodontal tissues (periodontitis) involving the participation of resident and structural cells as well as inflammatory mediators. Recent research in our laboratory showed the existence of a local gingival renin-angiotensin system (RAS) in rats and suggested that it might participate in the initiation and progression of PD. Therefore, the aims of this study were to investigate in human gingival tissue under three conditions, clinically healthy (HG, n = 12), gingivitis (G) and periodontitis (P): 1) the existence and differences in the expression and localization of the local RAS components; 2) the *in vitro* functionality of this local RAS regarding the formation of RAS peptides. After surgical procedure the human gingival tissue was analyzed using the following techniques: inflammatory cells counting, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), immunohistochemistry, fluorimetric tests to measure Angiotensin converting enzyme (ACE) activity and reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). Data were submitted to 1 and 2 way ANOVA with significance level established at 5%. There was genic expression (mRNA) for angiotensinogen, renin, ACE, ACE2, AT1 and Mas receptors, without statistically significant difference between all the three conditions analyzed. There was positive immunostaining for AT1 and AT2 receptors in all three conditions without statistically significant difference. Fluorimetric assays showed increased ACE activity in the samples affected by gingivitis as compared to healthy controls ($p < 0.05$). In HPLC assays there was release of Ang-1-7, Ang-1-9 and Ang II after incubation of gingival tissue homogenates with Ang I. The formation of Ang-1-7 and Ang II was not statistically significant different between the three conditions whereas in periodontitis group there was an increase in Ang-1-9 formation when compared to healthy tissues ($p < 0.05$). Therefore, one can conclude that there is a local RAS in the human gingival tissues that is different between the studied conditions HG, G and P, with higher activity in gingivitis and periodontitis.

Key words: periodontal disease, renin-angiotensin system, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais componentes e vias enzimáticas do SRA.....	26
Figura 2	Distribuição de amostras gengivais conforme técnicas laboratoriais por paciente.	48
Figura 3	Principais vias enzimáticas conversoras de Ang I, Ang II e Ang 1-9.....	59
Figura 4	Aumento 40x hematoxilina-eosina – Amostra de tecido conjuntivo do grupo com saúde gengival clínica. Escassez de células inflamatórias junto à seta.	65
Figura 5	Aumento 40x hematoxilina-eosina – Amostra de tecido conjuntivo do grupo gengivite. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com predomínio de linfócitos junto à seta	65
Figura 6	Aumento 40x hematoxilina-eosina– Amostra de tecido conjuntivo do grupo periodontite. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com a presença de muitos plasmócitos junto à seta.....	67
Figura 7	Representação gráfica da contagem celular de linfócitos (A), plasmócitos (B) e somatório de linfócitos e plasmócitos (C) por área de 0,85mm ² de tecido conjuntivo gengival humano nos três grupos experimentais: saúde gengival clínica (SG), n=12; gengivite (G), n=10; e periodontite (P), n=12. * > que na saúde gengival clínica (p<0,05).....	69
Figura 8	Representação gráfica da expressão do angiotensinogênio (AGTN), renina (REN), enzima conversora de angiotensina (ECA), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), receptor AT1 (AT1) e receptor do tipo MAS (MAS) em tecidos gengivais em três condições clínicas: saúde gengival clínica (SG), n=12; gengivite (G), n=10; e periodontite (P), n=12. O gene de referência RPL13 foi utilizado para normalizar os resultados.....	72

Figura 9	Imunomarcção para receptor de angiotensina AT1 em tecido conjuntivo de espécime gengival do grupo com saúde gengival clínica. As setas indicam fibroblastos imunomarcados (corados positivamente, citoplasma com coloração amarronzada). Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	73
Figura 10	Imunomarcção para receptor de angiotensina AT2 em tecido conjuntivo de espécime gengival do grupo com saúde gengival clínica. A seta maior indica fibroblastos imunomarcados e amenor células endoteliais (corados positivamente, citoplasma com coloração amarronzada). Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	75
Figura 11	Imunomarcção para receptor de angiotensina AT1 em tecido conjuntivo de espécime gengival do grupo com gengivite. Devido ao maior número de células, são mais perceptíveis células positivamente marcadas (citoplasma coloração amarronzada) e células não marcadas (coloração azulada). Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	75
Figura 12	Imunomarcção para receptor de angiotensina AT2 em tecido conjuntivo de espécime gengival do grupo com gengivite. Presença de células do tipo inflamatória (mais arredondadas) e células do tipo fibroblastos (mais alongadas) imunomarcadas. Aumento de 100X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	77
Figura 13	Imunomarcção para receptor de angiotensina AT1 em tecido conjuntivo de espécime gengival do grupo com periodontite. Presença de células do tipo inflamatória imunomarcadas predominantemente na área de conjuntivo equivalente ao fundo da bolsa periodontal conforme indicação da seta próxima a projeção de epitélio sulcular. Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	77
Figura 14	Imunomarcção para receptor de angiotensina AT2 em tecido conjuntivo de espécime gengival do grupo com periodontite. Presença de células do tipo inflamatória (com aspecto mais arredondado do que os fibroblastos mais alongados, fusiformes). Aumento de 100X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	79

Figura 15	Representação gráfica da imunomarcação dos receptores AT1 e AT2 em células do tecido conjuntivo gengival em três grupos experimentais (n=6 em cada grupo): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite.....	82
Figura 16	Representação gráfica da imunomarcação dos receptores AT1 e AT2 em fibroblastos do tecido conjuntivo gengival em três grupos experimentais (n=6 em cada grupo): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite.....	83
Figura 17	Representação gráfica da imunomarcação dos receptores AT1 e AT2 em células inflamatórias do tecido gengival em três grupos experimentais (n=6 em cada grupo): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite.....	83
Figura 18	Representação gráfica da imunomarcação dos receptores AT1 e AT2 em células endoteliais do tecido gengival em três grupos experimentais (n=6 em cada grupo): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite.....	84
Figura 19	Representação gráfica da atividade da ECA (nmoles/mg de tecido/h de His-Leu formado) por meio do ensaio fluorimétrico após incubação do substrato Hip-His-Leu com 80µl de homogenato de tecidogengival em três grupos experimentais: saúde gengival clínica (n=12), gengivite (n=10) e periodontite (n=12). * Gengivite > Saúde gengival clínica (p=0,023), # Periodontite = Saúde gengival clínica (p=0,072).	85
Figura 20	Representação gráfica da formação de Ang 1-7 em análise por cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três grupos experimentais (n=5 em cada grupo): saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com os inibidores enzimáticos captopril (10 µM), quimostatina (100 µM), com a associação de ambos.....	86
Figura 21	Representação gráfica da formação de Ang 1-9 em análise por cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três grupos experimentais (n=5 em cada grupo): saúde gengival, gengivite e periodontite.....	87

Figura 22	Representação gráfica da formação de Ang II em análise por cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três grupos experimentais (n=5 em cada grupo): saúde gengival, gengivite e periodontite.....	89
Figura 23	Representação gráfica da quantidade de Ang I que não foi consumida em análise por cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três grupos experimentais (n=5 em cada grupo): saúde gengival, gengivite e periodontite.	90
Figura 24	Representação gráfica da formação de Ang 1-7 em análise por cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang II por 4 horas a 37°C em três grupos experimentais (n=5 em cada grupo): saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com os inibidores enzimáticos captopril (10 µM), quimostatina (100 µM), com a associação de ambos.....	91
Figura 25	Representação gráfica da quantidade de Ang II que não foi consumida na análise por cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang II por 4 horas a 37°C em três grupos experimentais (n=5 em cada grupo): saúde gengival, gengivite e periodontite..	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa.....	54
Tabela 2	Anticorpos primários e secundários utilizados para a marcação imunoistoquímica.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°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

BSA = soroalbumina bovina

cDNA = ácido desoxirribonucleico complementar

DAB = 3,3' - diaminobenzidina

DEPC = dietil pirocarbonato

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

DNA = ácido desoxirribonucleico

dNTPs = nucleotídeos (A, T, C e G)

DTT = ditionitrito

ECA = enzima conversora de angiotensina

ECA-2 = enzima conversora de angiotensina-2

EF = ensaio fluorimétrico

et al. = e colaboradores

FOB/USP = Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo

g = grama(s)

h = hora(s)

µg = micrograma(s)

Hip-His-Leu = Hipuril-Histidina-Leucina

His-Leu = Histidina-Leucina

HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho (performance)

IHQ = imunoistoquímica

mg = miligrama(s)

μL = microlitro(s)

min = minuto(s)

mL = mililitro(s)

mm = milímetro(s)

nmoles = nanomoles

NO-RT = reação em cadeia da polimerase utilizando-se RNA como molde para avaliação de possível contaminação por DNA genômico

PBS = solução salina tamponada com fosfato

qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativo

PGE₂ = prostaglandina E₂

RNA_m = RNA mensageiro

RT = transcrição reversa

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

SNC = Sistema Nervoso Central

SRA = sistema renina-angiotensina

TBS = solução salina tamponada com Tris

TDP = tetradecapeptídeo substrato de renina

TFA = ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	23
1.1	Sistema renina-angiotensina (SRA)	25
1.2	Componentes do SRA.....	26
1.2.1	Componentes do SRA precursores de Angiotensina II	27
1.2.2	Formação de Angiotensina II.....	29
1.2.3	Interação entre peptídeos vasoativos e Receptores de Angiotensina.....	32
1.3	Doença periodontal (DP) e SRA.....	34
1.3.1	Progressão da doença periodontal em humanos	34
1.3.2	Inflamação periodontal e SRA.....	35
1.3.3	Sistema renina-angiotensina local em tecidos periodontais	38
2	PROPOSIÇÃO	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Seleção de pacientes para caracterização dos grupos experimentais	47
3.1.1	Critérios de Inclusão.....	47
3.1.2	Critérios de Exclusão.....	49
3.2	Procedimentos clínicos.....	49
3.2.1	Coleta das amostras gengivais.....	49
3.3	Contagem Celular do Infiltrado Inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina-eosina	50
3.3.1	Erro do método para medida das contagens celulares em hematoxilina-eosina.....	51
3.4	Extração de RNA total das biópsias de tecido gengival	51
3.4.1	Quantificação e qualificação do RNA total	52
3.4.2	Tratamento do RNA total com DNase e transcrição reversa	52
3.4.3	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).....	52
3.5	Análise Imunoistoquímica.....	54
3.5.1	Imunomarcagem para AT1 e AT2.....	54
3.5.2	Erro do método para medida das contagens celulares nos experimentos de Imunoistoquímica	56

3.6	Medida da atividade da ECA (ensaio fluorimétrico) para amostras de homogenatos de tecidos gengivais.....	57
3.7	Medida de atividades enzimáticas por meio de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (HPLC) para as amostras de homogenatos de tecidos gengivais	58
4	RESULTADOS.....	61
4.1	Análise histológica do infiltrado inflamatório dos tecidos gengivais	63
4.2	Análise da Expressão de RNA _m de diferentes componentes (genes alvos) do Sistema Renina-Angiotensina por qPCR.....	70
4.3	Análise da Imunomarcacão dos Receptores AT1 e AT2 do Sistema Renina-Angiotensina no tecido gengival humano.....	73
4.4	Análise da Atividade da ECA.....	84
4.5	Análise da Formação de Angiotensina II (Ang II) e outros peptídeos do SRA por HPLC.....	85
4.5.1.	Atividade Enzimática usando-se Angiotensina I como substrato.....	86
4.5.1.1	Formação de Angiotensina 1-7.....	86
4.5.1.2	Formação de Angiotensina 1-9.....	87
4.5.1.3	Formação de Angiotensina II.....	88
4.5.1.4	Angiotensina I residual não consumida na reação	90
4.5.2	Atividade Enzimática com HPLC para incubação com Angiotensina II.....	91
4.5.2.1	Formação de Angiotensina 1-7.....	91
4.5.2.2	Angiotensina II residual não consumida na reação	92
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS.....	111
	ANEXO.....	125

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistema renina-angiotensina (SRA)

Presente na circulação sistêmica (TIGERSTEDT; BERGMAN, 1898; PEACH, 1977) e localmente em diversos tecidos do organismo (HOLLEMBERG 1998; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006), o SRA é um sistema biológico de ampla atuação (SKIRIBIC; IJIC, 2009; WRIGHT; HARDING, 2011). É constituído por proteínas e peptídeos dispostos em cascata enzimática fisiológica hormonal coordenada (PEACH, 1977; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; ALBINSTON et al., 2011), conforme ilustra a figura 1.

As ações hormonais do SRA funcionam endocrinamente com peptídeos vasoativos atuando como hormônios em células-alvo distantes de onde foram sintetizados. Atuam também localmente no interior dos tecidos, independente da secreção desses hormônios na circulação sistêmica, por meio de sinalizações hormonais parácrinas, autócrinas e intrácrinas (RE, 2004; ZHUO; LI, 2011).

O principal hormônio efetor do sistema é a Angiotensina II (Ang II), peptídeo vasoativo, potente vasoconstritor com papel homeostático, estimulatório sobre a secreção de aldosterona para controle de pressão arterial e remodelador de vasos sanguíneos e tecidos cardíacos. Exerce tais efeitos por meio de sua ligação com receptores específicos (PEACH, 1977; LEUNG, 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; OGURU; TSUCHIKAWA, 2009).

Efeitos múltiplos de seus agentes biológicos permitem que o SRA circulante endócrino desenvolva mecanismos homeostáticos com ações vasculares e não vasculares no organismo (CASSIS et al., 2010). As vasculares têm como alvo os sistemas cardiovascular, renal e adrenal, regulando a pressão arterial em curto e longo prazo. Tais ações se dão pelo controle do tônus vascular, da pressão e fluxo sanguíneo, da pressão da filtração glomerular nos rins, do volume de líquidos corpóreos, do balanço eletrolítico de sódio e do controle peptidérgico no sistema nervoso central sobre a maior ou menor necessidade de ingestão de água e sódio pelos indivíduos (OPARIL; HABER, 1974; NAKAMURA et al., 2011). Adicionalmente

a tais ações cardiovasculares, o sistema contribui com ações não vasculares como por exemplo na diferenciação e crescimento celular, no desenvolvimento de órgãos, no sistema reprodutor, na apoptose celular, dentre outras funções (IGIC; BEHNIA, 2007; SKIRIBIC; IGIC, 2009).

Distúrbios no SRA, principalmente atreladas às ações da Ang II, conferem a esse sistema importante papel mediador no início, desenvolvimento e manutenção de processos fisiopatológicos como a hipertensão, aterosclerose, diabetes, insuficiências renais e cardíacas (SCHINZARI, 2011).

1.2 Componentes do SRA.

A figura 1 mostra os principais componentes e vias enzimáticas do SRA.

Figura 1 – Principais componentes e vias bioquímicas enzimáticas (setas cinza) do SRA. Vias alternativas (seta cinza mais fina) refere-se à outras vias conversoras de Ang I em Ang II com enzimas diferentes da ECA. Tais enzimas dessas vias alternativas são do tipo serino-proteases e podem ser sensíveis à aprotinina ou à quimostatina. Dentre as sensíveis à quimostatina pode-se citar por exemplo quimases e elastase-2 do rato.

1.2.1 Componentes do SRA precursores de Ang II

O SRA clássico é o circulante endócrino que passou a ser desvendado a partir de 1898 por Tigerstedt e Bergman que descobriram a renina em extratos não purificados obtidos de homogenato de rins de coelho. Na época acreditavam que a renina era a substância vasopressora responsável pela hipertensão (COOK et al., 2006). Passadas algumas décadas, verificou-se que a renina não era a substância pressora verdadeira da cascata do SRA, mas sim a Ang II conforme dois grupos de pesquisadores independentes, um norte-americano e outro argentino, que começaram a desenvolver estudos mais profundos com esse peptídeo a partir de 1939 (SKIRIBIC; IJIC, 2009), fundamentados em pesquisa clássica de isquemia renal utilizada como modelo de estudo da hipertensão (GOLDBLATT et al., 1934).

Nessa época, esse peptídeo ainda não era conhecido como Ang II e sim como angiotonina pelo grupo americano (PAGE; HELMER, 1940) e hipertensina pelo grupo argentino (BRAUN-MENENDEZ; FASCILOLO; LELOIR, 1940). Essas nomenclaturas que perduraram por quase duas décadas até que por consenso em uma conferência na Universidade de Michigan - EUA, o peptídeo recebeu o nome de Angiotensina II (Ang II) em 1957 (SKIRIBIC; IJIC, 2009).

Ainda com relação à renina (EC 3.4.23.15), trata-se de glicoproteína com ação enzimática. É produzida e depois armazenada sob forma inativa denominada pró-renina e secretada sob forma ativa por células justaglomerulares da arteríola aferente dos rins (FRIIS et al., 1999). Sua secreção varia conforme necessidade homeostática, por meio de influência direta de Ang II sobre as células justaglomerulares do rim e por um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativo, denominado de alça longa, que controla a pressão arterial conforme os níveis plasmáticos de Ang II. Esse *feedback* faz com que baixas concentrações fisiológicas de Ang II e consequente queda de pressão arterial promovam no rim o aumento intrínseco na secreção de renina. E ao contrário, com aumento dos níveis de Ang II e consequente aumento da pressão arterial ocorre diminuição da secreção dessa enzima. Desta maneira o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) opera como um regulador da pressão arterial (DAVIS; ROBERTS, 1997).

Quando entra na circulação sistêmica, a renina cliva um substrato plasmático de alto peso molecular, chamado de angiotensinogênio (AGTN), purificado e sequenciado em diversos estudos (SKREGGS, 1956). Esse substrato de renina varia o tamanho de suas cadeias de aminoácidos conforme a espécie animal. No homem, o AGTN é uma proteína alfa 2 globulina e contém 452 aminoácidos. É sintetizado principalmente no fígado, mas também é expresso no sistema nervoso central, rins e em tecidos adiposos de determinadas regiões do organismo (PEACH, 1977). Sua produção é induzida endocrinamente por diversos hormônios, dentre os quais podem-se citar glicocorticóides e tireoidiano. Também existe um sistema de *feedback* da Ang II para maior ou menor produção de AGTN (BEM-ARI; GARRISON, 1988).

Após a síntese e liberação na corrente sanguínea pelo fígado, a ação enzimática da renina se dá na porção terminal amino (N) do AGTN, mais precisamente na ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos 10-11 (Leu¹⁰-Val¹¹), formando Angiotensina I (Ang I), que é um decapeptídeo (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) praticamente inativo do ponto-de-vista vasopressor (PEACH, 1977).

O decapeptídeo Ang I sempre foi considerado um precursor inativo em termos de vasoatividade significativa no sistema cardiovascular em relação a Ang II, principal efector do SRA, com respaldo em estudos laboratoriais, principalmente naqueles realizados com ensaios em fibras musculares lisas isoladas, nas quais fraquíssimas atividades da Ang I foram detectadas. Podem-se citar pesquisas com preparações isoladas de miocárdio incubadas com Ang I, que desempenhou atividade funcional em torno de 33% a 50% quando comparada às atividades de Ang II, o que aparentava ser um bom valor. No entanto, diminuíram para 1% a 2% por meio do uso de inibidores farmacológicos de enzima conversora de Ang I em Ang II. Ou seja, essas quedas de percentuais mostram que a atividade medida da Ang I era irreal, pois quase toda era em função da Ang II formada a partir de seu precursor Ang I incubado inicialmente (PEACH, 1977). Está amplamente firmado na literatura pertinente que Angiotensina I age principalmente como substrato para vias bioquímicas enzimáticas formadoras de Ang II (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

1.2.2 Formação de Angiotensina II

A Ang II, principal efetor do SRA, é formada a partir do decapeptídeo precursor Ang I por meio de enzimas proteases. A sequência de aminoácidos do octapeptídeo Ang II foi publicada justamente quando se descobriu a enzima conversora de Angiotensina I (ECA; EC 3.4.15.1) (SKREGGS et al., 1956), considerada como a enzima principal ou clássica de conversão de Ang I, e que foi constatada no rim, coração, pulmão, cérebro, plasma sanguíneo e células endoteliais da maioria dos mamíferos. Dentre esses tecidos, é muito expressa no rim e principalmente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos do pulmão (PEACH, 1977), e apresenta-se sob a forma insolúvel presa nas membranas celulares apenas pela porção terminal carboxílica de sua cadeia de aminoácidos. Logo, a Ang II é formada em grande parte no pulmão, mas também no próprio plasma sanguíneo devido à presença de ECA circulante na forma solúvel (ERDÖS; SKIDGEL, 1986) e também em muitos outros tecidos, como por exemplo endotélio vascular (CALDWELL et al., 1976; RYAN et al., 1976), cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais (HALL et al., 1976; ERDÖS; SKIDGEL, 1986; SCHULZ et al., 1988), uma vez que o SRA não é apenas circulante, mas também local tecidual (ZHUO; LI 2011).

Na conversão de Ang I em Ang II, ocorre uma reação de hidrólise, na qual a ECA, que é uma ectoenzima remove da porção terminal carboxílica da Ang I com 10 aminoácidos (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) o dipeptídeo His-Leu, liberando o octapeptídeo ativo Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸), com potente atividade vasoconstritora (PEACH, 1977). A ECA também cliva na porção carboxílica da bradicinina, o peptídeo Phe-Arg, o que lhe confere a habilidade de ativar um agente vasoconstritor e ao mesmo tempo inativar um importante vasodilatador da cascata de ativação do cininogênio ou calicreína, no caso a bradicinina (DAVIES; ROBERTS, 1997).

Atualmente é bem estabelecido na literatura que existem outras vias bioquímicas alternativas à ECA para formar angiotensina II a partir de seu precursor angiotensina I. Uma delas é pela via da ECA-2, enzima homóloga à ECA (DONOUGHE et al., 2000). Essa enzima, trata-se de zinco-metaloprotease com

atividade de exopeptidase, do tipo carboxipeptidase e está envolvida na geração de peptídeos de angiotensina chamados alternativos (INGELFINGER, 2009) e que vêm sendo mais estudados nas pesquisas do SRA nos últimos anos, por expandir o conceito de sistema independente local em diversos órgãos, uma vez que peptídeos menores que Ang II antes pensados ser inativos, como por exemplo Ang 1-7 e Ang 1-4, têm-se mostrado ser ativos na proteção do organismo, desempenhando múltiplas funções conforme amplas revisões de literatura (INGELFINGER, 2009; BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011).

A principal função da ECA-2 é converter Ang II em Ang 1-7, porém ela também é capaz de converter Ang I em Ang 1-9 (ver Figura 1). Está presente em vários tipos celulares, dentre os quais pode-se citar células endoteliais e musculares lisas (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006), sendo sugerida como um importante regulador das funções cardíacas e do desenvolvimento. (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). Concordam com esses achados amplas revisões de literatura que colocam o binômio ECA-2 e peptídeo Ang 1-7 estabelecendo um efeito contrário ou contra-regulatório com os efeitos do binômio ECA e Ang II, pois o peptídeo Ang 1-7 estabelece ações anti-inflamatórias, anti-proliferativas e vasodilatadoras (INGELFINGER, 2009; SKRIBIC; IJIC, 2009; WRIGHT; HARDING, 2011).

Além da ECA-2, uma série de pesquisas já comprovaram a existência de outras vias conversoras de Ang I em Ang II com outras enzimas alternativas à ECA (ver Figura 1), mais especificamente denominadas de enzimas do tipo serino-proteases que podem ser sensíveis à aprotinina ou à quimostatina (URATA; NISHIMURA; GANTEN, 1995; ARAKAWA 1996; HOLLENBERG; FISHER; PRICE, 1998). O que as caracterizam como via alternativa é o fato dessas enzimas não sofrerem inibição mediante os inibidores ou inativadores farmacológicos da ECA (URATA et al, 1990a), como por exemplo o captopril.

Vias alternativas sensíveis à quimostatina merecem nossa atenção, uma vez que determinados estudos revelaram maior participação de quimases (um tipo de enzima sensível à quimostatina) do que outras enzimas também sensíveis à quimostatina, tais como catepsinas e toninas, na conversão de angiotensinas I

devido à sua alta especificidade ao substrato ou até mesmo em determinadas situações com atividade maior do que a da ECA (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Exemplificando o exposto acima, pode-se citar um estudo com homogenatos de coração humano, nos quais os autores observaram que aproximadamente 80% da formação total de Ang II associava-se à presença de uma serino-protease que até então era desconhecida, enquanto a atividade formadora de Ang II dependente da ação da ECA mostrou-se responsável somente por aproximadamente 11% da formação total de Ang II. Esta serino-protease cardíaca foi purificada e identificada como um novo membro da família quimase e recebeu a nomenclatura de quimase do coração humano (URATA et al., 1990b).

Outra importante serino-protease que merece atenção é a elastase-2 do rato, glicoproteína com 28,5kDa de massa molecular e com propriedades enzimológicas diferentes da ECA, mas com similaridades por exemplo com a quimase do coração humano dentre outras enzimas. Esta enzima foi purificada em estudo com o uso de combinação de cromatografias de filtração e afinidade que avaliaram leito arterial mesentérico isolado de rato (LAM), e desta forma foi denominada de elastase-2 do leito arterial mesentérico de rato (E-2LAMR). Comprovou-se nesse estudo que a elastase-2 do rato foi insensível ao captopril (inibidor seletivo da ECA), mas foi sensível à quimostatina e foi capaz de gerar Ang II a partir dos precursores de Ang I e de tetradcapeptídeo substrato de renina (TDP) (PAULA et al, 1998).

As propriedades da E-2LAMR foram caracterizadas bioquímica, funcional e molecularmente em estudo com ratos. Nesse estudo o cDNA da E-2LAMR foi sequenciado e similaridades enzimológicas entre a E-2LAMR e elastases-2 pancreáticas foram ratificadas, o RNA mensageiro (RNA_m) da E-2LAMR foi expresso em leito arterial mesentérico (LAM), pâncreas, pulmão, coração, rim, fígado e baço, e notou-se que essa enzima é sintetizada em células endoteliais do LAM. Concluiu-se que a E-2LAMR desempenha fundamental papel no sistema cardiovascular do rato como agente formador de Ang II sem degradá-la (SANTOS et al., 2004).

1.2.3 Interação entre peptídeos vasoativos e Receptores de Angiotensinas

A Ang II é um potente e mais importante mediador do sistema renina-angiotensina. Em adição aos seus efeitos no sistema cardiovascular e renal, à mediação do início e desenvolvimento de patologias como aterosclerose, diabetes, doenças renais e cardiovasculares crônicas e hipertensão, tem-se demonstrado que a Ang II está implicada em outros envolvimento orgânicos endócrinos, tais como o controle dos ciclos de hormônios sexuais e reprodutivos, e relacionados aos hormônios da glândula pituitária. Também está envolvida em outras funções, tais como mitogênese de fibroblastos da pele, síntese de DNA por células do ligamento periodontal, regulação da osteogênese, crescimento celular, apoptose, geração de espécies reativas ao oxigênio, secreção hormonal, ações pró-fibrogenéticas, tônus vascular e indução da liberação de prostaglandina E_2 (PGE_2) em fibroblastos gengivais humanos (HIRUMA et al., 1997; HAGIWARA et al., 1998; LEUNG, 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

A Ang II possui interações com diferentes tipos de receptores, conhecidos como AT₁ e AT₂. Os subtipos de receptores AT₁ e AT₂ apresentam estruturas genômicas, localizações, expressão de RNA mensageiro (RNA_m) e regulação específicas para cada tecido. Os resultados apresentados pela literatura pertinente apontam para o fato de que todas essas ações biológicas estão sob o controle do receptor de angiotensina do tipo 1 (AT₁), principalmente na ligação Ang II-AT₁R. As funções da Ang II, tais como constrição vascular, proliferação celular e liberação da aldosterona são conhecidas por serem mediadas via receptores AT₁. O AT₁ é um subtipo da família de receptores ligados à proteína G com sinalização intracelular via fosfolipase C e cálcio. Possui 7 regiões transmembrânicas com 359 aminoácidos, possibilitando que ligantes de angiotensinas se liguem na porção extracelular desse receptor e induzam mudanças conformacionais desses receptores que ativam a proteína G, que induz cascatas de sinalização intracelulares. Tal receptor é mediador da angiogênese e possui propriedades vasoconstritoras bem definidas (DE GASPARO et al., 2000; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

Um segundo subtipo de receptor, o AT₂, também está envolvido no controle da pressão sanguínea, função renal e remodelação vascular. O receptor AT₂ tem 363 aminoácidos, possuindo propriedades vasodilatadoras e inibindo a angiogênese (SPETH et al, 1995; DE GASPARO et al, 2000; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

Além da Ang II, que tradicionalmente foi considerada como produto final do SRA e se liga a esses receptores principais em humanos, AT₁ e AT₂, evidências científicas acumuladas reportam para outros peptídeos, derivados ou produzidos a partir da clivagem de Ang I e Ang II (DAUGHERTY et al, 2010).

Dentre esses temos Ang III, Ang IV, Ang 1–7, Ang 1-9. Desses quatro tipos, os três últimos têm maior importância biológica, principalmente Ang 1-9 e Ang 1-7 (WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008). Ang IV ou Ang 3-8 (Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸) interage, conforme evidências com um receptor nomeado de AT₄, com sítio de ligação de alta afinidade (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006) e que está relacionado à consolidação da memória, fluxo sanguíneo, reabsorção tubular renal e proliferação celular (WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

Além dos receptores AT₁, AT₂ e AT₄, também não se pode esquecer do receptor do tipo MAS, relacionado ao protooncogene Mas originalmente relatado como um fator relacionado à oncogênese. Também acoplado à proteína G, trata-se de receptor funcional de angiotensinas (JACKSON, et al., 1988). Os efeitos do receptor Mas podem ser mediados por Ang 1-7, o que sugere alguma relevância funcional *in vivo* (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; SKIRIBIC, IJIC 2009).

A angiotensina 1-7 (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) é um componente ativo do SRA, heptapeptídeo amino-terminal sintetizado a partir da Ang I por ação de endopeptidases neutras, ou seja, por uma via independente da ECA (SANTOS; COMPAGNOLE-SANTOS, 1994). A ECA também tem sido envolvida no metabolismo e quebra da Ang 1-7, sugerindo uma interação entre diferentes sistemas de peptídeos cardiovasculares. A Ang 1-7 tem ações contrárias, ou seja contra-regulatórias à Ang II, como a proliferação celular da Ang II e ações anti-proliferativas da Ang 1-7, e efeitos vasoconstritores da Ang II e vasodiladores da Ang 1-7 (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Por sua vez, a angiotensina 1-9 (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹) trata-se de peptídeo com fraca atividade biológica (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006), acreditando-se que seja inativa até o momento em que a ECA a clive e libere o peptídeo Ang 1-7. Em concentrações micromolares, Ang 1-9 inibe a ECA e aumenta os efeitos da bradicinina em seu receptor B₂ (MARCIC et al., 1999).

1.3 Doença periodontal (DP) e SRA

1.3.1 Progressão da doença periodontal em humanos

Entre os processos inflamatórios e infecciosos que afetam a dentição humana, as doenças periodontais são as mais comumente observadas. É bem documentado que de 5% a 15% de qualquer população sofre de periodontite generalizada, apesar da periodontite moderada afetar a maioria dos adultos (OLIVER; BROWN; LÖE, 1998). Tais doenças fazem parte de um grupo de processos patológicos que afetam os tecidos que circundam e suportam os dentes em seus alvéolos (LÖE, 1993). Quando essas doenças acometem apenas os tecidos periodontais de proteção (tecidos gengivais), denominam-se gengivites. Caso progridam para os tecidos periodontais de suporte (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), denominam-se periodontites, com períodos de destruição do aparato de inserção do dente intercalados por períodos de remissão destes ciclos destrutivos, sendo responsáveis por grande parte da perda dentária na dentição humana (FLEMMIG, 1999).

A gengivite não pode ser considerada como uma forma precoce de periodontite (PAGE, 1986), pois existem indivíduos com quadros de gengivite que não progridem para periodontite (LISTGARTEN, 1987). Por outro lado, também é fato que toda periodontite, sem bolsas periodontais pré-existentes, é sempre precedida por quadros de gengivite (HAFFAJEE et al, 1983). Desta forma, gengivite e periodontite vêm sendo classificadas clinicamente como doenças distintas (ARMITAGE, 1999), porém não podendo ser separadas quanto aos aspectos fisiológicos e inflamatórios que regem início, desenvolvimento e progressão da doença periodontal em seres humanos. O principal fator etiológico da doença

periodontal é a presença da placa dentobacteriana, que se acumula sobre a superfície dentária, ao nível e apical a margem gengival. Este acúmulo geralmente causa inflamação, que dependendo da severidade e extensão, causa destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar. Com a progressão da doença, os tecidos moles separam-se da superfície dentária, podendo ou não ocorrer migração do epitélio juncional para apical, com possível formação de bolsa gengival e acúmulo de infiltrado inflamatório (WILSON, 1995; VAN DYKE; SERHAN, 2003).

1.3.2 Inflamação periodontal e SRA

Os envolvimento que ocorrem entre microbiota da placa dentobacteriana e hospedeiro no início e desenvolvimento da doença periodontal (DP) promovem a liberação de vários mediadores inflamatórios e imunológicos (PAGE, 1991; EBERSOLE, 2003), de maneira constante caracterizando a cronicidade das enfermidades periodontais (LISTGARTEN, 1987; DELIMA; VAN DYKE, 2003).

Independente do tecido, seja ele periodontal ou não, qualquer processo inflamatório contempla alterações vasculares, extravasamento de células inflamatórias, reorganização tecidual seguida de crescimento celular para reparo, fibrose ou dano. Na fase inicial da inflamação, ocorre aumento local da permeabilidade vascular, resultando em infiltração celular e exsudação de fluido rico em proteínas (SUZUKI et al., 2003).

Nesse contexto, as células inflamatórias exsudadas para o interior de tecidos podem conter diferentes componentes do sistema renina-angiotensina (SRA), podendo produzir angiotensina (Ang) II (GOMEZ et al, 1993) e também fatores envolvidos na angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BOOTH et al., 1998; SUTHIN et al., 2003). É muito importante a interação entre o VEGF e o SRA na indução da angiogênese (OTANI et al., 1998; SAIJONMAA et al., 2001; AMARAL et al., 2001; SUZUKI et al., 2003; ZHAO et al., 2004). Tem sido mostrado que Ang II potencializa a atividade angiogênica induzida pelo VEGF em células endoteliais de retina bovina (OTANI et al., 1998). Por outro lado, ampla evidência sugere que sinais mediados pelo VEGF são essenciais na angiogênese

induzida pela Ang II *in vivo* e na migração/proliferação endotelial *in vitro* (ZHAO et al., 2004). Pesquisas experimentais e clínicas revelaram que o VEGF induzido pela Ang II pode contribuir para a patogênese de processos inflamatórios por meio do aumento da permeabilidade vascular (SUZUKI et al., 2003). Além disso, Saijonmaa et al. (2001) demonstraram que o VEGF aumenta os níveis de RNA_m e de proteína da ECA em cultura de células endoteliais humanas.

Evidência *in vivo* de um papel essencial do VEGF na patogênese da inflamação e remodelamento vasculares induzidos pela infusão de Ang II foram constatados. Os autores observaram que a expressão de VEGF e de seus receptores mediada pela Ang II tem um efeito biológico na indução da inflamação vascular e infiltração de monócitos e proliferação de vasos, além de gerar alterações estruturais vasculares (ZHAO et al., 2004).

Desta forma, considerando-se os relatos recentes de que Ang II induz a expressão de VEGF e de seus receptores em células endoteliais (SUZUKI et al., 2003; ZHAO et al., 2004) e que, de maneira controversa, a indução de ECA pelo VEGF pode levar a um aumento na produção local de Ang II (SAIJONMAA et al., 2001), sugere-se que o sinergismo entre VEGF e o SRA possa ser um mecanismo importante na angiogênese em tecidos inflamados.

Além das fortes evidências descritas da interação entre as células inflamatórias e o SRA, o exsudato inflamatório que envolve tal infiltrado celular, trata-se de fluido extremamente rico em elementos protéicos, o que também merece atenção, à medida que o SRA é composto de proteínas e peptídeos.

A Ang II, o principal peptídeo ativo do SRA, além de ser um mediador fisiológico do sistema circulatório, é reconhecida como um fator de crescimento que regula o crescimento celular e fibrose (SHINZARI, 2011).

Um grande número de estudos tem demonstrado que a Ang II está envolvida em eventos-chave da inflamação, sendo capaz de induzir dano vascular independente dos efeitos hemodinâmicos de indução da remodelação vascular e disfunção endotelial e aumento nos níveis de pressão arterial. Esse envolvimento da

Ang II com a inflamação, ao menos em parte, pode ser explicado pelas ações pró-inflamatórias da Ang II. Efeitos pró-inflamatórios da Ang II nos vasos sanguíneos são realizados por meio de uma série de mediadores, dentre os quais podem ser citadas integrinas, moléculas de adesão, citocinas e mediadores profibróticos e de crescimento pela ativação de fatores de transcrição e vias envolvendo espécies oxigênio reativas (SUZUKI et al., 2003).

Linhas de pesquisa recentes têm sugerido que citocinas pró-inflamatórias, de importância no desenvolvimento e manutenção da doença periodontal (HAVEMOUSE-PULSEN et al, 1997), incluindo interleucinas 1- β (IL1- β) e fator de necrose tumoral α (TNF α), induzem a expressão de RNA_m do AT1R (YOSHIDA et al 2006). Da mesma maneira, outro estudo em modelo animal com ratos demonstrou aumento da produção de interleucina 6 (IL-6), outro importante marcador imunológico de doença periodontal quando receberam Ang II exógena em modelo de indução de aterosclerose induzida (RECINOS et al, 2007).

Pesquisa em ratos concluiu que a inibição do SRA com fármacos antagonistas dos receptores AT1 e com inibidores da ECA, além da diminuição da pressão arterial e proteção contra as ações profibróticas e proliferativas da Ang II, reduziram o estresse oxidativo principalmente pela prevenção da formação de espécies reativas derivadas da ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase induzida pela Ang II (deCAVANAGH et al, 2010). Ainda com relação a marcadores pró-inflamatórios, o estresse oxidativo mostrou correlação positiva com a presença de doença periodontal (BORGES Jr et al, 2007).

Recentemente vias de sinalização intracelular de células relacionadas aos tecidos periodontais têm sido estudadas em interação com o SRA. Vale ressaltar que a própria Ang II tem ações pró-inflamatórias (DOUILLETTE et al., 2006), sendo portanto, sugestível que Ang II pode contribuir para um aumento da atividade da ECA, enzima que converte Ang I em Ang II, uma vez que determinados estudos com Ang II exógena indiretamente aumentaram a expressão de ECA em fibroblastos (OHUCHI et al., 2002).

Trabalhos recentes têm demonstrado mecanismos autócrinos da Ang II em alguns tipos celulares (ZHUO et al, 2006), fato este comprovado quando fibras do ligamento periodontal foram submetidas a estresse mecânico induzido, o que gerou processo inflamatório e por conseguinte modulou fortes expressões de proteínas de angiotensinas no interior do citoplasma de fibroblastos desse importante compartimento do periodonto de sustentação (MONNOUCHI et al 2011).

Corroborando os estudos acima, acerca dos efeitos autócrinos e intrínsecos da ligação de Ang II com receptores específicos relacionados a envolvimento periodontais, pesquisa *in vitro* em que foi constatado aumento do bloqueio de canais de cálcio, gerando menor acúmulo intracelular de íons de Ca^{+2} no citoplasma, o que provocou menor proliferação de fibroblastos gengivais e conseqüentemente menos hiperplasia gengival (ZHUO; LI, 2011).

1.3.3 Sistema renina-angiotensina local em tecidos periodontais

Atualmente está ratificado que o conceito clássico do SRA circulante já foi extrapolado em virtude de concretas evidências experimentais que mostram a participação de diferentes tecidos na formação de Ang II, além de publicações recentes que enfatizam o papel hormonal parácrino, autócrino e intrínsecos da Ang II (ZHUO 2011). Outra gama de estudos já demonstrou existência de componentes do SRA no tecido gengival e em fibroblastos gengivais de diferentes espécies (SEGAWA et al., 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI et al., 2004; SANTOS et al, 2009), o que ratifica que sistemas locais sejam capazes de gerar angiotensinas de forma independente do SRA circulante em vários tecidos, tais como cérebro, coração, rim, gônadas (CAMPBELL, 1987; PHILLIPS et al., 1993) e periodonto de rato (SANTOS et al., 2009; NAKAMURA et al 2011).

Confere respaldo ao conceito de um SRA local em tecidos periodontais, ainda que estudo *in vitro*, a utilização de drogas bloqueadoras de receptores de Ang II. Os resultados revelaram que a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaias estimulada pela fenitoína e nifedipina é mediada indiretamente por receptores AT1

presentes em fibroblastos gengivais em cultura. Os autores ainda constataram que Ang II poderia ser sintetizada localmente nestas células (OHUCHI et al., 2002).

O efeito da Ang II sobre a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) foi estudado em fibroblastos gengivais humanos. Um antagonista de receptores AT₁, mas não um antagonista de receptores AT₂, foi capaz de impedir a produção de PGE₂ estimulada pela Ang II administrada exogenamente. Os autores demonstraram que a Ang II induziu a proliferação de fibroblastos gengivais de coelhos de maneira concentração-dependente (OHUCHI et al, 2004). Esta proliferação foi inibida por um antagonista de receptores AT₁, porém não foi alterada por um antagonista de receptores AT₂, sugerindo, portanto, que a proliferação de fibroblastos gengivais de coelho induzida pela Ang II nestas células em cultura ocorre via receptores AT₁ (SEGAWA et al, 2003).

Levando-se em consideração que a Ang II está presente em todas as fases da inflamação, que a inibição do SRA diminui o estresse oxidativo pela inibição da via Ang II de ativação da NAD(P)H oxidase (DE CAVANAGH et al 2010), que a doença periodontal e o estresse oxidativo têm importante correlação (BORGES JR et al 2007), que ocorre interação de componentes do SRA com citocinas inflamatórias importantes em doença periodontal (NAKAMURA, 2011) e que estudos recentes do laboratório de Farmacologia da FOB-USP demonstraram existência de um SRA local no tecido gengival de ratos (SANTOS et al., 2009), parece plausível afirmar que um maior número de estudos clínicos deve responder muitos questionamentos sobre a interação do SRA com a doença periodontal em humanos.

Diante desse panorama que mostra forte envolvimento do principal mediador do SRA, a Ang II, com diversos eventos inflamatórios, é de se esperar que ocorram interações moleculares entre a doença periodontal inflamatória infecciosa com o sistema fisiopatológico estudado no presente trabalho e que promovam o aumento de pesquisas nessa interface de conhecimento científico, como a realizada no presente trabalho.

2 *Proposição*

2 PROPOSIÇÃO

A hipótese afirmativa desse trabalho foi a de que existe um SRA local funcional no tecido gengival humano, e que este sistema tem maior expressão e atividade na inflamação gengival.

Os objetivos desta tese foram investigar no tecido gengival humano com saúde clínica, com gengivite e com periodontite:

1) a existência e eventuais diferenças na expressão e localização dos componentes do SRA local;

2) *in vitro*, a funcionalidade deste possível SRA local quanto à formação de peptídeos do sistema.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes para caracterização dos grupos experimentais

3.1.1 Critérios de Inclusão

Trinta e quatro pacientes (n=34), sistemicamente saudáveis de ambos os sexos e com idade entre 20 e 60 anos de idade, foram selecionados nas clínicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Após anamnese, os pacientes foram convidados a participarem da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, conforme processo número 125/2010 – Anexo p. 121.

Na seleção dos pacientes, foram avaliados exames radiográficos e realizados exames clínicos para categorização em função das diferentes condições periodontais nas áreas gengivais de interesse (GARLET et al., 2004), analisando-se o sangramento à sondagem dos sulcos gengivais (SS), as profundidades de sondagens dos sulcos gengivais (PS), índice de placa dentobacteriana de Silness e Løe (IP) e os níveis de inserção clínica (NIC) dos dentes envolvidos, de tal forma que os grupos foram assim divididos:

GRUPO I (GI) – Saúde gengival clínica: Pacientes que possuíam áreas de tecido gengival com aparência de normalidade clínica (ausências de SS e de perda de NIC; $IP = 0$ e $PS \leq 3\text{mm}$) e que necessitaram de exodontias por motivos ortodônticos ou pré-protéticos (n= 12);

GRUPO II (GII) – Gengivite: Pacientes que possuíam áreas de tecido gengival com gengivite crônica (presença de SS, ausência de perda de NIC, $IP \geq 1$ e valores de PS entre 3 e 6mm) que necessitaram de gengivoplastia (n= 10);

GRUPO III (GIII): Periodontite: Pacientes que possuíam áreas de tecido gengival com periodontite avançada e presença de mobilidade acentuada (presença de SS, $IP \geq 1$, perda de NIC $> 3\text{mm}$ e $PS > 6\text{mm}$) e que necessitaram de exodontias por motivos periodontais ou reabilitadores (n=12).

Para compor esses três grupos experimentais foram coletadas, ao redor dos dentes, amostras de tecido gengival indicadas na remoção pelas técnicas cirúrgicas de exodontias e ENAP (GI e GIII), e de gengivoplastia (GII), conforme literatura científica (PIPPIN, 1990; CARRANZA; TAKEI, 2004; FIGUEIREDO, 2005).

As técnicas cirúrgicas que foram empregadas nos pacientes possibilitaram a remoção de 2 amostras de tecidos gengivais marginais (1 por vestibulare 1 por lingual) em cada um de 4 dentes, totalizando 8 amostras por paciente.

Tais amostras de tecido gengival foram destinadas à realização dos experimentos laboratoriais de: Contagem celular do infiltrado inflamatório (CI), Transcrição reversa (RT) prévia à Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR em tempo real), Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (HPLC), Ensaio fluorimétrico (EF) e Imunoistoquímica (IHQ) (Figura 2). Estas Técnicas Laboratoriais serão descritas a seguir.

Figura 2 – Distribuição de amostras gengivais conforme técnicas laboratoriais por paciente (n = 34). qPCR = 2 cortes para Transcrição reversa (RT) prévia à Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; HPLC = 2 cortes para Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa; EF = 2 cortes para Ensaio Fluorimétrico; CI = 1 corte para contagem celular do infiltrado inflamatório e IHQ = 1 corte para Imunoistoquímica.

3.1.2- Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes fumantes, que utilizam medicações sistêmicas, com problemas cardiovasculares, renais, pulmonares, com infecções agudas, quadros debilitantes, alterações hormonais, terem feito uso de antibióticos, antiinflamatórios, antihipertensivos ou outro tipo de medicamento nos seis meses precedentes, ou ainda realizado algum tratamento que pudesse ter influência nos resultados clínicos, laboratoriais e histopatológicos desta pesquisa.

3.2 Procedimentos clínicos

O atendimento clínico foi realizado por um examinador conforme plano de tratamento para cada paciente. Para tal foi utilizado espelho bucal plano e sonda periodontal com marcações de Williams da marca Hu-Friedy® para o exame dos tecidos gengivais pertinentes.

3.2.1 Coleta das amostras gengivais

Após o exame inicial de categorização foram realizadas anti-sepsias externa com solução de iodo-povidona e intra-bucal com digluconato de clorexidina 0,12%. Após remoção da placa dentobacteriana e cálculos, quando presentes, dos dentes envolvidos, anestésias de bloqueio e infiltrativas de acordo com a necessidade da técnica relativa aos grupos I, II e III foram realizadas. Em seguida, com lâminas tipo Bard-Parker®15c foram realizadas incisões do tipo bisel inverso em conformidade com o procedimento de ENAP (grupos I e III) e de gengivectomia/gengivoplastia (grupo II). A extensão da incisão em cada amostra gengival vestibular ou lingual foi delimitada em 1 mm das margens, incluindo-as, de mesial à distal conforme técnicas descritas na literatura científica (CARRANZA; TAKEI, 2004; FIGUEIREDO, 2005).

Posteriormente às incisões, as amostras gengivais foram desinseridas delicadamente das cristas ósseas alveolares e dos dentes com descoladores rombos durante as cirurgias de exodontias e/ou gengivoplastias, e armazenadas imediatamente em tubos plásticos de microcentrífuga imersos em gelo seco picado. Os pacientes receberam orientações sobre cuidados pós-operatórios e adequadas

prescrições medicamentosas. Após uma semana foi feito controle pós-operatório e remoção de suturas necessárias.

Após o término de cada cirurgia, as amostras gengivais vestibulares (4) e linguais (4), totalizando 8 por paciente, foram individualmente armazenados em tubos de microcentrifuga de 2ml vazios para os fragmentos destinados às técnicas de Ensaio Fluorimétrico e HPLC e contendo 1ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) para as destinadas à técnica de RT e qPCR em tempo real. Imediatamente os tubos foram armazenados a -80°C até o momento da realização das técnicas. As amostras referentes à análise de contagem de células do infiltrado celular com coloração de hematoxilina e eosina (HE) e de imunoistoquímica foram acondicionadas em solução fixadora de formaldeído A10% e armazenadas por no máximo 48 horas para o processamento histológico.

Os blocos de parafina possibilitaram obter cortes histológicos obtidos com 5 μm de espessura para HE e 4 μm para Imunoistoquímica em micrótomo rotativo, de acordo com a rotina do Laboratório de Histologia da FOB/USP, como utilizada em outros trabalhos (RODINI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008), resultando em cortes méso-distais, sendo aderidos às lâminas de vidro comuns para microscopia (Corning®) para contagem de células do infiltrado celular com coloração de HE e lâminas silanizadas para análise imunohistoquímica, e então corados com Hematoxilina de Harris.

3.3 Contagem Celular do Infiltrado Inflamatório em lâminas coradas com HE

Para validação dos grupos experimentais compostos clinicamente, foi realizada contagem de células do infiltrado inflamatório (linfócitos e plasmócitos) em 04 lâminas com 02 cortes para cada espécime gengival da amostra com cortes semi-seriados de 5 μm , coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). A contagem foi realizada seguindo protocolos de outros trabalhos de nosso grupo (FERREIRA JR et al 2009) por dois examinadores em caráter duplo-cego, em microscópio óptico OLYMPUS®, utilizando-se uma objetiva de 40 x e ocular de 8 x, contendo um grid escalonado com 100 campos matrixiais quadrados (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) resultando em uma área de 850.000 μm^2 por corte equivalente a 8 grids

com 100 campos matrixiais quadrados que abrangiam todo o tecido conjuntivo envolto pelos tecidos epiteliais gengivais.

3.3.1 Erro do método para medida das contagens celulares em HE

Para estimar o valor do erro sistemático inter e intra-examinador, a contagem de células em HE foi analisada por dois examinadores distintos e após 30 dias da análise inicial um terço da amostra foi novamente estudada. O teste t pareado foi utilizado para cálculo do erro inter-examinador sistemático do método, obtido por 2 examinadores e o teste t pareado para avaliar o erro intra-examinador, obtido em duas análises distintas com intervalo de 30 dias. Valores de $p > 0,05$ foram considerados para estimar a viabilidade de utilização do método proposto.

3.4 Extração de RNA total das biópsias de tecido gengival

Para a realização destes experimentos, foram seguidas as descrições realizadas em publicações do laboratório próprio (SANTOS et al., 2002b; SANTOS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; RODINI et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Logo após a remoção, os tecidos gengivais foram imediatamente colocados em tubos de centrifuga contendo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) (0,1 g de tecido/1,0 mL de TRIzol) e congelados a -80°C até o momento da extração de RNA total pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio. No momento oportuno, os tubos foram descongelados e os tecidos homogeneizados utilizando-se um homogeneizador de tecidos. Em seguida, os tubos foram incubados por 5 min a 4°C e então foi adicionado um volume de 20% de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso a 4°C por 5 min, sendo em seguida centrifugados a 13.000g por 15 min. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 400 μL que foram colocadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 400 μL de isopropanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso a 4°C por 15 min. Após centrifugação a 13.000 g por 10 min a 4°C , foi descartado o sobrenadante e foi adicionado 1 mL de etanol 70% em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%, agitando-se vigorosamente. Foi realizada centrifugação a 8.000 g por 5 min a 4°C , descartando-se o sobrenadante e repetindo-se outra

centrifugação com 1 mL de etanol 70% a 8.000 g por 5 min a 4°C. Para permitir a secagem das amostras, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 min dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras). O precipitado de RNA foi ressuspenso em um volume de 30 µL de água livre de DNAase e RNAase tratado com DEPC 0,1%.

3.4.1 Quantificação e qualificação do RNA total

Para a quantificação do RNA total das amostras foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop 1000 Thermo Scientific (USA). Foram utilizados 2µL de cada amostra para obtenção das leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (A260) e 280 nm (A280), os quais forneceram informações sobre a quantidade e qualidade do RNA. Amostras com valores entre 1,9 e 2,1 na relação A260/A280 foram transcritas.

3.4.2 Tratamento do RNA total com DNase e transcrição reversa (RT)

Para evitar a possibilidade de contaminação do RNA total extraído de diferentes tecidos e células por DNA genômico, procedeu-se o tratamento de todas as amostras com DNase (gDNA wipeout - Qiagen, Alemanha) durante 2 minutos a 42°C sendo este procedimento realizado segundo as orientações do fabricante. As amostras com 1µg de RNA total cada foram tratadas com DNase e imediatamente submetidas ao processo de transcrição reversa com o kit Quantitect® Reverse Transcription (Qiagen). Neste RNA tratado com DNase foi adicionada uma mistura de 1µL dos primers randômicos e oligo dT, 1µL da transcriptase reversa e 4µL do tampão Quantscript RT. Esta mistura foi incubada a 42°C por 30 minutos, seguido de outra incubação a 95°C por 3 minutos.

3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)

A investigação da existência e quantificação de um sistema renina-angiotensina local no tecido gengival humano nos três grupos experimentais com

três diferentes condições clínicas (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) se deu por meio da análise da expressão de RNA mensageiro (RNA_m) de diferentes componentes (genes alvos) do sistema supracitado. A expressão quantitativa dos componentes do SRA foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman (Applied Biosystems, Foster City, USA) em um aparelho Viia 7 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Isso se fez necessário porque na maquinaria celular, o RNA_m é responsável pela tradução da informação genética do DNA para que ocorra a síntese de proteínas. Para tal realizou-se a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos da reação a partir do qual a amplificação do fragmento de DNA complementar (cDNA), correspondente ao gene alvo que se pretende avaliar, atinge um dado limiar (valor), que permite a análise quantitativa de sua expressão. O limiar para positividade da PCR quantitativa foi determinado com base em controle negativo ou controle água. Os cálculos para a determinação do nível relativo de expressão gênica foram realizados pelo programa Viia 7[®] versão 1.1 da Applied Biosystems. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvos, com normalização em relação a um controle interno, mais especificamente a um gene de referência, o RPL13, e então comparados utilizando-se a fórmula $(1+\text{eficiência})^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde a eficiência é de 1, ou seja 100%, garantida pelo fabricante dos “primers” inventoriados utilizados (Applied Biosystems, Foster City, USA). “Primers” sintéticos são sequências de oligonucleotídeos que promovem o início da reação de amplificação do gene alvo na técnica de qPCR. Os primers utilizados (Applied Biosystems, Foster City, USA) para tais reações são apresentados na Tabela 1. Esse sistema Viia 7 realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (Viia 7 Software versão 1.1) por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles já citados. A reação compreende 2 min a 50⁰C, 10 minutos a 95⁰C, 50 ciclos de 15 s a 95⁰C e 1 min a 60⁰C. Os alvos em tecido gengival humano testados neste estudo para as três condições experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) foram: angiotensinogênio (AGTN), renina (REN), receptores para angiotensina AT1 e AT2, enzima conversora de

angiotensina (ECA), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e receptor do tipo MAS.

Tabela 1 - Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa.

Alvo	Número de catálogo
RPL13A	Hs00204173_m1*
AGTN	Hs00982555_m1*
REN	Hs00982555_m1*
AT1	Hs01096942_m1*
AT2	Hs00169126_m1*
ECA	Hs01104600_m1*
ECA2	Hs00222343_m1*
Receptor MAS	Hs00364818_s1

3.5 Análise Imunoistoquímica

3.5.1 Imunomarcção para AT1 e AT2

Para a análise imunoistoquímica (IHQ), foram selecionados 6 espécimes de tecidos gengivais coletados de cada grupo experimental e seguido o protocolo estabelecido em conformidade com a rotina do Laboratório de Histologia da FOB/USP, como utilizada em outros trabalhos deste grupo (OLIVEIRA, T et al., 2008). O material destinado à análise microscópica foi fixado em formol 10% por 48 horas sendo em seguida incluídos em blocos de parafina com dimensões de 8x10x6 mm. Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo rotativo (Leica, Alemanha), resultando em cortes semi-seriados méso-distais dos tecidos gengivais fixados com espessura de 4µm, sendo aderidos às lâminas de vidro silanizadas (DaKo® S 3003) próprias para a técnica de imunoistoquímica do tipo imunoperoxidase, cujo protocolo detalhado será descrito, para imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 humanos.

Tais cortes foram aderidos a essas lâminas com cola à base de poli-D-lisina e então colocados na estufa a 65°C por 2h para o início da desparafinização e adesão final à lâmina. Em seguida, as lâminas foram acomodadas em cubas de *Coopler* com ranhuras para hidratação dos cortes que passaram por dois ou três banhos de xilol de 10 minutos cada. E três banhos de álcool (etanol) absoluto, sendo o primeiro de 10 minutos e os dois seguintes de 5 minutos cada, seguidos de mais um banho

de álcool a 70% por 5 minutos e um banho com solução salina tamponada com fosfato (PBS) acrescida de Triton X-100 1% (Merk, Brasil).

Após esses banhos, as lâminas foram transferidas para bandejas e incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena, lavadas cuidadosamente em solução PBS acrescida de Triton X-100 1% (Merk, Brasil) e submetidos ao bloqueador de biotina, por 4 minutos e novamente lavadas com tampão PBS. Em seguida foram mergulhadas em tampão citrato (pH=6,0) a 90°C, para exposição antigênica (dos epí topos) por 20 minutos e lavadas com tampão PBS. Após isso, foram incubadas com soro de leite bovino em pó desnatado (sem adição de suplementos e vitaminas) Molico® na concentração de 10% em água destilada ou solução tampão PBS por 40 minutos para o bloqueio de proteínas livres pela albumina.

Os anticorpos primários de coelho anti-AT1 e anti-AT2 humanos, devidamente diluídos em tampão PBS ou PBS-BSA 1%, pH 7,3 nas concentrações de 1:200 e 1:100 respectivamente, disponíveis comercialmente conforme seus códigos e números de catálogos visualizados na Tabela 2, foram então gotejados sobre as lâminas, que ficaram em câmara úmida por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas de AT1 e AT2 foram lavadas cuidadosamente com tampão PBS para receber peróxido de hidrogênio 1,5% (diluído em metanol) por 30 min e novamente lavadas com PBS para em seguida receber o anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho produzido em soro de cavalo, do kit Universal LSAB (Dako®, Estados Unidos), incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, na concentração de 1:100 em PBS-BSA 1%.

Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com tampão PBS e incubadas na solução de Streptavidina-peroxidase do kit Uiversal LSAB (Dako®, Estados Unidos) por 15 minutos e novamente lavadas com PBS. Posteriormente, a revelação foi feita, por 3 min em temperatura ambiente e protegida da luz, utilizando-se o substrato 3,3'- diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, SK-4100, Estados Unidos). A reação foi interrompida por lavagem com água destilada e as lâminas contra-coradas com Hematoxilina de Harris , por 2,5 min em temperatura ambiente. Como controle negativo das reações, um dos cortes de cada alvo foi incubado com diluídos de anticorpo primário em substituição ao anticorpo primário com a concentração usada nas reações teste. Após a exposição à solução de

Streptavidina-peroxidase, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e o excesso aspirado.

Depois, as lâminas passaram por 1 banho de 10 minutos em água destilada, 1 banho rápido em álcool 70% seguido de outro banho rápido em álcool etílico absoluto. Posteriormente foram submetidas a dois banhos de 3 minutos cada em álcool etílico absoluto e três banhos de 3 minutos cada em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina sintética ENTELAN® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Tabela 2– Anticorpos primários e secundários utilizados para a marcação imunoistoquímica.

Proteína alvo	Bloqueadores de proteínas livres	Anticorpo primário (Santacruz)	Anticorpo secundário (Vectorlabs)
AT1	Soro de cabra	AT1 (N-10) 1:200	Anti-coelho 1:100
AT2	Soro de cabra	AT2 (H-143) 1:100	Anti-coelho 1:100

Para controle positivo da imunomarcação para AT1 foi utilizado o coração humano. A utilização do anticorpo primário para AT1 neste tecido marcou vasos e cardiomiócitos da musculatura lisa cardíaca (NOR et al., 1998) de cortes de lâminas cedidas ao Departamento de Histologia da FOB-USP.

Para controle positivo da imunomarcação para o receptor AT2 foi utilizado rim. A utilização do anticorpo primário para AT2 neste tecido marcou a região tubular renal (KOMLOSI et al., 2003) de cortes de lâminas cedidas ao Departamento de Histologia da FOB-USP.

3.5.2 Erro do método para medida das contagens celulares em Imunoistoquímica

Foi realizada contagem celular de células do infiltrado inflamatório, células do tipo fibroblastos e células endoteliais do tecido conjuntivo seguindo protocolo de Faustino *et al.* (2008). Foram feitas contagens para obtenção da proporção entre células coradas positiva e negativamente para cada um dos 3 tipos celulares adotados para análise em uma lâmina com um corte para cada alvo de cada

paciente da amostra. A contagem foi realizada seguindo protocolos de outros trabalhos do presente grupo (RODINI et al., 2008; FAUSTINO et al. 2008) por dois examinadores em caráter duplo-cego, em microscópio óptico OLYMPUS®, utilizando-se uma objetiva de 100 x, óleo de imersão e ocular de 10 x, contendo um grid escalonado com 100 campos matrixiais quadrados (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) resultando em uma área de 1.000.000 μm^2 por campo óptico. Foram analisados 20 campos quadrados matixiais que abrangiam todo o tecido conjuntivo envolto pelos tecidos epiteliais gengivais.

Para estimar o valor do erro sistemático inter e intra-examinador a contagem de células em Imunoistoquímica foi analisada por dois examinadores distintos e após 30 dias da análise inicial um terço da amostra foi novamente estudada. O teste t pareado foi utilizado para cálculo do erro inter-examinador sistemático do método, obtido pelos 2 examinadores e o teste t pareado para avaliar o erro intra-examinador, obtido em duas análises distintas com intervalo de 30 dias. Valores de $p > 0,05$ foram considerados para estimar a viabilidade de utilização do método proposto.

3.6 Medida da atividade da ECA para amostras de homogenato de tecido gengival

A medida de atividade da ECA foi realizada por meio de ensaio fluorimétrico (EF) para homogenatos de tecido gengival dos 34 pacientes selecionados inicialmente (n=34), sendo: saúde gengival clínica (n=12), gengivite (n=10), periodontite (n=12).

Para os experimentos de medida de atividade da ECA seguiu-se as descrições de trabalhos anteriores (LEITE; SALGADO, 1992; CUNHA; SALGADO; SALGADO, 2000; OLIVEIRA; SANTOS; KRIEGER, 2000; SIVIERI JR et al., 2007; SANTOS et al., 2009). Amostras de tecido gengival foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em um aparelho Potter S (B. Braun Biotech Intern., Estados Unidos) a 2.500 rpm por 5 ciclos de 10 segundos e intervalos de 30 segundos entre os ciclos, utilizando solução tampão borato de sódio 0,05 M, pH 7,4 (ajustado com NaOH 0,5 M), contendo 0,32 M de sacarose, na proporção de 1:10 entre o peso do material biológico e o volume empregado da solução, no preparo do homogenato.

Em seguida o material foi centrifugado durante 10 min, a 4°C em centrífuga refrigerada (Sorvall Legend RT, Estados Unidos) a 1.000 rpm e o sobrenadante retirado com pipeta Pasteur e conservado a 4°C até o momento da sua utilização para dosagem da atividade da ECA.

A atividade da ECA foi determinada, imediatamente após a coleta do sobrenadante descrita acima, utilizando o tripeptídeo Hipuril-Histidina-Leucina (Hip-His-Leu) como substrato e medida pela análise fluorimétrica para o dipeptídeo His-Leu formado (Yang e Neff, 1972). O volume de 80 µL de homogenato foi incubado a 37°C com 200 µL de solução de Hip-His-Leu (5 mM) em TBS. Após 30 min foi adicionado 1 mL de NaOH 0,5 M para interromper a ação enzimática. O dipeptídeo His-Leu foi detectado pela adição de 100 µL de *o*-ftaldialdeído 1% (massa/volume, em etanol), seguido da adição de 200 µL de HCl 6 M após 4 min. A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-535, Japão) com comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. Foi construída uma curva-padrão para o dipeptídeo His-Leu (0-20 nmol) com a finalidade de estabelecer os parâmetros da relação entre a concentração de His-Leu e a fluorescência medida pelo espectrofluorímetro. A atividade da ECA foi corrigida pelo peso em miligrama (mg) de cada amostra de tecido gengival. Estes experimentos foram realizados nos laboratórios dos Professores Doutores Maria Cristina de Oliveira Salgado e Eduardo Brandt Oliveira, dos Departamentos de Farmacologia e Bioquímica e Imunologia, respectivamente, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, sob orientação da pós-doutoranda Dra. Christiane Becari.

3.7 Medida de atividades enzimáticas por meio de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (HPLC) para as amostras de homogenatos de tecidos gengivais

Para esses experimentos foram selecionados 5 amostras de homogenato gengival de cada grupo experimental: saúde gengival clínica, gengivite, periodontite.

A técnica de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) em fase reversa, foi utilizada para detecção de atividades enzimáticas de homogenatos gengivais a partir de incubações com Angiotensina I (precursor de Angiotensina II) e

incubações com Angiotensina II dos três grupos experimentais: saúde gengival clínica (n=5), gengivite (n=5) e periodontite (n=5), sob quatro condições experimentais diferentes de incubação para cada um dos dois peptídeos de partida (Ang I e Ang II) citados acima:

- sem inibição farmacológica;
- inibição com captopril a 10µM (inibidor da ECA);
- inibição com quimostatina a 100µM (inibidor de Serino-proteases–Vias Alternativas à ECA);
- inibição com associação captopril e quimostatina.

Portanto, para cada amostra de homogenato gengival foram realizadas 8 reações teste e uma reação de controle negativo, que consiste numa incubação do homogenato gengival (sem peptídeos sintéticos de partida e sem inibidor). Vale destacar, que as duas vias enzimáticas (duas setas cinzas visualizadas em paralelo na figura abaixo) convertem Angiotensina I em Angiotensina II, principal efector do SRA, conforme Figura 3 .

Figura 3 – Principais vias enzimáticas conversoras de Ang I, Ang II e Ang 1-9. Vias alternativas (seta cinza mais fina) refere-se à outras vias conversoras de Ang I em Ang II com enzimas diferentes da ECA. Tais enzimas alternativas são do tipo serino-proteas e podem ser sensíveis à aprotinina ou à quimostatina. Dentre as sensíveis à quimostatina pode-se citar por exemplo quimases e elastase-2 do rato.

As amostras de tecido gengival foram descongeladas, pesadas e cuidadosamente picotadas dentro de tubos de microcentrífuga com a utilização de

tesoura curva (10,5 cm, Edlo delikat, código 060354, Brasil) em solução Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, para obtenção de homogenato de tecido gengival. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 min em temperatura de 4°C, sendo os sobrenadantes de homogenato de tecido gengival, transferidos para novos tubos de microcentrífuga, onde foram congelados em temperatura de -20°C até o momento da realização das incubações com substratos. Todos os ensaios com homogenato de tecido gengival foram realizados incubando-se isoladamente Ang I (30 nmol), Ang II (30 nmol) nas 4 situações distintas já descritas para cada peptídeo.

As incubações foram feitas com 40 µL do homogenato de tecido gengival em tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, em um volume final de 150 µL, durante 1h30 min para Ang I e 4h00 para Ang II, a 37°C. As reações foram paralisadas pela adição de 40 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% em glicerol a 4% para cada tubo de reação. As clivagens de Ang I e Ang II foram avaliadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em um equipamento Shimadzu SCL-6B (Japão), acoplado a uma coluna Shim-pak ODS(4 x 250 mm). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de acetonitrila (10-32%, 30 min) em TFA a 0,1%, em um fluxo de 1,0 mL/min e monitorados pela absorbância no comprimento de onda de 215 nm. As concentrações molares dos peptídeos foram calculadas por comparação com quantidades conhecidas dos peptídeos sintéticos cognatos (padrões). Estes experimentos seguiram padronizações de trabalhos anteriores do presente grupo (SANTOS et al., 2002a; SANTOS et al., 2009) para homogenatos de tecido gengival.

Após as corridas de HPLC, os cromatogramas foram obtidos, traçados e as produções dos peptídeos formados e os que sobraram foram calculados seguindo os padrões já descritos convertidos em nanomoles por miligrama de tecido por hora.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica do infiltrado inflamatório dos tecidos gengivais

Conforme explicado no capítulo 4 Material e métodos, a análise histológica propiciou contagens de linfócitos e plasmócitos (células características de infiltrado inflamatório crônico) nos tecidos gengivais coletados dos 34 pacientes conforme as condições clínicas que compuseram os grupos experimentais: saúde gengival clínica (SG, n=12), gengivite (G, n=10) e periodontite (P, n=12). Essas contagens celulares serviram tanto para validação dos grupos experimentais que foram compostos clinicamente como para o estabelecimento do grau do infiltrado inflamatório sob o ponto de vista histológico. Esse grau serviu de referência do estado do infiltrado inflamatório nos grupos saúde gengival clínica (Figura 4), gengivite (Figura 5) e periodontite (Figura 6) nos tecidos conjuntivos das amostras gengivais coletadas.

Figura 4 - Aumento 40x hematoxilina eosina – Amostra de tecido conjuntivo do grupo com saúde gengival clínica. Escassez de células inflamatórias junto à seta.

Figura 5 - Aumento 40x hematoxilina-eosina – Amostra de tecido conjuntivo do grupo com gengivite. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com predomínio de linfócitos junto à seta.

Figura 6 - Aumento 40x hematoxilina-eosina – Amostra de tecido conjuntivo do grupo com periodontite. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com a presença de muitos plasmócitos, conforme à seta.

A contagem foi realizada por dois examinadores em caráter duplo-cego. Assim, observou-se que erros na verificação da precisão desta metodologia foram admissíveis para erro sistemático intra-examinadores: $p=0,434$ (SG - examinador 1); $p=0,249$ (SG – examinador 2); $p=0,316$ (G - examinador 1); $p=0,352$ (G– examinador 2); $p=0,196$ (P - examinador 1); $p=0,107$ (P - examinador 2) e para erro sistemático inter-examinadores: $p=0,530$ (SG - examinador 1 e 2); $p=0,228$ (G - examinador 1 e 2); $p=0,164$ (P – examinador 1 e 2). Portanto, resultados de contagem celular considerados transparentes e fidedignos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a 1 critério (one-way), sendo adotado nível de significância de 5%. A Figura 7 mostra para $n= 34$, as médias das contagens do número de células inflamatórias do tipo linfócitos, plasmócitos e para a somatória de linfócitos e plasmócitos por área de $0,85\text{mm}^2$ de tecido conjuntivo gengival humano para os três grupos experimentais: saúde clínica gengival (SG), gengivite (G) e periodontite (P).

Figura 7– Representação gráfica da contagem celular de linfócitos (A), plasmócitos (B) e somatória de linfócitos e plasmócitos (C) por área de 0,85mm² de tecido conjuntivo gengival humano nos três grupos experimentais: saúde gengival clínica (SG), n=12; gengivite (G), n=10; e periodontite, n=12 (P). * > que na saúde gengival clínica (p<0,05).

Como pode ser visualizado na Figura 7A, houve maior número de células do tipo linfócito nos tecidos conjuntivos de pacientes com gengivite, quando comparados aos de saúde gengival clínica ($p = 0,017$).

O número de plasmócitos (Figura 7B), foi maior nos tecidos inflamados, gengivite e periodontite ($p = 0,007$) do que nos tecidos saudáveis.

Em consequência, o somatório do número de linfócitos e plasmócitos, na (Figura 7C) foi maior na gengivite do que na saúde clínica gengival ($p=0,016$), discretamente maior na condição gengivite do que na periodontite e maior na condição periodontite do que na saúde gengival clínica, ainda que sem diferenças estatisticamente significativas (valor de p não expresso devido a não significância conforme teste e pós teste estatístico) nessas duas últimas comparações citadas.

Tais resultados de infiltrado inflamatório validaram a composição dos grupos experimentais.

4.2 Análise da Expressão de RNAm de diferentes componentes (genes alvos) do Sistema Renina-Angiotensina por PCR quantitativo (qPCR)

Para os tecidos gengivais humanos dos três grupos experimentais com diferentes condições: saúde gengival clínica ($n=12$), gengivite ($n=10$) e periodontite ($n=12$), após a validação pela análise histológica descrita previamente e a constatação da qualidade dos RNA totais extraídos de cada amostra, detectou-se por meio da técnica de RT-PCR em tempo real, a presença dos seguintes alvos: Angiotensinogênio (AGTN), Renina (REN), Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA), Enzima Conversora de Angiotensina I - 2 (ECA-2), Receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1) e Receptor do tipo MAS. O Receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT2) também foi investigado, porém não foi constatada a sua expressão de RNAm em nenhuma amostra gengival dos três grupos experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite). Entretanto, para comprovação da existência dessa proteína no tecido gengival humano, realizou-se imunomarcagem com anticorpo específico para imunomarcagem da proteína AT2 em técnica de imunoistoquímica, cujo resultado será descrito adiante.

A Figura 8 mostra que o tecido gengival humano expressou RNA_m para todos os componentes investigados, exceto AT2, para as três condições clínicas teciduais gengivais estudadas. Nota-se também na mesma figura 14, ainda que sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), que existiu expressão diferencial dos diferentes genes alvos quando comparadas as três diferentes condições clínicas dos tecidos estudados. Essas diferenças foram mais perceptíveis em valores numéricos comparando-se gengivite com saúde gengival clínica para os alvos angiotensinogênio (AGTN), ECA e ECA-2, e comparando-se periodontite com saúde gengival clínica no alvo renina (REN). Por outro lado, as expressões diferenciais foram menos perceptíveis para os receptores AT1 e do tipo MAS para os três grupos experimentais estudados.

Figura 8 – Representação gráfica da expressão do angiotensinogênio (AGTN), renina (REN), enzima conversora de angiotensina (ECA), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), receptor AT1 (AT1) e receptor do tipo MAS (MAS) em tecidos gengivais em três condições clínicas: saúde gengival, gengivite e periodontite. O gene de referência RPL13 foi utilizado para normalizar os resultados.

4.3 Análise da Imunomarcção dos Receptores AT1 e AT2 do Sistema Renina-Angiotensina no tecido gengival humano

Observou-se no presente trabalho que o tecido gengival humano apresentou imunomarcção para os receptores AT1 e AT2 em todos os espécimes gengivais avaliados (saúde gengival clínica, n=6; gengivite, n=6 e periodontite, n=6) pela técnica de imunoistoquímica (Figuras 9 a 14). Tais receptores foram imunolocalizados nos tecidos epiteliais e nos tecidos conjuntivos para diferentes tipos celulares das amostras gengivais avaliadas morfológica e morfometricamente.

Figura 9– Imunomarcção para receptor de angiotensina AT1 em tecido conjuntivo de espécime gengival de paciente do grupo com saúde gengival clínica. As setas indicam fibroblastos imunomarcados (corados positivamente, citoplasma com coloração amarronzada). Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Figura 10– Imunomarcção para receptor de angiotensina AT2 em tecido conjuntivo de espécime gengival de paciente do grupo com saúde gengival clínica. A seta maior indica fibroblastos imunomarcados e a menor indica células endoteliais (corados positivamente, citoplasma com coloração amarronzada). Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Figura 11–Imunomarcção para receptor de angiotensina AT1 em tecido conjuntivo de espécime gengival de paciente do grupo com gengivite. Devido ao maior número de células é mais perceptível células positivamente marcadas (citoplasma coloração amarronzada) e células não marcadas (com coloração azulada). Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Figura 12– Imunomarcção para receptor de angiotensina AT2 em tecido conjuntivo de espécime gengival de paciente do grupo com gengivite. Presença de células do tipo inflamatória (mais arredondadas) e do tipo fibroblastos (mais alongadas), ambas imunomarcadas. Aumento de 100X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Figura 13– Imunomarcção para receptor de angiotensina AT1 em tecido conjuntivo de espécime gengival de paciente do grupo com periodontite. Presença de células do tipo inflamatória imunomarcadas predominantemente na área de conjuntivo equivalente ao fundo da bolsa periodontal conforme indicação da seta próxima a projeção de epitélio sulcular. Aumento de 40X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Figura 14– Imunomarcção para receptor de angiotensina AT2 (coloração mais escura do que azulada) em tecido conjuntivo de espécime gengival de paciente do grupo com periodontite. Presença de células do tipo inflamatória (com aspecto mais arredondado do que os fibroblastos mais alongados, fusiformes). Aumento de 100X. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Nos tecidos epiteliais, foi evidente a imunolocalização dos receptores AT1 e AT2 predominantemente nas células epiteliais da camada basal, principalmente a dos epitélios orais externos, ao contrário dos epitélios sulcular e juncional, nos quais foram menos evidentes. Nas camadas basais do epitélio oral externo, pôde-se diferenciar visualmente as células positivamente marcadas das células negativamente marcadas para as três situações clínicas. Todavia nas células das camadas epiteliais mais superficiais muitas vezes não se obteve um padrão definido de marcação e não se pôde diferenciar e afirmar com certeza se ocorria imunomarcção ou se se tratava-se de “background”.

Destaca-se que ocorreu imunomarcção para AT1 e AT2 em diferentes tipos celulares (Figuras 9 a 14) distribuídos por todas as áreas do tecido conjuntivo das amostras gengivais humanas dos três grupos experimentais, dentre os quais pode-se citar células inflamatórias (sem a distinção do tipo morfológico), a do tipo fibroblasto e endoteliais na parede de vasos da microcirculação gengival. Vale ressaltar que foram esses três tipos celulares adotados para realização da análise

morfométrica mediante contagem celular, devido a importância dessas células à compreensão do Sistema Renina-Angiotensina local.

Os resultados morfométricos de imunomarcção, foram obtidos por contagem celular. A contagem foi realizada por dois examinadores em caráter duplo-cego. Assim, observou-se que erros na verificação da precisão desta metodologia foram admissíveis para erro sistemático intra-examinadores: $p=0,201$ (AT1 - examinador 1); $p=0,153$ (AT1– examinador 2); $p=0,316$ (AT2 - examinador 1); $p=0,188$ (AT2– examinador 2) e para erro sistemático inter-examinadores: $p=0,431$ (AT1 - examinador 1 e 2); $p=0,222$ (AT2 - examinador 1 e 2). Sendo assim, os resultados de contagem celular foram transparentes e fidedignos, sendo submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a 1 critério (one-way), para nível de significância de 5%.

Adotou-se para expressar os resultados de contagem celular: a proporção entre o número de células imunomarcadas positivamente em relação ao número de células contadas (as imunomarcadas positivamente e as não marcadas – marcação negativa) para cada tipo celular adotado: células do infiltrado inflamatório, do tipo fibroblasto e endoteliais. Também foi obtida a proporção em relação a somatória dos três tipos celulares adotados para contagem (células inflamatórias, do tipo fibroblasto e endoteliais).

As Figuras de 15 a 18 mostram que quando as três condições clínicas avaliadas (saúde gengival, gengivite e periodontite) foram comparadas entre si para cada tipo de receptor, AT1 como em AT2, não houve diferença estatisticamente significativa (valores de $p>0,05$) entre as imunomarcações desses receptores. Portanto não houve diferença entre os valores obtidos de proporção de células positivamente marcadas em relação ao número total de células contadas (as imunomarcadas positivamente e as não marcadas). Isto se deu nas quatro situações (Figuras 11,12, 13 e 14): para o número total de células do tecido conjuntivo adotadas para contagem (fibroblastos + células inflamatórias + células endoteliais), para os fibroblastos, para as células inflamatórias e para as células endoteliais contadas individualmentepara os dois receptores estudados nos três grupos experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite).

Por outro lado, o montante (somatório) das proporções dos três grupos: saúde gengival clínica, gengivite e periodontite, foi maior para AT1 do que AT2, com diferença estatisticamente significativa para os três tipos celulares somados ($p = 0,0125$), para fibroblastos ($p=0,0024$) e para células inflamatórias ($p= 0,0204$). Para células endoteliais não existiu diferença estatisticamente significativa ($p = 0,11$). Estes resultados mostram que para fibroblastos e células inflamatórias houve maior marcação de AT1 do que de AT2, independente da situação clínica dos espécimes gengivais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite).

Figura 15 - Representação gráfica da imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 em células do tecido conjuntivo das gengivas em três grupos experimentais ($n=6$): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite. Ø - Somatório dos três grupos clínicos das proporções do total dos três tipos celulares imunomarcados em relação ao total dos três tipos celulares existentes no tecido conjuntivo para AT1 > Somatório dos três grupos clínicos das proporções do total dos três tipos celulares imunomarcados em relação ao total dos três tipos celulares existentes no tecido conjuntivo para AT2 ($p=0,0125$).

Figura 16 - Representação gráfica da imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 em fibroblastos do tecido conjuntivo das gengivas em três grupos experimentais (n=6): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite. Ø - Somatório dos três grupos clínicos das proporções de fibroblastos imunomarcados em relação ao total de fibroblastos existentes no tecido conjuntivo para AT1 > Somatório das proporções dos três grupos clínicos de fibroblastos imunomarcados em relação ao total de fibroblastos existentes no tecido conjuntivo para AT2 ($p=0,0024$).

Figura 17 - Representação gráfica da imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 em células inflamatórias das gengivas em três grupos experimentais (n=6): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite. Ø - Somatório dos três grupos clínicos das proporções de células inflamatórias imunomarcadas em relação ao total de células inflamatórias existentes no tecido conjuntivo para AT1 > Somatório das proporções dos três grupos clínicos de células inflamatórias imunomarcadas em relação ao total de células inflamatórias existentes no tecido conjuntivo para AT2 ($p=0,0204$).

Figura 18 - Representação gráfica da imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 em células endoteliais das gengivas em três grupos experimentais (n=6): saúde gengival clínica, gengivite e periodontite.

4.4 Análise da Atividade da ECA

Conforme mostra a Figura 19, foi detectado que a atividade da ECA nos homogenatos de espécimes gengivais, representada pela formação do dipeptídeo His-Leu (nmoles/mg/h) quando utilizado o substrato Hip-His-Leu (que mimetiza Angiotensina I). Tal atividade foi maior, com diferença estatisticamente significativa, no grupo gengivite quando comparado ao grupo com saúde gengival clínica ($p=0,023$). O grupo periodontite também teve maior atividade da ECA que o grupo de saúde gengival clínica, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,072$).

Figura 19 - Representação gráfica da atividade da ECA (nmoles/mg/h de His-Leu formado) por meio do ensaio fluorimétrico após incubação do substrato Hip-His-Leu com os homogenatos dos tecidos gengivais em três grupos experimentais: saúde gengival clínica (n=12), gengivite (n=10) e periodontite (n=12). * Gengivite > Saúde gengival clínica (p=0,023), # Periodontite = Saúde gengival clínica (p=0,072).

4.5 Análise da Formação de Angiotensina II (Ang II) e outros peptídeos do SRA por HPLC

A técnica de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), foi utilizada para detecção de atividades enzimáticas de homogenatos gengivais a partir de incubações com Angiotensina I (precursor de Angiotensina II) e incubações com Angiotensina II dos três grupos experimentais: saúde gengival clínica (n=5), gengivite (n=5) e periodontite (n=5).

Os produtos de hidrólise (convertidos em nanomoles por miligrama de tecido por hora) a partir de Ang I revelaram a formação de Ang 1-9, Ang 1-7, Ang II e outros peptídeos em quantidades diminutas e de menor interesse para os propósitos dessa pesquisa. Na incubação com Ang II foi formada Ang 1-7 e outros peptídeos em quantidades diminutas e de menor interesse para os propósitos dessa pesquisa. Os resultados gráficos de maior interesse podem ser visualizados nas Figuras 20,21,22,23,24 e 25.

4.5.1. Atividade Enzimática usando-se Angiotensina I como substrato

4.5.1.1 - Formação de Angiotensina 1-7

Para cada tipo de incubação não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando os três grupos experimentais ($n=5$; saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) foram comparados entre si (inter-grupos). Com relação a cada tipo de incubação, houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com maior produção de Ang 1-7 nos 3 grupos experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) na incubação dos homogenatos dos tecidos com Angiotensina I + quimostatina quando comparadas com as formações das demais incubações (com captopril, captopril + quimostatina e sem inibição farmacológica).

Figura 20 - Representação gráfica da formação de Ang 1-7 em análise de cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40 µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três condições experimentais: saúde gengival, gengivite e periodontite ($n=5$). O gráfico mostra ainda incubações com captopril (10 µM), com quimostatina (100 µM), com a associação de Captopril e Quimostatina e incubações sem a presença de fármacos. * > que na saúde gengival nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e com a associação de captopril e quimostatina. # > que na gengivite nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e com a associação de captopril e quimostatina. Δ > que na periodontite nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e com a associação de captopril e quimostatina. * # Δ $p < 0,05$.

4.5.1.2.- Formação de Angiotensina 1-9

Somente na situação de incubação sem inibição farmacológica houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na formação de Ang 1-9, com maior produção desse peptídeo na periodontite do que na saúde gengival clínica. Quando ocorreu algum tipo de inibição farmacológica não existiu diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($n=5$; saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) comparados entre si (inter-grupos) na produção de Ang 1-9. Por outro lado, quando houve algum tipo de inibição e cada grupo experimental foi comparado a si mesmo (intra-grupo) para as diferentes situações de incubação, existiram determinadas diferenças estatisticamente significativas. O que mostra que quando se tem inibição não ocorre modulação das diferentes condições teciduais sobre a formação de Ang 1-9. E ao contrário, quando não há inibidor pode-se ter influência do estado inflamatório na produção de Ang 1-9, pois no caso, na periodontite a formação foi maior que na saúde gengival clínica.

Figura 21 - Representação gráfica da formação de Ang 1-9 em análise de cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40 µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três condições experimentais: saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com captopril (10 µM), com quimostatina (100 µM), com a associação de Captopril e Quimostatina e incubações sem a presença de fármacos. * > que na saúde gengival clínica sem inibição farmacológica. # > que na gengivite sem inibição farmacológica e inibição com captopril. Δ > que na periodontite sem inibição farmacológica e inibição com captopril. θ > que na periodontite com captopril. * # Δ θ $p < 0,05$.

4.5.1.3.- Formação de Angiotensina II

Para as quatro condições experimentais de incubação não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (n=5; saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) quando comparados entre si na produção de Ang II.

Por outro lado, quando houve algum tipo de inibição, existiu diminuição da produção de Angiotensina II para gengivite e periodontite sem diferença estatisticamente significativa. Para saúde gengival clínica, com a inibição com captopril houve aumento da produção de Angiotensina II, mas houve diminuição de Ang II nas outras duas inibições (quimostatina e quimostatina + captopril), mas da mesma maneira sem diferença estatisticamente significativa.

As produções de Ang II para os três grupos experimentais de condição clínica estudados (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) diminuíram com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando as vias, a da ECA e as sensíveis à quimostatina, foram inibidas com a associação captopril mais quimostatina. E ocorreram menores produções de Angiotensina II para os três grupos experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) na incubação com quimostatina quando comparada à incubação com captopril, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Os resultados relatados nesse mesmo parágrafo, mostram evidências de que as vias sensíveis à quimostatina talvez tenham maior participação do que a via da ECA na conversão de Angiotensina I em Angiotensina II.

Figura 22- Representação gráfica da formação de Ang II em análise de cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40 µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três condições experimentais: saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com captopril (10 µM), com quimostatina (100 µM), com a associação de Captopril e Quimostatina e incubações sem a presença de fármacos. * < que na saúde gengival nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e com quimostatina. # < que na gengivite nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e com quimostatina. Δ < que na periodontite nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e com quimostatina. * # Δ p < 0,05.

4.5.1.4 – Angiotensina I residual não consumida na reação

Para todas as quatro condições experimentais de incubação não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais ($n=5$), (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) quando comparada a quantidade de Angiotensina I residual não consumida na reação.

Nota-se que na incubação com quimostatina, os grupos saúde gengival e gengivite tiveram maiores quantidades de angiotensina I não consumida nas reações quando comparadas às incubações com captopril e sem inibição farmacológica com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Para o grupo periodontite essas quantidades não consumidas foram maiores nessa incubação com quimostatina quando comparada às outras três (com captopril, captopril mais quimostatina e sem inibição farmacológica) com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 23 - Representação gráfica da quantidade de Ang I que não foi consumida em análise de cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40 µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang I por 1 hora e 30 minutos a 37°C em três condições experimentais ($n=5$): saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com captopril (10 µM), com quimostatina (100 µM), com a associação de Captopril e Quimostatina e incubações sem a presença de fármacos. * > que na saúde gengival nos grupos sem inibição farmacológica e com captopril. # > que na gengivite nos grupos sem inibição farmacológica e com captopril. Δ > que na periodontite nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e na associação de captopril e quimostatina. * # Δ $p < 0,05$.

4.5.2. Atividade Enzimática com HPLC para incubação com Angiotensina II

4.5.2.1 - Formação de Angiotensina 1-7

Para as quatro condições experimentais de incubação não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, $n=5$ (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) quando comparados entre si (inter grupos) na quantidade de Ang1-7. Também não houve diferenças estatisticamente significativas em cada um dos grupos experimentais analisados individualmente (intra-grupos) nas diferentes condições de incubação ($p > 0,05$).

Figura 24- Representação gráfica da formação de Ang 1-7 em análise de cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40 µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang II por 4 horas a 37°C em três condições experimentais ($n=5$): saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com captopril (10 µM), com quimostatina (100 µM), com a associação de Captopril e Quimostatina e incubações sem a presença de fármacos.

4.5.2.2 – Angiotensina II residual não consumida na reação

Para as quatro condições experimentais de incubação não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (inter-grupos), $n=5$ (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) quando comparados entre si (inter-grupo) na quantidade de Ang1-7. E também não houve diferenças estatisticamente significativas em cada um dos grupos experimentais analisados individualmente (intra-grupos) nas diferentes condições de incubação ($p > 0,05$).

Figura 25- Representação gráfica da quantidade de Ang II que não foi consumida em análise de cromatografia líquida de alto desempenho após incubação de 40 µl de homogenato gengival com 30 nanomoles de Ang II por 4 horas a 37°C em três condições experimentais ($n=5$): saúde gengival, gengivite e periodontite. O gráfico mostra ainda incubações com captopril (10 µM), com quimostatina (100 µM), com a associação de Captopril e Quimostatina e incubações sem a presença de fármacos. * > que na saúde gengival nos grupos sem inibição farmacológica e com captopril. # > que na gengivite nos grupos sem inibição farmacológica e com captopril. Δ > que na periodontite nos grupos sem inibição farmacológica, com captopril e na associação de captopril e quimostatina. * # Δ $p < 0,05$.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Os resultados da presente pesquisa foram obtidos mediante utilização de diferentes técnicas laboratoriais que caracterizaram inequivocamente no tecido gengival humano a existência de um sistema renina-angiotensina (SRA) local, independente do sistema circulante plasmático, que já é bem estabelecido como um sistema regulatório cardiovascular (PEACH 1977). Os achados corroboram as evidências da produção local de componentes do SRA bem documentadas em outros tecidos e órgãos do corpo humano (SANTOS et al 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; YOSHIDA et al, 2006; BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011) em diversos modelos de estudos em animais (AGOUDEMOS; GREENE, 2005; BECARI et al., 2005) com indução de doença (OHUCHI et al., 2002; SEGAWA et al., 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI et al., 2004; LIU et al., 2011). Pode-se citar como modelos confiáveis de estudo: a indução de doença periodontal em ratos (SANTOS et al., 2009) e estudos *in vitro* com células de origem humana, principalmente com fibroblastos gengivais cultivados (NAKAMURA et al, 2011) e com a indução de doença no compartimento do ligamento periodontal (MONNOUCHI et al, 2011). Esses estudos demonstraram, assim como o presente trabalho, comportamento de um SRA local em tecidos periodontais envolvido com os processos inflamatórios da doença periodontal. Assim como no tecido gengival de rato (SANTOS et al., 2009), esta tese é o primeiro trabalho a documentar a existência de um SRA completo e funcional no tecido gengival humano.

Não somente fibroblastos, mas ultimamente outras células de relevante importância no estudo da interação entre o SRA e a Periodontia vêm sendo investigadas, dentre as quais pode-se citar os osteoblastos (GURKAN et al., 2009).

O paradigma que envolve o questionamento de sistemas renina-angiotensina locais ou teciduais e que extrapola o sistema clássico circulante, tornou-se intrigante há quatro décadas, em virtude de achados de componentes protéicos peculiares ao sistema em sítios aparentemente incomuns (PAUL; MEHR; KREUTZ 2006). Pode-se citar a renina, com funções fisiológicas inerentemente renais como o próprio nome indica e tipicamente encontrada no rim, mas que teve sua presença detectada por

exemplo no cérebro de cães (GANTEN et al., 1971), cujas funções endócrinas por si só seriam insuficientes para explicar a necessidade da presença ativa desse sistema fisiológico (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Mais recentemente, os achados experimentais expandiram e credenciaram o conceito de um sistema local, aumentando a compreensão da complexidade do sistema mediante a caracterização de diferentes receptores, funções biológicas (NICKENIG et al., 1997; LUNDERGAN et al., 1999; HIRUMA et al., 1997; HAGIWARA et al., 1998; LAMPARTER et al., 1998; LEUNG, 2004; SEGAWA et al., 2003) e vias de sinalização intra-celular para angiotensina II (Ang II), octapeptídeo ativo, vasoconstritor e principal efector do sistema em questão (PAUL; MEHR; KREUTZ 2006) .

Diante desse contexto, não seria infundado que linhas de pesquisa do sistema renina-angiotensina naturalmente caminhassem também na direção da Odontologia, mais precisamente da Periodontia. Na literatura há evidências sólidas acerca da existência de componentes do SRA no tecido gengival e em fibroblastos cultivados de diferentes espécies animais (OHUCHI et al., 2002; SEGAWA et al., 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI et al., 2004; SANTOS et al., 2009). O avanço nas pesquisas é tão promissor, que envolve até mesmo o estudo do polimorfismo genético do SRA em relação à periodontite severa crônica (GURKAN et al 2009).

Os resultados do presente estudo são inéditos, uma vez que não existem na literatura científica estudos transversais *in vivo* que investiguem o comportamento do sistema renina-angiotensina localmente em tecidos gengivais humanos sadios e inflamados, mediante a realização de técnicas laboratoriais complementares que verifiquem e caracterizem o perfil de expressão gênica, de atividade enzimática funcional *in vitro* e da imunolocalização final de diferentes proteínas que compõem e desempenham papel chave em diversos pontos na cascata fisiológica desse complexo sistema.

É de suma importância, como realizada na presente pesquisa, a verificação do comportamento de um sistema renina-angiotensina local nos tecidos gengivais humanos tanto nos estados de saúde como patológicos (NAKAMURA et al 2011),

uma vez que a doença periodontal é uma enfermidade inflamatória e infecciosa (PAGE, 1986). Soma-se o fato de que relatos na literatura enfatizam o aumento da expressão de componentes do SRA quando da presença de inflamação em qualquer tecido (SOUZA et al., 2007; STECKELINGS et al., 2005). Vale ressaltar que a própria Ang II tem ações pró-inflamatórias via receptor AT1 (DOUILLETTE et al., 2006) pela expressão de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), e várias quimiocinas, tais como proteínas quimioatrativas para monócitos (MCP-1) e moléculas de adesão celular (NATARAJ et al., 2009; SUZUKI et al., 2003).

No presente trabalho, os resultados de experimentos de qPCR, conforme Figura 8 do capítulo Resultados, confirmaram a capacidade do tecido gengival humano sob diferentes condições teciduais clínicas (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) em expressar RNA_m para diferentes genes alvos do SRA em relação a um gene de referência humano, no caso RPL13. Foram eles: angiotensinogênio (AGTN), renina (REN), enzimas conversoras de angiotensina (ECA e ECA-2) e receptores de angiotensina tipo I (AT1) e do tipo MAS. Os resultados encontrados para as diferentes condições clínicas de inflamação ou de saúde gengival clínica concordam com outros achados quanto à expressão de RNA_m de receptor do tipo MAS, da proteína plasmática angiotensinogênio, das enzimas renina, ECA, ECA-2 (DONOGHUE et al., 2000; SANTOS et al., 2009; NAKAMURA et al 2011) e receptores do tipo AT1 (PAUL, MEHR, KREUTZ 2006; LIU et al 2011; NAKAMURA et al 2011).

Quanto à enzima ECA, que converte angiotensina I em angiotensina II, os resultados do presente trabalho têm respaldo nos obtidos por Ohuchi *et al.* (2002), pois estes autores demonstraram que o tratamento com captopril (inibidor da ECA) diminuiu a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaio estimulados por Ang II, ou seja, indiretamente esses autores demonstraram a presença da ECA nestas células. No trabalho atual, nas condições estudadas, foi observada a expressão de RNA_m para a ECA nos tecidos gengivais humanos.

Também concordam com os resultados obtidos trabalhos que demonstraram a expressão de angiotensinogênio e renina em condição de saúde gengival, quando fibroblastos saudáveis foram cultivados *in vitro*. E que assim como nestes resultados (Figura 8), também não encontraram aumento da expressão dessas duas proteínas

quando compararam uma situação que mimetizou saúde gengival com fibroblastos cultivados a partir de tecidos gengivais humanos saudáveis sem estimulação com interleucina 1 β (IL-1 β), com uma situação que mimetizou doença com os mesmos fibroblastos cultivados a partir de tecidos saudáveis, porém sem estímulo com IL-1 β (NAKAMURA et al, 2011). Com relação à renina, sabe-se que mastócitos são fontes abundantes desta enzima (SILVER et al., 2004; VEERAPPAN et al., 2008), talvez por isso tenha ocorrido uma expressão diferencial aumentada, ainda que sem diferença estatística, na condição de periodontite quando comparada à gengivite e saúde gengival clínica no presente trabalho (Figura 8).

Ainda que sem diferenças estatísticas, conforme visto na Figura 8 do capítulo Resultados, as expressões de RNA_m dos componentes do RAS, obtidas no presente trabalho mostram uma tendência de variação conforme o diferente estado inflamatório do tecido gengival. O fato de não se verificar diferença estatística entre os três grupos experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) não significa dizer que a inflamação não modula o SRA ou vice-versa. Muito pelo contrário, uma das prováveis explicações reside nos próprios resultados histológicos de contagem celular do infiltrado inflamatório (Figuras 7A, 7B E 7C). Na presente pesquisa, o número de linfócitos, importante célula inflamatória, não diferiu estatisticamente entre os grupos periodontite e saúde gengival, o que não é impossível de ocorrer devido à natureza crônica da periodontite, em muitas vezes com surtos episódicos agudos de atividade de doença e com longos períodos de latência em equilíbrio com as defesas imunológicas do hospedeiro (HAFFAGE; SOCRANSKY; GOODSON, 1983; PAGE, 1986; PAGE 1991). Este conceito é suportado por trabalhos que demonstram que diferentes estados inflamatórios periodontais observados clinicamente nos pacientes nem sempre possuem correlação estatística com os aspectos inflamatórios histológicos durante a evolução da doença periodontal (PAGE; SCHROEDER, 1976; FIGUEIREDO, 2005), principalmente em se tratando de estudos transversais *in vivo*, como é o caso do modelo de estudo do presente trabalho.

Outra possibilidade que pode ser especulada é a quantidade de RNA_m que possa estar sendo expressa num dado momento da maquinaria celular dos indivíduos da amostra, já com doença periodontal (gengivite ou periodontite) instalada, na maioria das vezes crônica ou em progressão lenta. Desta forma, é

perfeitamente possível que tecidos com diferentes estados inflamatórios possam ter demandas parecidas para que o organismo produza determinadas proteínas de maneira semelhante com expressões de RNA_m por conseguinte também parecidas, conforme o *feedback* regulatório para aumento ou produção de determinados componentes (JACKSON, 1995), como ocorre no caso de sistemas com complexas cascatas e vias de sinalização, dentre os quais o estudado na presente pesquisa.

Soma-se a esse conceito, a devida explicação de que o *feedback* regulatório no SRA muitas vezes pode estar atrelado à maior ou menor microcirculação sanguínea presente no tecido gengival, pois não, se pode esquecer que o SRA além de local é plasmático por natureza. Por exemplo, a produção de renina, enzima importantíssima no início da cascata fisiológica do SRA, pode conforme o *feedback* regulatório, aumentar ou diminuir a produção de renina circulante afetando a produção local (VERDECCHIA, 2008).

Desta forma também não é surpreendente o fato de não ser constatada nestes experimentos de RT-qPCR, a presença de expressão de RNA_m do receptor AT2, ao contrário do AT1, que teve sua expressão verificada em qPCR. Receptores AT2 atuam com efeitos antagônicos aos receptores AT1, ou seja têm efeitos mais anti-proliferativos, vasodiladores dentre outros. E na presença de doença pode-se especular até que sua expressão seja alterada para mais ou para menos conforme a necessidade de maior ou menor defesa do hospedeiro frente a processos inflamatórios como apontam alguns trabalhos em outros tecidos do organismo (CAREY; WANG; SIRAGY, 2000), ainda que escassos especificamente para tecidos periodontais.

Tais receptores AT2 são predominantemente expressos no período fetal e uma situação reversa ocorre após o nascimento, quando podem ter maior expressão frente a injúrias (CAREY; WANG; SIRAGY, 2000). Isto exposto, pode-se inferir que dependendo da situação de momento da doença ou da saúde gengival clínica, como em nosso estudo transversal, a expressão de RNA_m para AT2 pode ou não estar sendo requisitada conforme o padrão de injúria.

Na mesma linha de raciocínio, acerca de injúria *versus* defesa do hospedeiro, o receptor do tipo MAS, ainda que sem diferença estatisticamente significativa como

os outros componentes do SRA quanto à expressão de RNA_m, também foi expresso nos tecidos gengivais nos três grupos experimentais de nossa pesquisa, o que abre perspectivas de posteriores estudos devido à escassez de trabalhos com esse receptor em tecidos periodontais, uma vez que o receptor MAS desempenha importante papel vasodilatador e anti-proliferativo (SANTOS et al., 2003b), o que pode vir a ser importante em possíveis pesquisas de interação entre SRA e Periodontia.

Como são os dois principais receptores para angiotensina II (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006), os receptores AT1 e AT2 foram escolhidos para ser estudados na presente pesquisa. Eles foram imunolocalizados nos tecidos gengivais nas três condições clínicas estudadas para diferentes tipos celulares, concordantemente com outros trabalhos nos quais células epiteliais expressaram receptores para Ang II (KÖNIGSHOFF et al., 2007; YAHATA et al., 2006)

O fato de que AT1 e AT2 estavam presentes sem diferença estatisticamente significativa também não descarta a teoria perfeitamente plausível da participação do SRA na inflamação periodontal, pois outras técnicas no presente estudo, como os resultados de ensaio fluorimétrico, demonstraram que na atividade funcional existem evidências de diferenças importantes entre saúde gengival clínica, gengivite e periodontite.

Os achados de imunomarcacão em tecidos gengivais humanos corroboram os de outros autores em relação à expressão de receptores AT1 em fibroblastos cultivados de tecido gengival de diferentes espécies, tais como cobaio, humano, furão e coelho (OHUCHI et al., 2002; SEGAWA et al., 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003) e de outros trabalhos que detectaram a produção de receptor AT2 pela técnica de Western blot em fibroblastos cultivados de tecido gengival de coelho (OHUCHI et al., 2004).

Com relação às atividades funcionais *in vitro* dos componentes do SRA em tecidos gengivais humanos, os resultados do presente trabalho não deixam dúvidas de que existe uma interação entre os processos inflamatórios das doenças periodontais com este sistema.

Nessa pesquisa, os resultados de experimentos de RT-qPCR mostraram a capacidade do tecido gengival em expressar RNAm para a ECA. Para testarmos se realmente esta enzima é produzida localmente neste tecido, usou-se o método de medida da atividade desta peptidase sobre o substrato específico Hip-His-Leu, analisando a liberação do dipeptídeo His-Leu em ensaio fluorimétrico (Atividade da ECA, detalhada no item 4.4 dos Resultados).

Os resultados (Figura 19) mostraram de maneira inequívoca a presença de atividade da ECA em todas as amostras de homogenato de tecido gengival testadas. Ocorreu diferença entre os estados de gengivite e saúde gengival clínica com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o que aponta uma forte evidência, apesar deste estudo ter sido transversal, de que na progressão da saúde clínica gengival para gengivite um mecanismo de disparo (“trigger”) possa ser especulado no SRA na presença da inflamação periodontal.

Vale ressaltar que a própria Ang II tem ações pró-inflamatórias (DOUILLETTE et al., 2006), sendo válido inferir que Ang II pode contribuir para um aumento da atividade da ECA, enzima que converte Ang I em Ang II, uma vez que determinados estudos com Ang II exógena mostraram aumento da ECA em fibroblastos (OHUCHI et al., 2002). Recentes estudos têm demonstrado mecanismos autócrinos da Ang II em alguns tipos celulares (ZHUO et al., 2006). Este fato foi comprovado quando fibras do ligamento periodontal foram submetidas a estresse mecânico induzido, o que gerou processo inflamatório e por conseguinte modulou fortes expressões de proteínas de angiotensinas no interior do citoplasma de fibroblastos desse importante compartimento do periodonto de sustentação (MONNOUCHI et al 2011).

Os experimentos bioquímicos (item 4.5 dos Resultados) com diferentes incubações com e sem inibição farmacológica, cujos resultados foram revelados pela técnica de HPLC, são bastante interessantes pois mostram algumas evidências da interação entre inflamação, componentes do sistema e uso de inibidores farmacológicos. Quando Ang I foi ofertada como substrato observou-se a formação de três produtos principais: Ang1-7, Ang 1-9 e Ang II. E quando Ang II foi ofertada, a Ang 1-7 foi o principal produto.

Atualmente muita ênfase tem sido dada às vias alternativas para produção de Angiotensina II, como as vias sensíveis à quimostatina, por exemplo enzimas serino-proteases (BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011) ou a da ECA-2, uma carboxipeptidase capaz de clivar seqüencialmente a Ang I, levando à formação de Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7. Todavia, é importante lembrar que esta enzima tem atividade catalítica muito superior sobre a Ang II do que sobre Ang I (RAIZADA; FERREIRA, 2007; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008; KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006).

A ECA também forma inequivocamente Ang II e Ang 1-7 no tecido gengival de rato (SANTOS et al., 2009), uma vez que a literatura documenta que esta enzima forma Ang II a partir de Ang I e Ang 1-7 a partir de Ang 1-9 (RAIZADA; FERREIRA, 2007; KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

No caso da formação da Angiotensina 1-7 (Figura 20), o estado clínico dos três grupos de tecidos gengivais humanos estudados no presente trabalho, não influenciou na produção de Ang 1-7, pois os níveis da mesma não foram estatisticamente diferentes para os três grupos experimentais (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite) comparados todas entre si (inter-grupos) para todas as condições experimentais de incubação. Nesse aspecto, pareceu então não haver modulação da inflamação sobre a atividade da ECA em clivar Ang 1-9 em Ang 1-7 (Figuras 1 e 3), mas sim uma dependência em relação ao tipo de inibidor usado, visto que a quimostatina inibe vias sensíveis à quimostatina, mas não inibe a ECA, que converte Ang 1-9 em Ang 1-7.

No caso da formação de Ang II (Figura 22), principal efetor do SRA, não houve diferença estatisticamente significativa com relação aos diferentes grupos estudados (saúde gengival clínica, gengivite e periodontite), o que não significa que não ocorreu interação entre inflamação periodontal e SRA. É interessante notar na comparação entre saúde gengival clínica e gengivite, quadro inflamatório que pode possuir mediadores inflamatórios mais exacerbados do que na periodontite dependendo dos indivíduos e suas respostas (PAGE, 1986), houve diminuição de Ang II produzida, ainda que sem diferença estatisticamente significativa, mas que

hipoteticamente pode ter contribuído para os resultados de aumento de Ang 1-9 na inflamação, que é produzida por outra via.

Esses resultados dos níveis de Ang 1-9 (Figura 21), gerada nas diferentes formas de incubação, demonstraram que quando os tecidos gengivais sob as três condições clínicas diferentes foram incubados com Ang I sem qualquer inibidor farmacológico, existiu diferença estatisticamente significativa na produção do peptídeo Ang 1-9 somente entre os grupos periodontite e saúde gengival ($p < 0,05$), o que corrobora a hipótese de que o estado fisiopatológico distinto entre esses tecidos possa estar modulando se não todo, ao menos parte do SRA, pois contribuiu para uma maior clivagem de Ang I em Ang 1-9.

Uma possível explicação para estes resultados de menor produção de Ang II e aumento de Ang1-9 em situações inflamatórias pode ser aventada a partir dos dados relatados por outros autores, em que foi demonstrada a inibição da ECA pela Ang 1-9, quando esta se encontrava em concentração micromolar (SNYDER; WINTROUB, 1986; MARCIC et al., 1999). Os valores obtidos na Figura 21 permitem supor e calcular, que nas condições utilizadas no atual trabalho, Ang 1-9 foi formada sempre em uma concentração suficiente para inibir a ECA, o que poderia justificar a baixa quantidade de Ang II, ao menos nos casos de gengivite comparadas à saúde gengival clínica e periodontite com inibição de quimostatina + captopril e ao compararmos aos valores produzidos de Ang 1-9 quando da inibição com quimostatina (Figuras 21 e 22). Outra possível explicação para isso, que pode ser especulada e necessita de mais estudos, é que quanto maior o grau inflamatório pode haver maior atividade da ECA, como demonstrado em experimento realizado nesta pesquisa. Tal experimento apontou maior atividade da ECA nos tecidos com gengivite, o que potencializaria essa via pela enzima ECA, que provavelmente competiria com as enzimas sensíveis à quimostatina pelos mesmos sítios de ligação da Ang I.

E nessa competição, cujos resultados (Figuras 20 a25) mostram uma prevalência das vias sensíveis à quimostatina sobre a via da ECA, devido aos resultados de formação dos diferentes peptídeos, provavelmente daria oportunidade para que outras enzimas que clivam Ang I em Ang 1-9 se sobressaíssem, no caso ECA-2 e carboxipeptidases que vêm sendo sugeridas em revisões de literatura por

ter uma participação maior na cascata do SRA (BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011).

Os valores apresentados nos ensaios bioquímicos apontam uma tendência para o fato de uma maior atividade das enzimas sensíveis à quimostatina (via alternativa), como a quimase humana dentre outras em humanos, do que a atividade da ECA (via clássica) na conversão de Ang I em II, o que requer mais estudos em tecidos gengivais, ao contrário do que está bem estabelecido em modelos animais, conforme trabalhos que demonstraram que elastase-2 do rato e quimase 1 do rato têm importantes papéis formadores (PAULA et al., 2002; SANTOS et al., 2002a) e degradadores de Ang II (LE TRONG; NEURATH; WOODBURY, 1987), respectivamente, e são importantes enzimas serino-proteases sensíveis à quimostatina.

Os resultados mostram neste trabalho que o papel dos inibidores de vias conversoras de Ang I em Ang II, sem sombra de dúvidas prevalecem sobre o efeito modulador da inflamação. Todavia, essa última não pode ser descartada para posteriores estudos. Portanto, trabalhos futuros poderão ter como foco a investigação do efeito do processo inflamatório periodontal voltados a um mais profundo entendimento de outras vias conversoras de Ang I em Ang II, como por exemplo as vias da ECA-2 e carboxipeptidases não investigadas nesse estudo, uma vez que o propósito inicial foi de caracterizar e conhecer o SRA nas diferentes condições clínicas do tecido gengival humano.

Vale ressaltar que poucos são os trabalhos na literatura sobre a presença de todos os componentes do SRA no tecido gengival, principalmente que associem as atividades enzimáticas funcionais com detecção de expressões de RNA_m e a proteína já pronta e detectada nos tecidos. Neste sentido, trabalhos com indução de doença periodontal em ratos ainda são de extrema importância para a tentativa de entendimentos dos mecanismos do SRA nos tecidos periodontais e o estabelecimento de protocolos de estudo voltados aos tecidos humanos.

Em, síntese, fato é que indubitavelmente o presente trabalho contribuiu para o estudo do SRA localizado em tecido gengival independentemente do SRA circulante. Os resultados obtidos permite-nos afirmar que existe um sistema renina-

angiotensina funcional local no tecido gengival humano e que este sistema, conforme suas diferentes vias, sofre modulação de acordo com as as diferentes condições clínicas do tecido gengival testadas.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. Existe um Sistema Renina-Angiotensina (SRA) local no tecido gengival humano que expressa os componentes angiotensinogênio, renina, ECA, ECA-2, receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) e do tipo MAS em saúde gengival clínica, gengivite e periodontite. Não há diferenças estatisticamente significativas entre essas três condições para todos os componentes citados.
2. Há imunomarcagem para os receptores de angiotensina AT1 e AT2 sem diferenças estatisticamente significativas entre as condições saúde clínica gengival, gengivite e periodontite.
3. Em condições *in vitro*, no homogenato de tecido gengival humano houve maior atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) nas amostras afetadas por gengivite em comparação às amostras com saúde gengival clínica com diferença estatisticamente significativa;
4. Em condições *in vitro*, no homogenato de tecido gengival humano há enzimas que levam à formação de peptídeos vasoativos importantes do SRA: Ang 1-7, Ang 1-9, e AngII. Na incubação com AngI há formação de Ang 1-7 e Ang II sem diferenças estatisticamente significativas entre as condições saúde gengival clínica, gengivite e periodontite. Houve maior formação de Ang 1-9 nas amostras afetadas por periodontite em comparação às amostras com saúde gengival ($p < 0,05$).

Em síntese, pode-se concluir que existe um SRA local no tecido gengival humano com diferenças sugestivas entre saúde gengival clínica, gengivite e periodontite, com maior atividade funcional nos tecidos gengivais acometidos pela gengivite e periodontite.

Referências

REFERÊNCIAS

- Agoudemos MM, Greene AS. Localization of the renin-angiotensin system components to the skeletal muscle microcirculation. *Microcirculation*. 2005; 12(8):627-36.
- Albiston AL, Yeatman HR, Pham V, Fuller SJ, Diwakarla S, Fernando RN, et al. Distinct distribution of GLUT4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney. *Regul Pept*. 2011;166(1–3):83–9.
- Amaral SL, Linderman JR, Morse MM, GreeneAS. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. *Microcirculation*. 2001a;8(1):57-67.
- Arakawa K. Serine protease angiotensin II systems. *J Hypertens*. 1996;14(5): Suppl S3-7.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1-6.
- Becari C, Sivieri DO Junior, Santos CF, Moysés MK, Oliveira EB, Salgado MC. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; 46(4):498-504.
- Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44:1-6. Review.
- Bem-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensin mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1988;255:E70-9.
- 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; 82(1):33-7.
- Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 1998 Nov;33(8):491-9.
- Borges Jr I, Moreira EAM, Wilhem Filho D, Oliveira TB, Silva MBS, Fröde, TS “Proinflammatory and Oxidative Stress Markers in Patients with Periodontal Disease” *Mediators of Inflammation*. 2007, Article ID 45794, 5 pages, 2007. doi:10.1155/2007/45794.
- Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 1940;98:283–98.
-

Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*. 1976; 191(4231):1050-1.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*. 1987; 79(1):1-6.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000;35:155-63.

Carranza FA, Takei, H.H. Curetagem gengival. In: Newman MG, Takei, H.H, Carranza FA. *Carranza Periodontia Clínica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; c 2004. p662-625

Cassis P, Conti S, Remuzzi G, Benigni A. Angiotensin receptors as determinants of the life span. *Pflügers Arch*. 2010; 459:325-332.

Chen Z, Tan F, Erdös EG, Deddish PA. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension* 2005; 46(6):1368-73.

Cook JL, Mills SJ, Naquin R, Alam J, Re RN. Nuclear accumulation of the AT1 receptor in a rat vascular smooth muscle cell line: effects upon signal transduction and cellular proliferation. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40(5):696–707.

Cunha V, Salgado HC, Salgado MC. Enalapril prevents aortic hyperreactivity and remodelling in one-kidney, one-clip hypertensive rats without reducing arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(7):474-9.

Daugherty A, Poduri A, Chen W, Lu H, Cassis LA. Genetic Variants of the Renin Angiotensin System: Effects on Atherosclerosis in Experimental Models and Humans. *Curr Atheroscler Rep*. 2010;12:167–173.

Davis GK, Roberts DH. Molecular Genetics of the Renin-Angiotensin System: Implications for Angiotensin II Receptor Blockade. *Pharmacol Ther*. 1997;75(1):43-50.

De Cavanagh EMV, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular Structure and Oxidative Stress in Salt-Loaded Spontaneously Hypertensive Rats: Effects of Losartan and Atenolol. *Am J Hypertension*. 2010. Dez;23(1):21318-25.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(3):415-72.

Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:55-76.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase (ACE 2) converting angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000; 87:E1-E9.

Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clément JF, Chénard V, Moreau P, Servant MJ, et al. The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the I κ B kinase complex. *J Biol Chem*. 2006; 281(19):13275-84.

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

Erdős EG, Skidgel RA. The unusual substrate specificity and the distribution of human angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 1986; 8 (Suppl 1):34-7.

Faustino SE, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37: 372-78.

Ferreira SB Júnior, Figueiredo CM, Almeida ALPF, Assis GF, Dionísio TJ, Santos CF. Clinical, histological, and microbiological findings in Peri-implant disease: a pilot study. *Implant Dentistry* 2009;18(4): 334-344.

Figueiredo CM. Avaliação comparativa da fidedignidade dos escores (IG), de sangramento do sulco gengival (ISSG) e de placa dentobacteriana (IPL) em seres humanos. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):32-8.

Friis UG, Jensen BL, Aas, JK, Skøtt O. Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circulation Res*. 1999;84:929-36;

Ganten et al. Renin in dog brain. *Am J Physiol*. 1971;221:1733-37.

Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004;31: 671-79.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic bloodpressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934;59:347–79.

Gomez RA, Norling LL, Wilfong N, Isakson P, Lynch KR, Hock R, Quesenberry P. Leukocytes synthesize angiotensinogen. *Hypertension*. 1993;21(4):470-5.

Gurkan et al. Renin-angiotensin gene polymorphism in relation to severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36:204-11.

Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 1983 May; 10(3): 257-65.

Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol.* 1998;156(3):543-50.

Hall ER, Kato J, Erdös EG, Robinson CJG, Oshima G. Angiotensin I-converting enzyme in the nephron. *Life Sci.* 1976;18:1299-303.

Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8: 217–236.

Hirasawa K, Sato Y, Hosoda Y, Yamamoto T, Hanai H. Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor and local rennin-angiotensin system in human colonic mucosa. *J Histochem Cytochem.*2002;50(2):275-82.

Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230(1):176-8.

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 1998; 32(3):387-92.

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

Ingelfinger JR. Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18(1):79–84.

Jackman HL, Massad MG, Sekosan M, Tan F, Brovkovich V, Marcic BM, Erdös EG. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension.* 2002;39(5):976-81.

Jackson EK, Garrison JC. Renin and angiotensin. In: Molinoff PB, Ruddon, Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics.* New York: McGraw-Hill, 1995. p. 733-58.

Jackson TR, Blair AC, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature.* 1988; 335: 437-40.

Kinane DF, Lindhe J. Patogênese da Periodontite. In: Lindhe, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; c1997.p. 127-152

Komlosi et al. Angiotensin I conversion to Angiotensin II stimulates cortical collecting duct sodium transport Hypertension. 2003, 42: 185-199.

Königshoff M, Wilhelm A, Jahn A, Sedding D, Amarie OV, Eul B, et al. The angiotensin II receptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in lung fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;37(6):640-50.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. 2006;57(4):529-39.

Lamparter S, Kling L, Schrader M, Ziegler R, Pfeilschifter J. Effects of angiotensin II on bone cells in vitro. J Cell Physiol. 1998;175(1):89-98.

Leite R, Salgado MCO. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. Hypertension. 1992; 19(6 Pt 1):575-81.

Le Trong H, Neurath H, Woodbury RG. Substrate specificity of the chymotrypsin-like protease in secretory granules isolated from rat mast cells. Proc Natl Acad Sci. 1987; 84(2):364-7.

Leung PS. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. Curr Protein Pept Sci. 2004;5(4):267-73.

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

Linderman JR, GreeneAS. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. Microcirculation. 2001;8(4):275-81.

Liu et al. Captopril improves osteopenia in ovariectomized rats and promotes bone formation in osteoblasts. J Bone Minerals Metab. 2011;29:149-58.

Löe H. Periodontal diseases: a brief historical perspective. Periodontology 2000. 1993 Jun;2:7-12. Review

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;34(4):223-8.

Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdös EG. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. Hypertension. 1999;33(3):835-43.

Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Kono K, Akamine A. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. *J Dent Res*. 2011;90:181-85.

Nakamura T, Nakamura-Hasegawa 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 fibroblast. *Eur J Oral Sci*. 2011;119:345-51.

Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly CSA, Ruiz P, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest*. 1999;104(1):1693-1701.

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

Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):375-84.

Oguru H, Tsuchikawa K. The effect of angiotensin II on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Odontology*. 2009;97:97-102.

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; 132(4):451-60.

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

Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens*. 1984; 2(3):277-84.

Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;149(3):1186-92.

Oliveira EM, Santos RA, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(7):755-64.

Oliveira MA, Fortes ZB, Santos RA, Kosla MC, De Carvalho MH. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation in vivo. *Peptides*. 1999; 20(10):1195-201.

Oliveira, TM 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):1062-9.

Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal disease in the United States population. *J. Periodontol.* 1998; 69(2):269-78.

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

Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res.* 1998;82(5):619-28.

Page RC, Gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1986;13(5):345-59. Review.

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

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med.* 1940;71:29–42.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976;34:235-249.

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

Paula CA, Sousa MV, Salgado MC, Oliveira EB. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1388(1):227-38.

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1977;57(2):313-70.

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.

Pippin DJ. Fate of pocket epithelium in an apically positioned flap. *J Clin Periodontol* 1990 Jul; 17(6):385-91.

Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50(2):112-9.

Re RN. Tissue renin-angiotensin systems. *Med Clin North Am.* 2004;88:19-38.

Recinos A, et al. Angiotensin II induces IL-6 expression and the Jak-STAT3 pathway in aortic adventitia of LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007; 194: 125–133.

Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol*. 2008;39(3):275-82.

Santos CF, Paula CA, Salgado MCO, Oliveira EB. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002a; 80(1):42-7.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MCO, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002b; 39(5):628-35.

Santos CF, Caprio MA, Oliveira EB, Salgado MC, Schippers DN, Munzenmaier DH, et al. Functional role, cellular source and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(2):H775-83.

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

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; 80(1):130-9.

Santos RA, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, De Buhr I, et al. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003b;100:8258-63.

Santos RAS, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero JL, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988;11:153-7.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of Ang 1-7. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27: 1033- 47.

Saijonmaa O, Nyman T, Kosonen R, Fyhrquist F. Upregulation of angiotensin-converting enzyme by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; Feb;280(2):H885-91.

Schinzari F, Tesauro M, Rovella V, Adamo A, Mores M, Cardillo C. Coexistence of functional angiotensin II type 2 receptors mediating both vasoconstriction and vasodilation in humans. *Hypertension*. 2011; 29:1743–1748.

Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiya H, Furuyama S. Angiotensin II induces prostaglandin E(2) release in human gingival fibroblasts. *Life Sci*. 2003; 72(7):795-803.

Shalamanova L et al. Characterisation of the Expression of the Renin-Angiotensin System in primary and immortalised human renal proximal tubular cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;116(3):e53-e61.

Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, Herzlinger D, Levi R. Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(37):13607-12.

Sivieri DO Jr, Bispo-da-Silva LB, Oliveira EB, Resende AC, Salgado MC. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. *Hypertension*. 2007; 50(1):110-5.

Skiribic R; Ijic R. Seven decades of angiotensin. *Peptides*. 2009; 30:1945-1950. Review.

Skeggs LT, Khan JR, Shumway NP. Preparation and function of the hypertension converting enzyme. *J Exp Med*. 1956;103:295–9.

Snyder RA, Wintroub BU. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des-Leu10-angiotensin I: a potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 871(1):1-5.

Souza PPC, Fukada SY, Cunha FQ, Costa CAS, Costa-Neto CM. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regul Pept*. 2007; 140:27-31.

Speth RC, Thompson SM, Johns SJ. Angiotensin II receptors. Structural and functional considerations. *Adv Exp Med Biol*. 1995; 377:169-92.

Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, Unger T, Artuc M. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br J Dermatol*. 2005; 153(5):887-93.

Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M, Izumi Y. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2003;38(1):90-6.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003 Jun;35(6):881-900.

Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. Scand Arch Physiol. 1898;8:223–71.

Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. Circ Res. 1990a; 66(4):883-90.

Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. J Biol Chem. 1990b; 265(36):22348-57.

Urata H, Nishimura H, Ganten D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. Eur Heart J. 1995; 16 Suppl N:79-85.

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

Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. Vascular health and Risk Manegement. 2008; 4(5) 971-981.

Veerappan A, Reid AC, Estephan R, O'Connor N, Thadani-Mulero M, Salazar-Rodriguez M, et al. Mast cell renin and a local renin-angiotensin system in the airway: Role in bronchoconstriction. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(4):1315-20.

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.

Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin- a new look at an old system. Prog Neurol. 2011; 95:49-67.

Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries and clinical targets. Prog Neurobiol. 2008; 84(2):157-81.

Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, et al. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. J Biol Chem. 2006; 281(19):13209-16.

Yang HYT, Neff NH. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. J Neurochem. 1972;19:2443-50.

Yoshida H et al. Interleukin-1 beta enhances the angiotensin-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 through angiotensin receptor upregulation in human astrocytes. Brain Res. 2006;1074:38–47.

Zhao Q, Ishibashi M, Hiasa K, Tan C, Takeshita A, Egashira K. Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling. *Hypertension*. 2004;44(3):264-70.

Zhuo JL, Li XC, Garvin JL, Navar LG, Carretero, OA. Intracellular ANG II induces cytosolic Ca^{+2} mobilizing by stimulating intracellular AT1 receptors in proximal tubule cells. *Am J physiology Renal Physiol*. 2006;290:F1382-90.

Zhuo JL, Li XC. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*. 2011;32:1551-65. Review.

Anexo

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 125/2010

Bauru, 30 de setembro de 2010.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **“Caracterização do sistema renina-angiotensina local no tecido gengival humano sadio e com doença periodontal.”**, de autoria de Caio Márcio Figueiredo, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de setembro de 2010 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Docente do Departamento de Ciências Biológicas