UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LILIAN GOBBO DE FREITAS BUENO GABRIELE

**Avaliação dos eixos ECA / ANG II / AT1 e ECA-2 / ANG (1-7) / MAS
em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos
estimulados por IL-1 β e sua contribuição na produção e regulação
de citocinas e quimiocinas**

BAURU
2016

LILIAN GOBBO DE FREITAS BUENO GABRIELE

**Avaliação dos eixos ECA / ANG II / AT1 e ECA-2 / ANG (1-7) / MAS
em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos
estimulados por IL-1 β e sua contribuição na produção e regulação
de citocinas e quimiocinas**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

VERSÃO CORRIGIDA

BAURU
2016

G114a   Gabriele, Lilian Gobbo de Freitas Bueno
Avaliação dos eixos ECA / ANG II / AT1 e ECA-2 /
ANG (1-7) / MAS em fibroblastos de gengiva e
ligamento periodontal humanos estimulados por IL-1 β
e sua contribuição na produção e regulação de
citocinas e quimiocinas / Lilian Gobbo de Freitas
Bueno Gabriele – Bauru, 2016.
127 p.: il.; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

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

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 970.747
Data: 24/02/15

DEDICATÓRIA

*Dedico ao meu marido João Francisco e meus filhos
Tiago e Manuela*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, abençoando e iluminando minhas decisões.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pela realização deste estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos pela oportunidade, orientação e amizade durante esses anos de trabalho.

À Dra Ana Carolina Morandini Ramos, muito obrigada por tudo que me ensinou durante o doutorado. Agradeço sua paciência e dedicação.

Ao especialista do laboratório, Thiago José Dionísio, pela sua atenção e seus ensinamentos em vários momentos deste estudo.

À pós-doutoranda do laboratório Adriana Calvo e a Dra Elza por dividirem seus conhecimentos.

Aos meus colegas da Pós-Graduação: Gabriela, Ana Paula Akashí, Adriana Cabresté, Camila, Taís, Túlio, Paulo Frederico, Paulo Zupelari, Giovana, Daniel Brozowski e Luis Fernando Simoneti.

Aos professores do departamento de Ciências Biológicas: Dr Flávio A. C de Faria, Dr Leonardo Bonjardim e Dra Lucimara Neves por todos os momentos compartilhados.

Aos técnicos de laboratório: Viviane (Farmacologia) e Aline Leite (Bíioquímica), pela ajuda no uso dos equipamentos dos laboratórios.

As secretárias da pós-graduação Vera Rufino e Dalva Oliveira, pela ajuda nos momentos que precisei.

À minha família por sempre me estimular a estudar.

RESUMO

O Sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido relatado como um importante modulador de processos inflamatórios e imunológicos, incluindo a doença periodontal (DP). Estudos sugerem neste sistema um eixo alternativo (ECA-2 /ANG(1-7) /MAS) que atuaria como um contra-regulador de efeitos mediados pelo clássico eixo (ECA /ANGII /AT1). Sabe-se que bactérias periodontopatogênicas, como a *Porphyromonas gingivalis* (Pg), possuem componentes bioativos de membrana (ex. lipopolissacarídeos-LPS) capazes de induzir uma forte resposta imune no hospedeiro devido à liberação de citocinas nas células, entre elas Interleucina (IL)- 1 β . Neste contexto, fibroblastos são as células mais abundantes nos tecidos periodontais e possuem em sua superfície celular receptores necessários para o reconhecimento da invasão bacteriana, ativando cascatas intracelulares, que levam à produção de citocinas. O objetivo deste estudo foi verificar se os eixos ECA/ ANGI/ AT1 e ECA-2/ ANG(1-7)/ MAS contribuem para a produção e/ ou regulação de citocinas inflamatórias (CI) por fibroblastos de gengiva humana (HGF) e ligamento periodontal humano (HPLF) estimulados por IL-1 β . Após o pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) ou silenciamento mediado por RNA de interferência (RNAi) de AT1, HGF e HPLF foram estimulados por IL-1 β por 3 horas (RNAm) ou 24 horas (proteína). Expressão de RNAm para AT1, MAS, ECA, ECA-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG foram avaliados por RT-qPCR e das proteínas IL-6, IL-8, ECA e ECA-2 por ELISA. Foi realizado também Western Blot para detecção de AT1 e ECA nos extratos celulares e dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas. Ambos os subtipos de fibroblastos mostraram aumento da expressão de RNAm para AT1, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e OPG, quando estimulados por IL-1 β . No entanto, apenas em HPLF foi observado aumento para MAS, ECA e TGF- β . Losartan e Ang (1-7) não modularam o transcrito, a secreção de CI e nem a produção de nitrito no sobrenadante das culturas, tanto em HGF como em HPLF. O silenciamento do receptor AT1 reduziu a secreção de IL-6 e IL-8 induzida por IL-1 β em cultura de HGF e HPLF e aumentou a expressão gênica de OPG somente em HGF. Estes resultados sugerem que o silenciamento de AT1, mas não o bloqueio farmacológico deste receptor pelo antagonista Losartan, em HGF e

---

HPLF, pode controlar a produção de IL-6 e IL-8, que por sua vez contribuem para a patogênese periodontal.

Palavras chave: Doença Periodontal. Sistema Renina-Angiotensina. Cultura de Células.

ABSTRACT

Evaluation ACE /ANG II /AT1 and ACE-2 /ANG (1-7) /MAS axis in gingival and periodontal ligament human fibroblasts stimulated with IL-1 β and its contribution in the production of cytokines and chemokines

The renin-angiotensin system (RAS) has been reported as an important modulator of inflammatory and immune responses, including periodontal disease (PD). Studies suggest an alternative axis as part of this system (ACE-2 / ANG (1-7) / MAS) that would act as counter-regulatory to the classical axis (ECA / ANGII / AT1). It is known that periodontal bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* (Pg) have bioactive components in their membrane (such as lipopolysaccharide-LPS) capable of inducing a strong immune response in the host due to the release of cytokines in cells, including interleukin (IL) - 1 β . In this regard, fibroblasts are the most abundant cells in periodontal tissues and receptors needed for the recognition of bacterial invasion by activating intracellular cascades that lead to cytokine production. The aim of this study was to determine whether the axes ACE / ANGII / AT1 and ACE-2 / ANG (1-7) / MAS contribute to the production and / or regulation of inflammatory cytokines (IC) by fibroblasts of human gingiva (HGF) and human periodontal ligament (HPLF) stimulated IL-1 β . After pre-treatment with Losartan, Ang (1-7) or silencing mediated by RNA interference (RNAi) of AT1, HGF and HPLF were stimulated by IL-1 β for 3 hours (RNAi) or 24 hours (protein). Expression mRNA for AT1, MAS, ACE, ACE-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L and OPG was assessed by RT- qPCR and proteins IL-6, IL-8, ACE and ACE-2 by ELISA. Western Blot for the detection of AT1 and ECA and dosage of nitrite was also performed. Experiments stimulated by IL-1 β showed a positive control for gene expression AT1, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and OPG in HGF and HPLF and MAS, ACE and TGF- β only HPLF. Losartan and Ang (1-7) did not modulate the transcription and secretion of IC and no nitrite production in the culture supernatant of HGF and HPLF. The silencing AT1 reduced IL-6 secretion and IL-8 induced by IL-1 β in cultured HGF and HPLF and increased OPG gene expression only HGF. These results suggest that silencing AT1, but not pharmacological blockade of this receptor by Losartan in

---

HPLF and HGF, can control the production of IL-6 and IL-8, which in turn contribute to the pathogenesis of periodontal disease.

Keywords: Periodontal Disease. Renin-Angiotensin System. Cell Culture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina (Santos et al., 2015).** Angiotensinogênio, AGT; Enzima conversora de Angiotensina, ECA; Enzima conversora de Angiotensina 2, ECA-2; Receptor de Angiotensina II tipo 1, AT1R; Receptor de Angiotensina II tipo 2, AT2R; Aminopeptidase A, APA; Aminopeptidase N, APN; Carboxipeptidase, CPP; Receptor Mas, MasR; Receptor Mas-related gene type D, MrgDR; Peptidase neutra (Neprililina), NEP; Receptor de pró-renina, PRR.....32
- Figura 2: Representação esquemática da organização dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tecido (gengiva ou ligamento periodontal), pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) e estímulo aplicado (IL-1 β).**.....49
- Figura 3: Representação esquemática da organização dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tecido (gengiva ou ligamento periodontal), silenciamento do receptor AT1 e estímulo aplicado (IL-1 β).**.....50
- Figura 4: Representação esquemática dos alvos estudados nos respectivos ensaios.** Nos ensaios de PCR quantitativa foi realizada a detecção de RNAm para: ECA, ECA-2, receptor AT1, receptor MAS e citocinas inflamatórias. Por ELISA, foi realizada a quantificação proteica no sobrenadante das culturas para as enzimas: ECA e ECA-2 e as citocinas (IL-6 e IL-8)......53
- Figura 5: Cultura de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos.** Cultura primária obtida a partir de explantes de gengiva (A,C,E) e de ligamento periodontal (B,D,F) humanos do mesmo doador. Aspecto dos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal no início da cultura (explante) (A,B), em semi confluência (C,D) e em confluência (E,F). Visualização em microscópio óptico invertido com objetiva de 10X.....61
- Figura 6: Expressão de RNAm para AT1, MAS, ECA e ECA-2 por fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β em diferentes tempos (horas).** Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram estimulados por IL-1 β (1 ng/ml) por 1, 3, 6 e 24 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de
-
-

AT1 (A), MAS (B) ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) em relação ao tempo 0 (sem estímulo por IL-1 β). 62

Figura 7: Efeito do pré-tratamento farmacológico com Losartan e Ang (1-7) na concentração de 10 μ M e estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. A) Fibroblastos de gengiva humanos B) Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 h antes dos tratamentos. Estes foram pré-tratados com Losartan (10 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (10 μ M) por 30 min e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24 h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β .*($p < 0.05$), **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$). 64

Figura 8: Efeito do pré-tratamento farmacológico com Losartan e Ang (1-7) na concentração de 1 μ M e estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. A) Fibroblastos de gengiva humanos B) Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 h antes dos tratamentos. Estes foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β 65

Figura 9: Efeito do silenciamento gênico do receptor AT1 seguido de estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. A) Fibroblastos de gengiva humanos B) Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 h antes do silenciamento gênico. Estes foram silenciados (SiSCR e SiAT1) por 24 h e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24 h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são

---

---

representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1= silenciamento gênico do receptor AT1, - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β 66

Figura 10: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de AT1, MAS e ECA em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1= silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05). 68

Figura 11: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de AT1, MAS, ECA e ECA-2 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1= silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05), ** (p<0.01) *** (p<0.001). 69

Figura 12: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de AT1, MAS, ECA e ECA-2 em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi

---

---

quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05). 71

Figura 13: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de AT1, MAS, ECA e ECA-2 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β 72

Figura 14: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por (IL-1 β) (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05) **(p<0.01) *** (p<0.001). 74

Figura 15: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão

---

---

de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$). 75

Figura 16: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (A), TGF- β (B), CXCL12 (C), RANK-L (D) e OPG (E) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *($p < 0.05$). 77

Figura 17: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (A), TGF- β (B), CXCL12 (C), RANK-L (D) e OPG (E) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$). 78

-
-
- Figura 18: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β .** Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. *(p<0.05), ***(p<0.001). IL-1 β = estimulação por IL-1 β 80
- Figura 19: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β .** Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05), **(p<0.01).....81
- Figura 20: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β .** Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (A), TGF- β (B), CXCL12 (C), RANK-L (D) e OPG (E) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β 82
-
-

Figura 21: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (A), TGF- β (B), CXCL12 (C), RANK-L (D) e OPG (E) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β 84

Figura 22: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (A) e (IL-8) (B) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$). 86

Figura 23: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (A) e (IL-8) (B) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$). 87

Figura 24: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (A) e (IL-8) (B) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05). 89

Figura 25: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (A) e (IL-8) (B) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05), **(p<0.01). 90

Figura 26: Efeito do pré-tratamento com Losartan sobre a produção do receptor AT1 e da enzima ECA em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de 3 indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e estimulados com IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis de proteínas do receptor AT1 e da enzima ECA no sobrenadante das células foram avaliados por Western Blot. - IL-1 β = sem estimulação com IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β 92

Figura 27: Determinação da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β . A) Fibroblastos de gengiva humanos B) Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço) e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 h antes dos tratamentos. Estes foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e foram estimulados por IL-1 β

(1ng/ml) por 24h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β 94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Alvos da PCR quantitativa e códigos dos ensaios inventoriados (Applied Biosystems®) que foram utilizados nos experimentos (SRA). 52
- Tabela 2** - Alvos da PCR quantitativa e códigos dos ensaios inventoriados (Applied Biosystems®) que foram utilizados nos experimentos (citocinas inflamatórias).....52
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ang A	Angiotensina A
Ang (1-7)	Angiotensina 1-7
Ang (1-9)	Angiotensina 1-9
Ang I	Angiotensina 1-10
Ang II	Angiotensina 1-8
Ang III	Angiotensina (2-8)
Ang IV	Angiotensina (3-8)
A-779	Antagonista do receptor MAS
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT1a	Receptor de angiotensina tipo 1a
AT1b	Receptor de angiotensina tipo 1b
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
AT4	Receptor de angiotensina tipo 4
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
°C	Graus Celsius
CO ₂	Gás carbônico
Ct	<i>Cycle threshold</i> ou ciclo limiar
COX-2	Cicloxigenase 2
DAG/PKC	Diacilglicerol/proteína quinase C
DMEM	<i>Dulbeco's modified Eagle's medium</i> (meio de Eagle modificado por Dulbeco)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
D-Pro ⁷ -Ang(1-7)	Antagonista do receptor MAS
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina-2
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EPM	Erro padrão médio
<i>et al.</i>	E colaboradores

FOB/USP	Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
H	Hora(s)
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HUVECs	Células endoteliais de veia umbilical humanas
IL-1	Interleucina 1
IL- 6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina-1beta
Knockdown	Silenciamento gênico
LAFFIC	Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Clínica
LPS	Lipopolissacarídeo
μ g	Micrograma(s)
μ L	Microlitro(s)
MAS	Receptor MAS
mg	Miligrama(s)
min	Minuto(s)
mL	mililitro(s)
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MIP-1 α (CCL3)	Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
MIP-1 β (CCL4)	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta
MMP-2	Metaloproteinases da matriz 2
MMP-9	Metaloproteinases da matriz 9
MrgDR	Mas-related gene type D receptor
MTT	Brometo de 3-(4,5)-Dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
Ng	Nanograma

NO	Óxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PBS	Solução salina tamponada por fosfato
Pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PRR	Receptor de Pró-renina
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação quantitativa em cadeia da polimerase
SDF-1 (CXCL12)	Fator celular derivado de estroma ou Quimiocina CXCL12
SFB	Soro fetal bovino
SRA	Sistema renina-angiotensina
SiRNA	RNA de interferência
TGF-β	Fator de crescimento transformador- beta
TLR	Receptor Toll-like
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	25
1.1	Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	27
1.1.1	Eixo ECA/ Angiotensina II/ Receptor AT1	27
1.1.2	Eixo ECA-2/ Angiotensina (1-7)/ Receptor MAS	29
1.2	Sistema Renina-Angiotensina Local.....	33
1.3	Doença Periodontal (DP).....	35
2	PROPOSIÇÃO	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Coleta de biópsias de tecido gengival e de ligamento periodontal humanos.....	47
3.2	Cultura primária dos fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal.....	47
3.3	Pré-tratamento dos fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β	48
3.4	Silenciamento do receptor AT1 por RNA de interferência (siRNA)	49
3.5	Avaliação do efeito citotóxico do tratamento com drogas (Losartan e Ang (1-7)) e do silenciamento gênico para o receptor AT1 sobre fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal (Ensaio de MTT).....	51
3.6	Avaliação da expressão e produção de componentes do Sistema Renina-Angiotensina e citocinas inflamatórias por fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) ou submetidos ao silenciamento gênico para o receptor AT1 estimulados por IL-1 β	51
3.6.1	Análise da expressão gênica.....	53
3.6.1.1	Extração de RNA total	53

3.6.1.2	Quantificação do RNA total e avaliação da pureza do RNA total	54
3.6.1.3	Tratamento do RNA total com DNase.....	54
3.6.1.4	Transcrição Reversa	54
3.6.1.5	PCR quantitativa.....	55
3.6.2	Análise proteica	55
3.6.2.1	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	55
3.6.2.2	Extrato celular e Western Blot	56
3.7	Determinação da concentração de óxido nítrico (nitrito) no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β (Método Colorimétrico de Griess).....	57
3.8	Análise Estatística	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Cultura dos fibroblastos.....	61
4.2	Determinação do tempo de estímulo por IL-1 β pela avaliação da expressão gênica de componentes do SRA por fibroblastos de gengiva.....	62
4.3	Efeitos do pré-tratamento farmacológico com Losartan e Ang (1-7), silenciamento gênico do receptor AT1 e do estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos (Ensaio de MTT)	63
4.4	Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR	67
4.4.1	Componentes do SRA.....	67
4.4.1.1	Pós silenciamento gênico do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β	67
4.4.1.2	Pós tratamento farmacológico em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β	70
4.4.2	Citocinas inflamatórias	73
4.4.2.1	Pós silenciamento gênico do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β	73
4.4.2.2	Pós tratamento farmacológico em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β	79

4.5	Detecção da produção de IL-6, IL-8, ECA e ECA-2 por ELISA.....	85
4.5.1	Pós silenciamento gênico do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β	85
4.5.2	Pós tratamento farmacológico em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β	88
4.6	Detecção da produção de AT1 e ECA por Western Blot.....	91
4.6.1	Pós tratamento com Losartan no extrato total de fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β	91
4.7	Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	93
4.7.1	Determinação da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β	93
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS.....	111

---

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

---

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) clássico, também chamado de Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, é um sistema fisiológico, presente em todos os vertebrados. Este sistema consiste de uma cascata enzimático-hormonal, que regula a função cardiovascular, adrenal e renal, controlando o balanço eletrolítico e a pressão arterial (CAREY; SIRAGY, 2003).

Um substrato deste sistema, o angiotensinogênio, é liberado do fígado e é clivado na circulação pela enzima renina, que é secretada dos aparatos justaglomerulares do rim para formar o decapeptídeo inativo Angiotensina I – Ang I ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-His}^9\text{-Leu}^{10}$). Esta por sua vez é hidrolisada pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) na circulação pulmonar, dando origem ao octapeptídeo ativo Angiotensina II - Ang II ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$), o qual, através dos receptores de Angiotensina tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2), promove suas ações biológicas. (PAUL et al., 2006).

1.1.1 Eixo ECA/ Angiotensina II/ Receptor AT1

A enzima ECA, uma metaloprotease de ligação de membrana, possui 1.278 resíduos de aminoácidos e contém no seu interior duas regiões homólogas cada uma contendo uma região de ligação a um átomo de Zn e um local catalítico (BERSTEIN et al., 1989; SOUBRIER et al., 1988). Esta enzima pode ser encontrada abundantemente ao longo da superfície de células endoteliais pulmonares (RYAN et al., 1975, 1976), no endotélio vascular de vários órgãos e tecidos de coelhos (CALDWELL et al., 1976) e em células do intestino e túbulo proximal renal humano (BRUNEVAL et al., 1986; HALL et al., 1976; SCHULZ et al., 1988). Ang II, um octapeptídeo ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$) é considerado um dos principais componentes do SRA (PAUL et al., 2006). Além da capacidade de regular a pressão sanguínea, os eletrólitos e a homeostase de fluidos, a Ang II possui também ação inotrópica e cronotrópica positiva sobre o coração (PEACH, 1977;

PALOMEQUE et al., 2009; MORI; HASHIMOTO, 2006). Outras funções relacionadas à ação de Ang II são: propriedades mitogênicas para células isoladas do ligamento periodontal (LUNDERGAN et al., 1999), proliferação de células provenientes da calvária de ratos (HIRUMA et al., 1997) e produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) em fibroblastos gengivais humanos (SEGAWA et al., 2003). Além disso, crescimento de células, anti-proliferação, apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio, secreção hormonal, ações pró-fibrinogênicas e pró-inflamatórias também têm sido descritas (LEUNG, 2004). Os receptores para Ang II são AT1 e AT2. Esses receptores pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que em conjunto com proteínas G heterotriméricas (G α , G $\beta\gamma$) encontram-se ligados na membrana plasmática interna. A ativação da proteína G, via receptores AT1, estimula fosfolipase C (PLC), fosfolipase A₂ (PLA₂) e fosfolipase D (PLD), as quais geram IP₃/Ca²⁺ e diacilglicerol/proteína quinase C (DAG/PKC), ácido araquidônico/leucotrienos e ácido fosfatídico/DAG/PKC, respectivamente. Estes, por sua vez, ativam múltiplas cascatas de sinalização que resultam em contração, disfunção endotelial, migração celular, hipertrofia, fibrose e trombose (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014). Além disso, a ligação de Ang II ao receptor AT1 também dispara a ativação do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, considerada a principal fonte de espécies reativas de oxigênio envolvidas na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios. (GARRIDO; GRIENDLING, 2009; BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014). As funções de Ang II, tais como constrição vascular, proliferação celular e liberação da aldosterona são conhecidas por serem mediadas via receptores AT1 (WRIGHT et al., 2008). Inagami et al. (1994) clonaram e identificaram dois subtipos de receptores AT1: AT1a e AT1b e Hagiwara et al (1998) verificaram que a interação de Ang II nos receptores AT1 poderia alterar o metabolismo de células osteoblásticas em ratos.

O receptor AT2 apresenta propriedades antiproliferativas, anti-angiogênica e anti-fibrótica, estimula a apoptose e regula o fluxo iônico (DE GASPARO; SIRAGY, 1999). Portanto, Ang II ao interagir com os receptores AT2, produz alguns efeitos diferentes e antagônicos àqueles observados para AT1, como: vasodilatação, inibição da proliferação e crescimento celular (SKRBIC; IGIC, 2009). Em células nervosas foram reportadas algumas funções relacionadas ao receptor AT2, tais

---

como: diferenciação celular, regeneração axonal e também modulação da apoptose celular (ROSENSTIEL et al., 2002).

Um receptor de angiotensina adicional denominado AT₄, que interage com um peptídeo de Angiotensina truncado, a Ang IV ou Ang 3-8 (Val³-Tyr⁴- Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸) foi identificado. AT₄ parece estar relacionado à consolidação da memória, fluxo sanguíneo, reabsorção tubular renal e proliferação celular (WRIGHT et al., 2008).

Antagonistas dos receptores da Ang II-(Irbesartan) e inibidores de renina-(Alisquireno) assim como outras drogas são utilizados no SRA com o objetivo de reduzir a hipertensão e evitar a progressão da placa aterosclerótica (NUSSBERGER et al., 2008). Um estudo mostrou que a administração profilática de Saralasina (antagonista dos receptores de Ang II) pode melhorar o estresse oxidativo e os danos teciduais causados por pancreatite aguda (IP et al., 2003). Losartan foi o primeiro antagonista do receptor de Ang II sem propriedades agonistas, sendo efetivo na redução da pressão arterial e útil na diminuição da progressão da nefropatia devida ao diabetes (SICA et al., 2005). Sabe-se que antagonistas dos receptores AT₁, como Losartan e também inibidores da ECA, ao bloquearem o SRA, além da diminuição da pressão arterial, reduzem o stresse oxidativo principalmente por prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (CAVANAGH et al., 2010; CAPETTINI et al., 2012).

1.1.2 Eixo ECA-2/ Angiotensina (1-7)/ Receptor MAS

A ECA-2 é uma metaloprotease dependente de zinco com atividade de carboxipeptidase (KRAMKOWSKI et al., 2006) envolvida na geração de peptídeos de angiotensina alternativos (TIPNIS et al., 2000). Esta enzima está presente na maioria dos tecidos cardiovasculares (RAIZADA et al., 2007), em macrófagos, células endoteliais e musculares lisas (KRAMKOWSKI et al., 2006), fibroblastos de pulmão humano fetal (OARHE et al., 2015) e fibroblastos de rato (MENG et al., 2015). A expressão de genes da ECA-2 é descrita no sistema cardiovascular, no córtex renal e nos testículos (TIPNIS et al., 2000).

Por muitos anos, Ang II foi considerada a principal molécula efetora do SRA (CAPETINI et al., 2012). Entretanto, outro peptídeo tem mostrado uma importante função neste sistema, o heptapeptídeo Angiotensina (1-7) (SANTOS et al., 1988; DA SILVEIRA et al., 2010). A Ang (1-7) pode ser formada a partir da Ang II, pela ação da ECA-2, sendo esta a sua principal via de formação ou ainda a partir de Ang I, formando inicialmente o peptídeo Angiotensina (1-9) (TIPNIS et al., 2000). Santos et al. (1988) relataram que Ang (1-7) pode ainda ser formada por ação de endopeptidases neutras, ou seja, por uma via independente da ECA. Sendo assim, achados da literatura têm aumentado a complexidade do SRA. Em adição à Ang II e Ang (1-7) há outros fragmentos ativos do metabolismo desse sistema, incluindo Angiotensina III e Angiotensina IV (FERRARIO; CHAPPELL, 2004; SANTOS et al., 2008). Diferentes receptores para Ang II (AT1, AT2 e AT4) e para Ang (1-7) (MAS), além de um receptor para Pró-renina (NGUYEN et al., 2002) têm sido caracterizados. Adicionalmente, vias alternativas para a formação de Ang II, como por exemplo, pela ação da Quimase e da Elastase-2 (SANTOS et al., 2004; BECARI et al., 2011), foram propostos. Recentemente, novos peptídeos deste sistema, como Angiotensina A (Ang A), Angioprotectina e Alamandina vêm sendo investigados (BALAKUMAR et al., 2014). Entretanto, acredita-se que outros componentes e funções do SRA ainda permaneçam desconhecidos (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Ang (1-7) tem ações contra-regulatórias às da Ang II, como a proliferação celular estimulada pela Ang II e ações anti-proliferativas da Ang (1-7). Enquanto a Ang II tem efeitos vasoconstritores, a Ang (1-7) tem efeitos vasodilatadores. Ang (1-7) pode regular a pressão sanguínea, a função cardíaca e o crescimento celular, sendo talvez importante futuramente no tratamento de doenças cardíacas, câncer, doença renal e pré-eclampsia (TRASK; FERRARIO, 2007). Em modelos experimentais de doenças renais, a maioria dos estudos sugere que o eixo ECA-2/ Ang (1-7)/ Receptor MAS tem um papel protetor renal. Estes efeitos proporcionados por Ang (1-7) parecem envolver a modulação do estresse oxidativo, o influxo e ativação de leucócitos e fibrose nos tecidos renais (SIMÕES e SILVA et al., 2013).

A importância biológica de Ang (1-7) tem sido relacionada à identificação de seu receptor, o receptor MAS (SANTOS et al., 2003). Em culturas de fibroblastos de pele humana, Nickenig et al. (1997) verificaram a expressão de um novo receptor

---

ativado por Ang (1-7) acoplados a vias de sinalização envolvendo síntese de DNA. Santos et al. (1994) reforçam a hipótese da existência de um complexo local de interação específica entre diferentes Angiotensinas (I, 1-7) e diferentes receptores na mediação de importantes efeitos (central e periférico) do SRA.

O receptor MAS é também um receptor acoplado à proteína G e sua estimulação resulta na liberação de óxido nítrico (NO) do endotélio vascular resultando em vasodilatação (FREEMAN et al., 1996; LEMOS et al., 2005). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito vasodilatador de Ang (1-7): estimulação de prostaglandinas vasodilatadoras (bradicinina) (LI et al., 1997; PAULA et al., 1995) e aumento da produção de óxido nítrico através de estímulo de receptor específico (LEMOS et al., 2005), ou ambos.

Um composto denominado AVE 0991 parece mimetizar os efeitos de Ang (1-7) em células endoteliais bovinas (WIEMER et al., 2002) e em aorta de camundongos (LEMOS et al., 2005). Pinheiro et al. (2004) demonstraram que AVE 0991 produziu um efeito antidiurético em camundongos, sugerindo ser um agonista de Ang (1-7). Por outro lado, estudos mostram que o uso de antagonistas do receptor MAS, A-779 (TALLANT et al., 1997; LEMOS et al., 2005) e D-Pro⁷-Ang(1-7) (LEMOS et al., 2005) parecem inibir os efeitos vasodilatadores de Ang (1-7).

Figura 1: Representação esquemática dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina (Santos et al., 2015). Angiotensinogênio, AGT; Enzima conversora de Angiotensina, ECA; Enzima conversora de Angiotensina 2, ECA-2; Receptor de Angiotensina II tipo 1, AT1R; Receptor de Angiotensina II tipo 2, AT2R; Aminopeptidase A, APA; Aminopeptidase N, APN; Carboxipeptidase, CPP; Receptor Mas, MasR; Receptor Mas-related gene type D, MrgDR; Peptidase neutra (Neprililina), NEP; Receptor de pró-renina, PRR.

1.2 Sistema Renina Angiotensina Local

Um número crescente de estudos sugere a existência de sistemas locais capazes de produzir angiotensinas em tecidos de forma independente do SRA circulante (CAMPBELL; HABNER, 1986). Componentes do SRA são evidenciados em tecidos como rim, ovário, fígado, cérebro, pulmão, tecido adiposo, coração, entre outros (PHILLIPS et al., 1993; WRIGHT et al., 1994). Lam et al. (2002) sugerem um sistema angiotensina gerado localmente no corpo da carótida de ratos, o qual poderia estar ligado a um modo biosintético independente da renina. Em quimiorreceptores do corpo da carótida, o receptor AT1 pode mediar a liberação de cálcio intracelular. Hirasawa et al. (2002) estudaram a presença e localização de receptores AT1 e AT2 de Ang II e também outros componentes do SRA em mucosa do cólon humano.

Ohuchi et al. (2002) ao utilizar drogas antagonistas de receptores de Ang II (Saralasin), sugeriram que a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaias estimulada pela fenitoína (droga anticonvulsivante) e nifedipina (antagonista de cálcio) é mediada indiretamente por receptores AT1, presentes em fibroblastos gengivais em cultura. Os autores também sugeriram que Ang II é sintetizada localmente nestas células. Berggreen et al. (2003) sugeriram a existência de receptores AT1 na polpa dentária e no tecido gengival de furão quando estudaram o efeito da Ang II sobre o fluxo sanguíneo em tecidos orais destes animais.

Ohuchi et al. (2004) demonstraram que a Ang II induziu a proliferação de fibroblastos gengivais de coelhos de maneira concentração-dependente. 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. Adicionalmente, em complemento aos achados farmacológicos, os autores demonstraram a presença dos receptores AT1 e AT2. Goker et al. (2005) identificaram alguns dos principais integrantes do SRA em sangue do cordão umbilical humano por demonstrar a expressão do seu RNAm.

Queiroz-Junior et al. (2015) observaram que o antagonista do receptor AT1, Losartan foi capaz de prevenir e tratar a perda do osso alveolar associada a artrite e também aquela induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em tecido periodontal de camundongo. Losartan também mostrou um efeito anti-inflamatório em modelo de artrite animal e estes efeitos foram relatados ser independentes da ativação do receptor MAS (SILVEIRA et al., 2013).

Estudos de nosso laboratório demonstraram a existência de um SRA local no tecido gengival de ratos. Foi demonstrada a expressão de RNAm para componentes do SRA incluindo Angiotensinogênio, Renina, Receptores AT1a, AT1b e AT2 e ECA, sendo que estes mostraram-se funcionais e capazes de gerar peptídeos de Angiotensina, incluindo a Ang II (SANTOS et al., 2009). Um trabalho em tecido gengival humano, Nakamura et al. (2011) demonstraram por meio de PCR convencional e de Western Blot, a presença do RNAm e da proteína do receptor AT1, em fibroblastos cultivados de gengiva humana. Foi possível também observar a expressão do RNAm para ECA, Catepsina D e Angiotensinogênio nestas mesmas células.

Recentemente, Santos et al. (2015) observaram que Alisquireno e Losartan bloquearam significativamente a perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida experimentalmente. Entretanto, quando os ratos foram tratados com Enalapril (inibidor de ECA) a perda óssea não foi prevenida sugerindo que vias alternativas no SRA poderiam modular este processo. Além disso, ao demonstrarem que fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humano, gengiva humana e de rato expressam componentes do SRA confirmaram a hipótese da presença de um SRA local e funcional no periodonto humano e de rato.

Desse modo, tem sido sugerido que alterações nos componentes desses SRA teciduais específicos podem estar associadas à fisiologia ou patofisiologia dos respectivos tecidos e órgãos onde são encontrados, possibilitando que drogas que atuem nestes SRA “locais” possam ser benéficas também para o tratamento de muitas outras doenças existentes (LEUNG, 2004; ZIMMERMAN; DUNHAM, 1997).

1.3 Doença Periodontal (DP)

A doença periodontal compreende uma doença inflamatória e infecciosa dos tecidos que sustentam os dentes (incluindo o osso alveolar), podendo levar eventualmente à perda dos mesmos (ZHIMIN; WEINBERG, 2006). Nos Estados Unidos, mais de 47 % da população adulta tem periodontite, sendo que a forma moderada da doença é observada na maioria dos adultos (EKE et al., 2012).

A periodontite é causada por bactérias que compõem o biofilme dental (GEMMELL et al., 1997), sendo que *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* estão entre os principais agentes etiológicos relacionados a doença (VAN WINKELHOFF et al., 2002). A virulência apresentada por essas bactérias é devido à presença de endotoxinas como fímbrias, cápsulas, hemaglutinina, e em especial, lipopolissacarídeos (LPS) (GOMES et al., 2005). LPS é um componente da membrana externa de bactérias Gram negativas, como a *P. gingivalis* (NEIL et al., 2004) que estimulam algumas células (macrófagos, linfócitos, fibroblastos e osteoblastos) a secretarem moléculas efetoras inflamatórias, imunomodulatórias e com capacidade de destruir tecidos (WILSON, 1995). O LPS é capaz de causar ativação celular imediata e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (RIETSCHER, et al., 1996).

Embora as bactérias periodontais sejam os principais agentes etiológicos, a resposta imunológica do hospedeiro a estas bactérias é de fundamental importância para o desenvolvimento da doença. A interação de mecanismos de defesa do hospedeiro com microorganismos presentes no biofilme dentário influencia direta ou indiretamente a doença (GEMMELL et al., 1997). Inúmeros mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento e progressão da DP são liberados quando ocorre a ativação de células de defesa de hospedeiros por alguns tipos de bactérias patogênicas (PAGE, 1991). Sabe-se que o modelo da patogênese periodontal foi estabelecido por Page; Schroeder (1976) e que a iniciação e progressão da doença envolvem o rompimento da homeostase microorganismo-hospedeiro. Esta homeostase pode ser rompida por uma variedade de fatores relacionados ao hospedeiro ou ao microorganismo, incluindo imunodeficiência congênita ou adquirida do hospedeiro, defeitos imunorregulatórios associados com mutações ou polimorfismos, idade avançada, doenças sistêmicas como diabetes e obesidade e

---

fatores ambientais, como fumo, dieta e estresse, modificações epigenética em resposta às alterações ambientais e a presença de patógenos chaves podem transformar um microorganismo simbiótico em um disbiótico. Estes fatores podem agir isolados ou mais comumente em conjunto podendo causar a disbiose da microbiota periodontal e a progressão da periodontite (HAJISHENGALLIS, 2014).

As células mais abundantes nos tecidos periodontais da gengiva e do ligamento periodontal são os fibroblastos. A principal função dessas células é produzir proteínas colagênicas e não-colagênicas importantes para a manutenção da estrutura do tecido conjuntivo. Além disso, possuem em sua superfície celular os receptores e moléculas necessárias para o reconhecimento da invasão bacteriana, podendo responder com a ativação de cascatas intracelulares que levam à produção de citocinas e participam dos mecanismos de defesa que envolve o tecido conjuntivo (LINDHE et al., 2005).

Citocinas são proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa que atuam como mediadores destas mesmas células. As citocinas são produzidas em resposta a diferentes estímulos, dentre eles microrganismos, como no caso da resposta à infecção do sulco gengival por bactérias Gram-negativas, sendo que diferentes citocinas estimulam diversas respostas em células constituintes da imunidade e inflamação (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Em adição, leucócitos granulócitos e agranulócitos, estão relacionados com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo Interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF)- α e outros mediadores como prostaglandinas e quimiocinas por aumentar a resposta inflamatória local levando a degradação de tecidos locais moles e duros (GIANNOBILE, 2008). Baseada em sua atividade "*in vivo*", citocinas podem ser divididas em: pró-inflamatória, anti-inflamatória, mitogênica (regulando o crescimento e proliferação celular), hematopoiética e quimiotática (quimiocinas) (NEDOSZYTKO et al., 2014).

Quimiocinas são uma família de citocinas quimiotáticas, que atraem e ativam populações de leucócitos através da interação com receptores específicos (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). Elas são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios, recrutando, assim, leucócitos ao local da inflamação (ABBAS; LICHTMAN, 2003). De acordo com a localização de cisteína na cadeia polipeptídica

---

as quimiocinas são classificadas em quatro subgrupos: C, CC, CXC e CX₃C. Quimiocinas CC apresentam cisteínas adjacentes e atraem células mononucleares para os locais de inflamação crônica, tendo como exemplos proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), e RANTES (CCL5). O segundo subgrupo de quimiocinas é a CXC, que apresentam cisteínas separadas por um aminoácido. O protótipo deste grupo é a interleucina-8 (CXCL8), uma quimiocina que tem a capacidade de atrair leucócitos polimorfonucleares para os locais de inflamação aguda. CX₃C é classificado como o terceiro subgrupo de quimiocinas, sendo (CX₃CL1) seu único membro. Por fim, o quarto subgrupo de quimiocinas (XC) tem como membro XCL1 que apresenta um resíduo simples de cisteína (CHARO; RANSOHOFF, 2006).

Bandow et al. (2007) verificaram o efeito de LIPUS (ultrassom pulsado de baixa intensidade), como estresse mecânico, na expressão de quimiocinas por osteoblastos em vários estágios de diferenciação. Os autores concluíram que LIPUS aumentou efetivamente a expressão de MCP-I, MIP-1 β , MIP-2 e RANK-L em osteoblastos, por um mecanismo envolvendo o receptor AT1.

Vários estudos têm demonstrado que as citocinas têm um importante papel na iniciação e progressão da doença periodontal (SALVI; LANG, 2005), sendo que citocinas como MIP-1 α estão envolvidas na indução e modulação da resposta imune e inflamatória (MAURER; VON STEBUT, 2004). Fibroblastos gengivais secretam quimiocinas como MIP- 1 α /CCL3 que levam a uma quimioatração de monócitos na doença periodontal (GARLET et al., 2003) e fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) que induz a expressão de pró colágeno tipo I (ARANCIBIA et al., 2013).

Estudos prévios demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , induzem a expressão do receptor AT1 em diferentes tipos celulares. IL-1 β é capaz de estimular a expressão do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva humana, sem afetar a produção de Ang I e Ang II (GURANTZ et al., 2005; YOSHIDA et al., 2006).

Já IL-6 é uma citocina produzida em resposta a estímulos inflamatórios como IL-1 e TNF- α , produtos bacterianos como endotoxinas e LPS (TERRY et al., 2000). É uma citocina pleiotrópica com efeitos de resposta imune humoral e celular

---

relacionados com a inflamação, defesa do hospedeiro e lesão tecidual (PAPANICOLAOU et al., 1998).

CXCL8 é também um importante mediador inflamatório, sendo produzida por fibroblastos. Considerado um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos, desempenha papel crucial na primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989).

Osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína solúvel da superfamília do receptor de TNF (fator de necrose tumoral), o qual foi inicialmente identificado como um mediador-chave na regulação óssea (SIMONET et al., 1997). Atua como um inibidor para RANK-L (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa), uma citocina com forte atividade de indução de osteoclastos (BOYLE et al., 2003). Sabe-se que OPG é capaz de modular a expressão do receptor de Ang II (AT1) em células do músculo liso de aortas humanas (MORAN et al., 2009) e por sua vez Ang II e IL-1 β promovem a produção de OPG nestas células (ZHANG et al., 2002).

Estudos de nosso laboratório têm sido publicados na literatura mostrando a modulação de citocinas e quimiocinas de diferentes tecidos orais. Ao estimularem fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal com diferentes concentrações de LPS de *P. gingivalis*, ambas as células apresentaram níveis de IL-8 aumentados e nenhuma alteração nos níveis de IL-10 foi observada. Adicionalmente, somente os fibroblastos gengivais tiveram níveis aumentados de TGF- β (MORANDINI et al., 2011). Já a produção de proteínas MIP-1 α , SDF-1 ou CXCL12, e IL-6 foram significativamente mais elevadas em fibroblastos de gengiva em relação aos de ligamento periodontal quando o mesmo estímulo foi utilizado (MORANDINI et al., 2010). Sendo assim, os autores concluíram que fibroblastos de ligamento periodontal e de gengiva participam efetivamente na produção de citocinas e quimiocinas no contexto da resposta inflamatória de maneira distinta (MORANDINI et al., 2010, 2011). Fibroblastos da polpa dental de dentes decíduos e permanentes foram capazes de produzir as quimiocinas CCL3 e CXCL12. O estímulo com LPS de *P. gingivalis* aumentou a produção de CCL3 em ambos os subtipos de células. Entretanto, o aumento para CXCL12 foi observado somente em fibroblastos da polpa de dentes decíduos (SIPERT et al., 2013). Sipert et al. (2014a) ao utilizar fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa dental de dentes decíduos e

---

permanentes e estímulos como LPS de *Escherichia coli* (LPS de *E. coli*) e ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis*, concluíram que fibroblastos de diferentes tecidos orais, apresentam comportamento diferencial frente a antígenos bacterianos comumente relacionados a patologias que afetam a cavidade oral. Outro trabalho utilizando LPS de *E. coli* como estímulo sugere que a expressão e regulação de miR-146a e miR-155, moléculas envolvidas na regulação da matriz extracelular e produção de mediadores inflamatórios, são mais pronunciadas em fibroblastos de gengiva do que de ligamento periodontal e polpa dental (SIPERT et al., 2014b).

Na literatura têm sido publicados vários trabalhos que revelam que Ang II possui uma grande variedade de propriedades biológicas (EGIDO 1996; ICHIKAWA; HARRIS, 1991). Sabe-se que este componente ativo do SRA (Ang II) está envolvido na iniciação e progressão da DP (SANTOS et al., 2015; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2015), contribuindo para inflamação e destruição tecidual no periodonto, exibindo características semelhantes a uma citocina (MARCHESI et al., 2008; SUZUKI et al., 2003).

Alguns estudos têm mostrado o envolvimento de Ang II com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (MARRERO et al., 1995; KANDALAM et al., 2010), entretanto o exato mecanismo ainda não está completamente esclarecido. Uma das vias de sinalização que poderia estar envolvida neste fenômeno seria JAK/STAT, uma característica via intracelular de transdução de sinais de receptores de citocinas. Em cultura de células do músculo liso da aorta de rato a expressão de IL-6 encontrou-se elevada e este aumento foi atribuído à ativação da via JAK/STAT (SCHIEFFER et al., 2000). O envolvimento de Ang II através de receptores AT1 com o aumento da secreção de IL-6 via JAK/STAT em astrócitos de tronco cerebral também tem sido discutido (KANDALAN et al., 2010). Estes autores observaram que Ang II aumentou a fosforilação de STAT3 e que o pré-tratamento das células com um inibidor específico de JAK2 anulou este efeito. Outra via de sinalização que poderia estar envolvida no mecanismo da interferência de Ang II com o aumento de IL-6 seria a via NF-κB (NAIR et al., 2015). Sabe-se que TLRs são receptores-sentinela e sua estimulação leva à ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear Kappa B (NF-κB) e fatores reguladores de interferon (IRFs), que promovem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outras proteínas responsáveis pela defesa do hospedeiro (MIGGIN; O' NEILL, 2006). NF-κB é um fator de transcrição

---

chave que regula os processos inflamatórios, sendo estimulado por várias moléculas como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β), espécies reativa de oxigênio (NADLONEK et al., 2013; WU et al., 2006) e a própria Ang II.

Recentemente, Nair et al. (2015) observaram que TLR4 e HMGB1, um ligante endógeno desse receptor, encontram-se elevados em células epiteliais do túbulo renal de rato após o tratamento com Ang II e que a supressão dessas moléculas, atenuam a inflamação dessas células induzidas por este peptídeo. Estes autores também constataram que o uso de Losartan, atenuou a inflamação mediada por TLR4, reduzindo os níveis de RNAm de TLR4, HMGB1, TNF- α e IL-1 β por PCR e também de suas respectivas proteínas por Western Blot. Uma possível explicação para este mecanismo seria que Ang II induziria nas células a liberação de HMGB1 para o meio extracelular. Sendo assim, TLR4 seria ativado por seu ligante (HMGB1) na superfície de células vizinhas induzindo a ativação de NF κ B levando a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, o qual leva a um aumento da produção de ROS (espécies reativa de oxigênio), promovendo um mecanismo de feedback positivo, levando à injúria renal. Seguindo a mesma linha, Lv et al. (2015) mostraram que Ang II e alta glicose regularam positivamente TLR4, MYD88 e NF- κ B resultando no aumento da liberação de MCP-1 e IL-6, em células mesangiais de rato. O silenciamento do receptor TLR4 bem como o tratamento por outro bloqueador do receptor AT1, irbersartan, reduziram estes parâmetros sugerindo uma comunicação entre as vias de sinalização de Angiotensina II e TLR4, com a participação do receptor AT1.

Sendo assim, uma vez que trabalhos publicados na literatura relatam a expressão de componentes do SRA em diferentes espécies e tecidos, inclusive em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos e que Ang II possui funções que estão relacionadas a todas as etapas do processo inflamatório, como alterações vasculares, extravasamento de leucócitos e reconstituição e crescimento celular (SUZUKI et al., 2003) observado na DP, acredita-se que o estudo de um eixo contra-regulatório (ECA-2/ ANG (1-7)/ MAS) ao clássico eixo deste sistema (ECA/ ANG II/ AT1) poderia ser útil para uma melhor compreensão e possível contribuição para o desenvolvimento de futuras novas estratégias de tratamento desta doença inflamatória, de tanta importância para a odontologia.

---

2 PROPOSIÇÃO

---

2 PROPOSIÇÃO

Justificativa: A literatura relata que a ação do clássico eixo do SRA (ECA/ ANGII/ AT1) nos tecidos periodontais humanos (gengiva e ligamento periodontal) pode interferir, de forma ainda não completamente esclarecida, para a progressão e desenvolvimento da doença periodontal (DP) e sendo os fibroblastos as células mais numerosas nesses tecidos, podendo ser os possíveis responsáveis pela expressão das proteínas desse sistema, decidimos avaliar a ação de um eixo contra-regulatório presente neste sistema (ECA-2/ ANG (1-7)/ MAS), uma vez que o peptídeo bioativo Ang(1-7) apresenta ações antagônicas ao clássico peptídeo do SRA (Ang II). Portanto, estudos relacionados ao eixo (ECA-2 / ANG 1-7/ MAS) poderiam contribuir de alguma forma para desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da doença periodontal (DP), contrapondo a ação inflamatória de Ang II. Desta forma, o presente trabalho tem como **objetivo geral**:

Verificar se os eixos ECA/ ANG II/ AT1 e ECA-2/ ANG (1-7)/ MAS contribuem para a produção e / ou regulação de citocinas e quimiocinas por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados com a citocina IL-1 β ;

Objetivos específicos:

- Investigar o papel do receptor AT1, por meio de interferência gênica e farmacológica, na transcrição e secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias alvos deste estudo (tabela 2), bem como de componentes do SRA (tabela 1);
  - Entender o papel da ligação de Ang (1-7) ao receptor MAS com consequente liberação de citocinas e quimiocinas bem como a contribuição destes mecanismos no processo inflamatório *in vitro* por meio da análise por RT-q PCR e ELISA;
  - Avaliar o efeito de espécies reativas de nitrogênio por meio da determinação da concentração de nitrito pelo método colorimétrico de Griess em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7).
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

---

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de biópsias de tecido gengival e de ligamento periodontal humanos

Biópsias de tecido gengival e de ligamento periodontal humanos, clinicamente saudáveis, de 3 pacientes livres de doenças sistêmicas, selecionados para pesquisa do aluno de mestrado Paulo Zupelari Gonçalves (CAAE: 30880914.1.0000.5417, número do parecer: 811.431, data da relatoria: 10/09/2014) foram obtidas no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica (LAFFIC) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, durante exodontias de terceiros molares inferiores (não-irrompidos, inclusos e/ou impactados) previamente indicados para extração. Durante a cirurgia, por haver excesso de tecido gengival, foi necessário a retirada de um fragmento mínimo deste tecido no momento da sutura e esses foram os casos selecionados para esta pesquisa. Portanto, o fragmento de gengiva que foi utilizado nesta pesquisa encontrava-se inserido nos dentes que foram extraídos. Os pacientes doadores dos tecidos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP (CAAE: 37648114.4.0000.5417, número do parecer: 970.747, data da relatoria: 24/02/15). Após a exodontia, o terço médio das raízes foi cuidadosamente raspada com uma cureta periodontal estéril, removendo-se o tecido mole correspondente ao ligamento periodontal. Assim como o ligamento periodontal, os fragmentos de gengiva do mesmo paciente, após coletados, foram armazenados imediatamente em meio para cultura de células - Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA).

3.2 Cultura primária dos fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal

As células foram obtidas pelo método de explantes do tecido gengival e ligamento periodontal, conforme estabelecido por trabalhos anteriores do laboratório (MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011; SIPERT et al., 2014a). Resumidamente, em uma placa de Petri de 100x10 mm (diâmetro x altura), os

---

tecidos foram picotados separadamente com o auxílio de tesoura para tecido e lâmina de bisturi (número 15c) e imersos em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro bovino fetal (SFB; Gibco, Life Thechnologies, Carlsbad, CA) e antibióticos (100UI/mL penicilina/estreptomicina). Os fragmentos de tecido foram coletados, centrifugados (200 g; 5 min; 18°C), ressuspensos em novo meio de cultura e armazenados em garrafas para cultura de 25 cm² sendo mantidos em estufa a 37 °C e a 5% CO₂. As culturas provenientes das biópsias foram mantidas até os fibroblastos alcançarem confluência, sendo realizadas trocas do meio de cultura a cada 2-3 dias. Após atingirem confluência, os fibroblastos foram repicados e utilizados nos experimentos entre a 4^a e 8^a passagem.

3.3 Pré-tratamento dos fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β .

Para o estudo da contribuição dos receptores AT1 e MAS foram utilizadas as seguintes drogas como ferramentas farmacológicas: Losartan (antagonista de receptor AT1) e Angiotensina (1-7) (agonista do receptor MAS).

Após a 4^a passagem, as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 1 x 10⁵ células por poço. Após aderidas, foi adicionado Losartan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) ou Ang (1-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), na concentração de 1 μ M e 10 μ M, 3 horas ou 30 minutos antes da estimulação ou não por IL-1 β (1 ng/mL), respectivamente (grupo experimental). Meio de cultura sem as drogas foi adicionado aos poços (grupo controle) (Figura 2). As células foram coletadas após 3 horas para análise da expressão de RNAm para os alvos desse estudo e o sobrenadante após 24 horas da estimulação por IL-1 β para avaliação da secreção proteica e submetidos às diferentes análises descritas a seguir. Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental e repetidos por no mínimo 3 vezes.

Figura 2 - Representação esquemática da organização dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tecido (gengiva ou ligamento periodontal), pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) e estímulo aplicado (IL-1 β).

3.4 Silenciamento do receptor AT1 por RNA de interferência (siRNA)

O silenciamento do receptor AT1 foi realizado utilizando-se protocolo descrito em trabalhos anteriores de nosso grupo (MORANDINI et al., 2013a,b). De forma sucinta, fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal foram semeados (1×10^5 cél/poço) em placas de 24 poços e mantidos por 24 h em DMEM contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) e 10% de soro bovino fetal em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Após aderência durante a noite, as células foram transfectadas com SiRNA scrambled (SiSCR), controle negativo do silenciamento gênico ou com a sequência que tem como alvo o gene para o receptor AT1 (SiAT1; Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat number: 4392421, ID: s1180). Para isto, os SiRNAs foram diluídos em meio reduzido de soro (OPTIMEM; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) para ficar na concentração final 30nM no poço. Em um tubo separado foi diluído reagente de transfecção à base de lipossoma (Lipofectamina 2000; Invitrogen Corp., Life Technologies, Carlsbad, CA) em meio

OPTIMEM na concentração de 1:50 e deixados em temperatura ambiente por 5 min, conforme as instruções do fabricante. Após este período o meio contendo SiRNA diluído e o meio contendo lipofectamina diluída foram misturados na proporção de 1:1 e deixados em temperatura ambiente por 20 min. O meio de cultura das placas contendo as células foi aspirado e substituído por DMEM a 1% de SBF sem antibióticos. Então, foi adicionado o complexo lipofectamina-SiRNA em cada poço. Após 24 h, os fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 3 h, para a coleta das células ou por 24 h, para a coleta do sobrenadante (figura 3). Após o silenciamento, o RNA total foi extraído para síntese do cDNA. Foram realizados ensaios de PCR quantitativo pelo sistema TaqMan (detecção dos genes alvo), para confirmar a eficiência do silenciamento dos genes para o receptor AT1.

Figura 3 - Representação esquemática da organização dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tecido (gengiva ou ligamento periodontal), silenciamento do receptor AT1 e estímulo aplicado (IL-1 β).

3.5 Avaliação do efeito citotóxico do tratamento com drogas (Losartan e Ang (1-7)) e do silenciamento gênico para o receptor AT1 sobre fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal (Ensaio de MTT)

Foi realizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5)-Dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio) para avaliar o efeito citotóxico do tratamento com drogas (Losartan e Ang 1-7) e do silenciamento gênico para o receptor AT1 sobre fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal estimulados por IL-1 β conforme estabelecido por trabalhos anteriores do laboratório (MORANDINI et al., 2013a; SIPERT et al., 2014a).

As células foram semeadas em placas de 24 poços e armazenadas em incubadora por 24 h, a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido este tempo foram realizados o pré-tratamento com drogas e silenciamento gênico conforme descrito a cima. Em seguida, foi adicionada solução de MTT 5 mg/mL e as placas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Após a remoção da solução, foi adicionado o mesmo volume de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) para dissolução dos cristais de formazan formados após redução do sal de MTT. Em seguida, a absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de microplacas (Synergy/H1, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA.) em comprimento de onda 570 nm. Os valores de absorbância média foram corrigidos pelo branco (somente meio) e os resultados foram mostrados como densidade óptica.

3.6 Avaliação da expressão e produção de componentes do Sistema Renina-Angiotensina e citocinas inflamatórias por fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) ou submetidos ao silenciamento gênico para o receptor AT1 estimulados por IL-1 β .

A expressão de RNAm para os componentes do SRA - Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), Receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1) e Receptor MAS (Tabela 1), assim como para citocinas inflamatórias (Tabela 2) foi avaliada por transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Adicionalmente, a

---

produção das enzimas: (ECA e ECA-2) e citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-8) foram quantificadas no sobrenadante das culturas, por ELISA (Figura 4).

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

Alvo	Código
Beta actina	4333762T
ECA	Hs01104600_m1
ECA-2	Hs00174179_m1
AT1	Hs01096942_m1
MAS	Hs00332805_m1

Tabela 2 – Alvos da PCR quantitativa e códigos dos ensaios inventoriados (Applied Biosystems®) que foram utilizados nos experimentos (citocinas inflamatórias).

Alvo	Código
IL-1 β	Hs01555410_m1
IL-6	Hs00985639_m1
IL-8/CXCL8	Hs00174103_m1
IL-10	Hs00961622_m1
SDF-1/CXCL12	Hs03676656_m1
TGF- β	Hs00231483_m1
TNF- α	Hs00174128_m1
RANK-L	Hs00243522_m1
OPG	Hs00900358_m1

Figura 4 – Representação esquemática dos alvos estudados nos respectivos ensaios. Nos ensaios de PCR quantitativa foi realizada a detecção de RNAm para: ECA, ECA-2, receptor AT1, receptor MAS e citocinas inflamatórias. Por ELISA, foi realizada a quantificação proteica no sobrenadante das culturas para as enzimas: ECA e ECA-2 e as citocinas (IL-6 e IL-8).

3.6.1 Análise da expressão gênica

3.6.1.1 - Extração de RNA total

O RNA total foi extraído a partir de 1×10^5 células utilizando o kit comercial RNAeasy Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente as células previamente aderidas na placa de 24 poços foram lavadas com solução de PBS 1X. Logo após, foi adicionada solução para lise das células em cada poço da placa. Em seguida foram realizadas seqüências de centrifugações e lavagens nas colunas fornecidas pelo Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Na última centrifugação, o RNA foi eluído em 30 μ L de RNA-free water (DEPC-treated water). As amostras foram armazenadas em freezer - 80°C até o momento da transcrição reversa.

3.6.1.2 Quantificação do RNA total e avaliação da pureza do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro, colocando-se 2 µL de cada amostra pura no aparelho Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). O objetivo desta etapa foi quantificar e verificar a pureza do RNA extraído. As leituras foram realizadas em comprimento de onda entre 260 (A260) e 280 nm (A280) e a concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/µL. A pureza do RNA total foi considerada adequada de acordo com a relação entre A260 e A280 (A260/A280) entre 1,9 e 2,1.

3.6.1.3 Tratamento do RNA total com DNase

Para eliminar a possível contaminação do RNA total por DNA genômico, procedeu-se o tratamento de todas as amostras (1 µg de RNA total) com DNase (gDNase Wipeout Buffer, Qiagen, Hilden, Alemanha), durante 2 min a 42°C. Este procedimento foi realizado seguindo-se as orientações do fabricante, conforme documentado em trabalho do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas (SANTOS et al., 2009).

3.6.1.4 Transcrição Reversa

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

3.6.1.5 PCR quantitativa

A expressão quantitativa do RNAm para os componentes do SRA – ECA, ECA-2, AT1, MAS e citocinas inflamatórias - foi analisada por meio de reações de PCR quantitativa, utilizando-se o sistema Taqman® (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) em um aparelho ViiA7 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), conforme as instruções do fabricante. Foram utilizados primers e sondas pré-fabricados e validados pela mesma empresa, listados nas Tabelas 1 e 2. Entre os genes de referência, usamos (GAPDH, β 2 microglobulina, RPL13A, 18S e β -actina). Entretanto, a β -actina (código: 4333762T) apresentou resultados mais consistentes em relação à amplificação, por este motivo foi escolhida como referência para todos os experimentos.

Foram utilizados 2 μ L de cDNA, sintetizado a partir do RNA total, de cada amostra juntamente com reagentes Taqman Gene Expression Mastermix® (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), primers e sondas com um volume final de reação de 5 μ L. A reação de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta e cinco ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, conforme recomendado pelo fabricante. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar escolhido para análise quantitativa da expressão de RNAm. A normalização da expressão de cada alvo foi feita em relação ao gene de referência (β -actina) e então, comparados a um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas, obtendo-se assim o cálculo da quantificação relativa (RQ), utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.6.2 Análise proteica

3.6.2.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para quantificar as proteínas, a reação de ELISA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando Kits comercialmente disponíveis para IL-6 e IL-8 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), ECA (R&D, Minneapolis, MN, EUA) e ECA-2 (Adpogen, Incheon, Korea). Em resumo, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais humanos (anticorpos de captura) para cada alvo. Após

---

o bloqueio durante 2 h, a fim de evitar a ligação não específica, IL-6 recombinante humana, IL-8 recombinante humana, ECA, ECA-2 ou sobrenadantes de cultura foram adicionados. As citocinas e enzimas foram detectadas após a ligação dos anticorpos de detecção (biotinilados) depois da ligação da enzima estreptavidina em cada poço. A microplaca foi lavada para remover anticorpos não ligados com a enzima. A reação colorimétrica resultante da adição do substrato foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1M, e as placas foram lidas a 450 nm por um leitor de microplacas (Synergy/H1, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Os limites de detecção dos ensaios de ELISA foram respectivamente: IL-6 (sensibilidade > 31,25 pg/mL), IL-8 (sensibilidade >15,62 pg/mL), ECA (sensibilidade > 0,78 ng/mL), ECA-2 (sensibilidade > 0,39 ng/mL). As concentrações de citocinas e enzimas foram determinadas por interpolação de uma curva padrão e foram apresentadas como pg/mL ($\pm$ erro padrão médio) para amostras em quadruplicata de cada uma das condições testadas.

3.6.2.2 Extrato celular e Western Blot

Células foram lisadas, em gelo, utilizando-se uma solução de lise de células (Cell-lytic solution; Sigma-Aldrich) contendo 1% de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich). Amostras de proteína (40 μ g) foram separadas por 10% SDS-PAGE (gel de acrilamida 10%) e transferidas para uma membrana de PVDF- Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) por Western Blot (Bio-Rad), e então marcadas com os respectivos anticorpos: anti-AT1 / rabbit policlonal, Santa Cruz, 1173 na diluição de 1:500 e anti-ECA / goat policlonal, Santa Cruz, 12187 na diluição de 1:500. Após incubação com anticorpo secundário e etapas de lavagem, as bandas de proteína foram visualizadas com o uso de substrato quimioluminescente (West Pico Super Signal chemiluminescent substrate / Thermo Scientific), e reveladas em um detector de quimioluminescência (LI-COR Model:3600, Lincoln, NE, USA). As mesmas membranas foram remarcadas usando a β -actin (Sigma-Aldrich) como controle de carregamento.

3.7 Determinação da concentração de óxido nítrico (nitrito) no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β (Método Colorimétrico de Griess).

Foi feita a detecção de nitrito no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β pelo Método Colorimétrico de Griess seguindo as orientações do fabricante (Sigma-Aldrich). Resumidamente as células foram semeadas em placas de 96 poços e armazenadas em incubadora por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após o pré-tratamento com as drogas seguidos da estimulação por IL-1 β , 50 μ L das amostras foram adicionadas aos poços. Adicionaram-se 50 μ L da solução de Sulfanilamida em todos os poços. Incubou-se por 5 a 10 min em ambiente protegido da luz. Adicionaram-se 50 μ L de da solução de Ned em cada poço e incubou-se novamente por 5 a 10 min. Em seguida a absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de microplacas (Synergy/H1, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA.) em comprimento de onda 520 nm. As concentrações de nitrito no sobrenadante foram determinadas por interpolação de uma curva padrão.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) . Os dados foram comparados usando-se o teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey entre os grupos adotando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

---

4 RESULTADOS

---

4 RESULTADOS

4.1 Cultura dos fibroblastos

A técnica para a realização de culturas primárias de fibroblastos a partir de biópsias de tecido gengival e coleta do ligamento periodontal humanos se mostrou passível de reprodução durante a execução do trabalho. A Figura 5 ilustra culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos de acordo com o período da cultura: explante (5 dias), semi-confluência (14 dias) e confluência (21 dias). Imagens realizadas em microscópio óptico invertido com objetiva de 10X.

Figura 5: Cultura de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. Cultura primária obtida a partir de explantes de gengiva (A,C,E) e de ligamento periodontal (B,D,F) humanos do mesmo doador. Aspecto dos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal no início da cultura (explante) (A,B), em semi confluência (C,D) e em confluência (E,F). Visualização em microscópio óptico invertido com objetiva de 10X.

4.2 Determinação do tempo de estímulo por IL-1 β pela avaliação da expressão gênica de componentes do SRA por fibroblastos de gengiva.

Para determinar o tempo de estímulo dos fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal por IL-1 β (1ng/mL), utilizados neste trabalho, foi realizada uma curva tempo-resposta (Figura 6) em que se verificou a expressão quantitativa do RNAm dos alvos do SRA: receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1), receptor de Ang (1-7) (MAS), Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), em relação ao tempo de estímulo por IL-1 β (1h, 3h, 6h e 24 h) por reações de RT-qPCR. Elegeu-se o tempo de estímulo de 3 h por IL-1 β para o ensaio de PCR por verificar neste período maior expressão dos receptores estudados (AT1 e MAS), sendo que este aumento se mostrou estatisticamente significativo nos tempos de 3 e 6 h para o receptor AT1 em comparação ao tempo zero.

Figura 6: Expressão de RNAm para AT1, MAS, ECA e ECA-2 por fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β em diferentes tempos (horas). Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram estimulados por IL-1 β (1 ng/ml) por 1, 3, 6 e 24 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B) ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. *(p<0.05), ***(p<0.01) em relação ao tempo 0 (sem estímulo por IL-1 β).

4.3 Efeitos do pré-tratamento farmacológico com Losartan e Ang (1-7), silenciamento gênico do receptor AT1 e do estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos (Ensaio de MTT).

O ensaio de MTT avaliou o efeito citotóxico dos tratamentos farmacológicos: Losartan (1 μ M e 10 μ M /3 h) e Ang (1-7) (1 μ M e 10 μ M/30 min) e do silenciamento gênico do receptor AT1 (24 h) estimulados por IL-1 β (1ng/ml/24h) sobre o crescimento de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos em cultura.

Ao comparar a viabilidade das culturas de fibroblastos, tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal, que foram pré-tratadas com Losartan e Ang (1-7) na concentração de 10 μ M, por 3 h e 30 min respectivamente e em seguida estimuladas por IL-1 β , por 24 h com aquelas que não receberam pré-tratamento com as drogas, observou-se uma diminuição na viabilidade celular (figura 7). Sendo assim, foi diminuída a concentração de ambas as drogas: Losartan e Ang (1-7), para 1 μ M, utilizadas em todos os experimentos deste trabalho, uma vez que para essa concentração as células se mostraram viáveis após o tratamento (figura 8).

Em relação ao silenciamento gênico para o receptor AT1, os fibroblastos tanto de gengiva quanto de ligamento periodontal dos três pacientes, permaneceram viáveis e sem diferenças significativas para a concentração de siRNA escolhida (figura 9).

Figura 7: Efeito do pré-tratamento farmacológico com Losartan e Ang (1-7) na concentração de 10 μ M e estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. A) Fibroblastos de gengiva humanos B) Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço) e mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h antes dos tratamentos. Estes foram pré-tratados com Losartan (10 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (10 μ M) por 30 min e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24 h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05), ***(p<0.001).

Figura 8: Efeito do pré-tratamento farmacológico com Losartan e Ang (1-7) na concentração de 1 μ M e estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. A) Fibroblastos de gengiva humanos B) Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h antes dos tratamentos. Estes foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

Figura 9: Efeito do silenciamento gênico do receptor AT1 seguido de estímulo por IL-1 β sobre a viabilidade de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos. A) Fibroblastos de gengiva humanos **B)** Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 h antes do silenciamento gênico. Estes foram silenciados (SiSCR e SiAT1) por 24 h e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24 h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1= silenciamento gênico do receptor AT1, - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

4.4 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

4.4.1 Componentes do SRA

4.4.1.1 Pós silenciamento gênico do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β .

Em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal observou-se que o estímulo por IL-1 β fez aumentar significativamente a expressão de RNAm de AT1 e que este aumento foi prevenido nas células que tiveram o receptor AT1 silenciado. A porcentagem de silenciamento do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva foi de 50% e em fibroblastos de ligamento periodontal foi de 63 % (Figuras 10 e 11 A). Em relação à modulação de componentes do SRA nessas células, a expressão gênica do receptor MAS e da enzima ECA em fibroblastos de gengiva não foram alteradas pelo silenciamento do receptor AT1 e nem pelo estímulo por IL-1 β (Figura 10 B e C).

Já para o ligamento periodontal, a estimulação por IL-1 β fez aumentar significativamente a expressão gênica do receptor MAS e da ECA (figura 11 B e C), mas não a expressão da ECA-2 (Figura 11 D). Em células que tiveram o receptor AT1 silenciado, os níveis de RNAm para o receptor MAS e as enzimas ECA e ECA-2 não foram alterados significativamente (Figura 11 B, C e D).

Gengiva

Figura 10: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de AT1, MAS e ECA em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1= silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *($p < 0.05$).

Ligamento Periodontal

Figura 11: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de AT1, MAS, ECA e ECA-2 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$).

4.4.1.2 Pós tratamento farmacológico em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β

Para investigar se os receptores AT1 e MAS poderiam modular a expressão de outros componentes do SRA e citocinas inflamatórias em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β , utilizamos como pré-tratamento: Losartan (antagonista do receptor AT1) e Ang (1-7) (agonista do receptor MAS).

Os resultados de qPCR revelaram que em fibroblastos de gengiva, os níveis de RNAm para o receptor AT1 tiveram uma expressão significativamente maior nas células estimuladas por IL-1 β e que o pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) não foi capaz de interferir nesta expressão (figura 12 A). Em relação à expressão de RNAm para MAS, ECA e ECA-2 não houve diferença significativa entre os tratamentos com ou sem a presença de IL-1 β (figura 12 B,C e D).

Em fibroblastos de ligamento periodontal a expressão de RNAm para AT1, MAS, ECA e ECA-2 não foram alterados com o uso de ambas as drogas, com ou sem a presença de IL-1 β (figura 13 A, B, C e D).

Gengiva

Figura 12: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de AT1, MAS, ECA e ECA-2 em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (A), MAS (B), ECA (C) e ECA-2 (D) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05).

Ligamento Periodontal

Figura 13: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de AT1, MAS, ECA e ECA-2 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de AT1 (**A**), MAS (**B**), ECA (**C**) e ECA-2 (**D**) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

4.4.2 Citocinas Inflamatórias

4.4.2.1 Pós silenciamento gênico do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β .

Os resultados da qPCR revelaram que em ambos os tipos celulares (fibroblastos de gengiva e fibroblastos de ligamento periodontal), o estímulo por IL-1 β fez aumentar significativamente os níveis de RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 (Figuras 14 e 15 A, B, C e D). Entretanto, somente para os fibroblastos de gengiva e não para ligamento periodontal, o silenciamento do receptor AT1 diminuiu significativamente a expressão gênica de IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Figura 14 A, C e D) induzidos pelo estímulo com IL-1 β . Em relação ao TNF- α , o silenciamento do receptor AT1 não alterou o aumento da expressão desta citocina induzido por IL-1 β em ambos os tipos celulares (Figuras 14 e 15 B).

Gengiva

Figura 14: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-8 em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1β. Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por (IL-1β) (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1β (**A**), TNF-α (**B**), IL-6 (**C**) e IL-8 (**D**) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β-actina. Os valores estão representados como média ± EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1β= estimulação por IL-1β. *(p<0.05) **(p<0.01) ***(p<0.001).

Ligamento Periodontal

Figura 15: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$).

Em relação à IL-10, CXCL12 e RANK-L os níveis de RNAm para estes alvos em fibroblastos de gengiva e de ligamento periodontal não foram alterados pelo estímulo por IL-1 β e nem pelo silenciamento do receptor AT1 (Figuras 16 e 17 A, C e D). Em fibroblastos do ligamento periodontal, mas não em fibroblastos de gengiva houve um aumento dos níveis de RNAm para TGF- β após o estímulo por IL-1 β (Figuras 16 e 17 B). Entretanto, o silenciamento do receptor AT1 não alterou os níveis de RNAm desta citocina em ambos os subtipos de fibroblastos (Figuras 16 e 17 B). Já para OPG, em ambas as células o estímulo por IL-1 β fez aumentar os níveis de RNAm para esta citocina (Figuras 16 e 17 E). Entretanto, em fibroblastos de gengiva observamos um aumento de RNAm para OPG quando o receptor AT1 foi silenciado (Figura 16 E).

Gengiva

Figura 16: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (**A**), TGF- β (**B**), CXCL12 (**C**), RANK-L (**D**) e OPG (**E**) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *($p < 0.05$).

Ligamento Periodontal

Figura 17: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a regulação da expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (A), TGF- β (B), CXCL12 (C), RANK-L (D) e OPG (E) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . ** (p < 0.01) *** (p < 0.001).

4.4.2.2 Pós tratamento farmacológico em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β

O pré-tratamento com as drogas não influenciou a resposta de ambos os subtipos de fibroblastos na expressão gênica das citocinas alvos deste estudo sem a estimulação por IL-1 β (dados não mostrados).

Ao analisar a expressão de RNAm para as citocinas inflamatórias em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal observou-se um aumento significativo de TNF- α , IL-6 e IL-8 na presença do estímulo com (IL-1 β), sendo que o pré-tratamento com ambas as drogas, Losartan e Ang (1-7) não influenciou este aumento (Figuras 18 e 19 B, C e D). Em relação a IL-1 β não foi constatada diferença significativa desta citocina quando as células foram pré-tratadas com Losartan e Ang (1-7) e estimuladas por IL-1 β . (Figuras 18 e 19 A).

Gengiva

Figura 18: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. *(p<0.05), ***(p<0.001). IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

Ligamento Periodontal

Figura 19: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05), **(p<0.01).

Em relação as demais citocinas a expressão de RNAm para IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG, não foram alteradas com ambos os tratamentos (pré-tratamento com drogas e estimulação por IL-1 β) (figuras 20 e 21 A, B, C, D e E).

Gengiva

Figura 20: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (A), TGF- β (B), CXCL12 (C), RANK-L (D) e OPG (E) foram analisadas por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

Ligamento Periodontal

Figura 21: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a regulação e expressão de RNAm de IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG em fibroblastos humanos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 3 h. O RNA total foi extraído da cultura e a expressão de IL-10 (**A**), TGF- β (**B**), CXCL12 (**C**), RANK-L (**D**) e OPG (**E**) foi analisada por RT-qPCR. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência β -actina. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 2 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

4.5 Detecção da produção de IL-6, IL-8, ECA e ECA-2 por ELISA.

4.5.1 Pós silenciamento gênico do receptor AT1 em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β .

A produção das enzimas do SRA - ECA e ECA-2 e das citocinas IL-6, IL-8 foram analisadas no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal por ELISA.

Observamos que os fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, apesar de serem capazes de expressar RNAm para as enzimas ECA e ECA-2, não foram capazes de secretá-las no sobrenadante das culturas sob as condições experimentais deste trabalho: silenciamento gênico do receptor AT1/24h e estímulo por IL-1 β (1ng/mL/24h) (dados não mostrados).

A estimulação por IL-1 β aumentou significativamente a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos de gengiva (Figura 22 A e B) e de ligamento periodontal (Figura 23 A e B). Quando o receptor AT1 foi silenciado, observamos uma diminuição nos níveis proteicos de IL-6 e IL-8 induzida por IL-1 β , tanto em fibroblastos de gengiva (Figura 22 A e B) como em células provenientes do ligamento periodontal (Figura 23 A e B).

Figura 22: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (**A**) e (IL-8) (**B**) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$).

Ligamento Periodontal

Figura 23: Efeito do silenciamento do receptor AT1 sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem o receptor AT1 foi silenciado por 24 h e estimulado por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (**A**) e (IL-8) (**B**) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. SiSCR= controle negativo do silenciamento gênico, SiAT1=silenciamento gênico do receptor AT1, IL-1 β = estimulação por IL-1 β . **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$).

4.5.2 Pós tratamento farmacológico em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β

A secreção das enzimas do SRA - ECA e ECA-2 e das citocinas IL-6, IL-8 foi detectada a partir do sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal por ELISA.

A análise mostrou que, tanto os fibroblastos de gengiva quanto de ligamento periodontal, apesar de apresentarem expressão gênica (RNAm) para as enzimas ECA e ECA-2, não foram capazes de secretá-las sob as condições experimentais utilizadas neste trabalho: pré-tratamento com drogas – Losartan (1 μ M/3h) e Ang (1-7) (1 μ M/30 min) estimuladas por IL-1 β (1ng/mL/24h) (dados não mostrados).

Em relação a IL-6 e IL-8, os fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, tiveram um comportamento bem semelhante. Nos dois subtipos celulares, assim como nos resultados de qPCR, as drogas utilizadas como pré-tratamento, Losartan e Ang (1-7), não alteraram o aumento das proteínas IL-6 e IL-8 induzidos pela estimulação com IL-1 β (Figura 24 A e B) e (Figura 25 A e B).

Figura 24: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (**A**) e (IL-8) (**B**) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *($p < 0.05$).

Figura 25: Efeito do pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) sobre a produção das proteínas (IL-6) e (IL-8) em fibroblastos de ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de três indivíduos saudáveis e após a 4ª passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e estimulados por IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis das proteínas (IL-6) (**A**) e (IL-8) (**B**) no sobrenadante das células foram avaliados por ELISA. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β . *(p<0.05), **(p<0.01).

4.6 Detecção da produção de AT1 e ECA por Western Blot

4.6.1 Pós tratamento com Losartan no extrato total de fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β

Quando o extrato total da células (fibroblastos de gengiva) foi analisado por Western Blot, observou-se a presença de AT1. Podemos notar que a intensidade da banda para o receptor AT1 sob estímulo por IL-1 β , parece ser mais evidente do que as que não foram estimuladas por esta citocina e que o pré-tratamento com Losartan não regulou a produção deste receptor, nas condições de tratamentos que foram seguidas neste trabalho (Figura 26), corroborando os dados da RT-qPCR.

No caso da ECA, esta não foi detectada, nem mesmo sob as condições de estimulação (IL-1 β) ou pré-tratamento com (Losartan) (Figura 26).

Figura 26: Efeito do pré-tratamento com Losartan sobre a produção do receptor AT1 e da enzima ECA em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β . Culturas primárias foram estabelecidas a partir de tecidos de 3 indivíduos saudáveis e após a 4^a passagem foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e estimulados com IL-1 β (1 ng/mL) por 24 h. Os níveis de proteínas do receptor AT1 e da enzima ECA no sobrenadante das células foram avaliados por Western Blot. - IL-1 β = sem estimulação por IL-1 β e + IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

4.7 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

4.7.1. Determinação da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β .

Foi detectada a produção de nitrito no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal. Em ambos os tipos celulares, a concentração de nitrito não foi significativamente alterada pelos tratamentos utilizados neste trabalho: pré-tratamento com Losartan por 3 h e Ang (1-7) por 30 min, ambos a 1 μ M, estimulados por IL-1 β (1ng/mL/24h) (Figura 27 A e B).

Figura 27: Determinação da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas de fibroblastos de gengiva e do ligamento periodontal pré-tratados com Losartan e Ang (1-7) estimulados por IL-1 β . **A)** Fibroblastos de gengiva humanos **B)** Fibroblastos de ligamento periodontal humanos. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h antes dos tratamentos. Estes foram pré-tratados com Losartan (1 μ M) por 3 h e Ang (1-7) (1 μ M) por 30 min e foram estimulados por IL-1 β (1ng/ml) por 24 h. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes. IL-1 β = estimulação por IL-1 β .

5 DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

Há alguns anos, a produção local de Ang II tem sido associada de alguma forma ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal (GURKAN et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013; SANTOS et al., 2015), porém o exato mecanismo em que o SRA pode interferir com a patogênese da periodontite ainda permanece pouco explorado. Sendo assim, neste estudo, usando modelo *in vitro* de fibroblastos derivados de tecidos periodontais investigamos o papel dos receptores AT1 e MAS na expressão de citocinas inflamatórias de interesse para a imunopatogênese periodontal. Os resultados deste trabalho mostraram pela primeira vez o importante papel do receptor AT1 na modulação da secreção de interleucina (IL-6) e (IL-8) induzida por IL-1 β , nas células residentes mais numerosas do tecido conjuntivo periodontal.

Primeiramente, foi observado, por qPCR, que a expressão constitutiva do receptor AT1 e da enzima ECA foi regulada positivamente em fibroblastos de gengiva estimulados por IL-1 β após 3 e 6 h de estímulo com esta citocina, respectivamente (Figura 5). Sendo assim, escolhemos o tempo de 3 h para o estímulo das células com IL-1 β , a fim de avaliar o efeito do knockdown ou antagonismo do receptor AT1 na expressão de citocinas inflamatórias. O uso desta citocina como estímulo pró-inflamatório foi baseada em trabalhos anteriores de nosso laboratório no qual foi observada uma maior intensidade de fluorescência na marcação para o receptor AT1 por imunofluorescência nas culturas de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimuladas por IL-1 β do que nas estimuladas por diferentes LPS bacterianos (*P. gingivalis* e *E. coli*) (SANTOS et al., 2015). Na literatura, tem sido mostrado que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzem, em diferentes tipos de células, a expressão do receptor AT1 (GURANTZ et al., 2005 ; YOSHIDA et al., 2006). Segundo trabalho de Kent et al. (1998), IL-1 β possui maior habilidade em estimular elevação da mensagem e da proteína de IL-6 do que o TNF- α , e este por sua vez, maior do que LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*. É curioso ressaltar que o estímulo com IL-1 β aumentou também expressão de RNAm para o receptor MAS e a enzima ECA, além do receptor AT1, em células controle (SiSCR) do ligamento periodontal nos

---

experimentos de silenciamento gênico. A literatura tem mostrado que IL-1 β é capaz de modular a expressão e atividade do eixo ECA-2/ANG(1-7)/MAS (ENDER et al., 2014). Estes autores observaram um aumento da expressão do receptor MAS e de ECA-2, de maneira concentração-dependente, em células de osteosarcoma quando estas foram estimuladas por IL-1 β e ainda sugeriram que o aumento deste receptor poderia estar relacionado com a diminuição da proliferação celular e o seu silenciamento com efeitos contrários a estes.

O silenciamento do receptor AT1 mediado por siRNA diminuiu a expressão gênica deste receptor com eficiência de 50 a 63%, em gengiva e ligamento periodontal, respectivamente. Sabe-se que geralmente uma eficiência próxima a 70% é desejada para um silenciamento efetivo. Entretanto, em nosso trabalho, uma diminuição entre 50 a 60% do receptor silenciado refletiu na modulação das citocinas estudadas. Como observado no ensaio de MTT, esta diminuição não foi devido à morte celular, uma vez que os fibroblastos de ambos os tipos celulares se mostraram viáveis quando foram submetidos ao silenciamento gênico (Figura 8). O silenciamento do receptor AT1 vem sendo utilizado em trabalhos descritos na literatura para melhor entender o envolvimento deste receptor com as vias de sinalização. Uma diminuição da expressão de RNAm de AT1 foi observada em cultura de células humanas do túbulo proximal quando este receptor foi silenciado por SiRNA (GONG; HOU, 2016). Efetivo silenciamento do receptor AT1 também tem sido confirmado em células W20–17 que mostraram ausência desta proteína por análise de Western blot (QUERQUES et al., 2015). Em contrapartida, o RNAm do receptor MAS e das enzimas ECA e ECA-2, neste trabalho, não foram influenciados pelo silenciamento gênico do receptor AT1, em ambos os tipos celulares.

Por outro lado, o uso de um antagonista do receptor AT1 (Losartan) e um agonista do receptor MAS (Ang 1-7) não interferiram na expressão gênica do receptor AT1 induzida por IL-1 β e nos demais alvos estudados do SRA (receptor MAS e enzimas ECA e ECA-2) nos dois tipos celulares, avaliando-se RNAm. O resultado de Western Blot, corrobora os dados da qPCR, mostrando que o estímulo com IL-1 β aumenta a expressão do receptor AT1, mas que o pré-tratamento com Losartan não interfere nesse resultado. Inicialmente, seria utilizada neste trabalho a concentração descrita na literatura de 10 μ M para Losartan e Ang (1-7) como pré-tratamento (TAO et al., 2014; DIAZ-PIÑA et al., 2015). Entretanto, nestas condições

---

houve uma diminuição da viabilidade celular dos fibroblastos, sendo assim optamos por usar uma concentração mais baixa (1 μ M) dessas drogas em que os fibroblastos permaneceram viáveis. A concentração de 1 μ M de Losartan (CORREA et al., 2014; DU et al., 2004) e 1 μ M de Ang (1-7) (HEITSCH et al., 2001; TAO et al., 2014) vem sendo utilizada em cultura de diferentes tipos de células.

O uso de Losartan e Ang (1-7), como ferramentas farmacológicas, partiu do princípio em bloquear o eixo ECA /ANGII /AT1 com um antagonista do receptor AT1 e estimular o eixo ECA-2 /ANG (1-7) /MAS com um agonista do receptor MAS, respectivamente. Estes eixos são considerados contra-regulatórios, uma vez que Ang II está envolvida no processo inflamatório, exibindo ações pró-inflamatórias (LEUNG, 2004; CAPETTINI et al., 2012) e Ang (1-7) ser descrita por suas ações anti-inflamatórias (WANG et al., 2015; TAO et al., 2016). Alguns efeitos do eixo ECA-2/ANG (1-7)/MAS geralmente opostos ao eixo ECA/ANG II/AT1 ocorrem por meio de ações dependentes do óxido nítrico, incluindo vasodilatação e diminuição do estresse oxidativo (CHAPPELL., 2012). Entretanto, em nossos experimentos de dosagem de óxido nítrico (NO), em ambos os tipos celulares, a concentração de nitrito não foi significativamente alterada pelo tratamento farmacológico utilizado neste trabalho. Heitsch et al. (2001) em cultura de células endoteliais de aorta bovina observaram que a liberação de (NO) induzida por Ang (1-7) detectada diretamente por um micro-sensor foi concentração dependente. Utilizando o método de Griess, Ang (1-7) 1 μ M aumentou a liberação de (NO) em fibrócitos circulantes. Entretanto, os autores utilizaram um tempo de 48 h como pré-tratamento com Ang (1-7) (WANG et al., 2012). Em nosso trabalho, é possível que um tempo maior de pré-incubação das células com Ang (1-7) seria necessário para estimular a liberação de (NO) no sobrenadante da cultura.

Recentes estudos com Losartan e Ang (1-7) têm mostrado a interferência destas drogas nos efeitos mediados por Ang II. Querques et al. (2015) identificaram o receptor AT1 como um potencial determinante da diferenciação osteogênica, ou seja, seu envolvimento na formação óssea. Tanto o silenciamento do receptor AT1 quanto o tratamento deste receptor com Losartan prejudicou severamente a maturação de células mesenquimais ao longo da linhagem osteoblástica. Santos et al. (2015) sugerem um possível mecanismo do SRA no tecido periodontal. Os autores observaram que o tratamento com Losartan ou Alisquireno atenuou a

---

reabsorção óssea (análise de perda óssea) induzida experimentalmente em ratos, sugerindo o envolvimento de Ang II através do receptor AT1 na ativação da via ERK o qual modula NF- κ B levando a liberação de vários fatores como osteocalcina, fosfatase alcalina, IL-1 β , IL-6, TNF α , MMPs, e RANK-L (ZHANG et al., 2014). Entretanto, assim como em nosso trabalho, Santos et al. (2015) também não verificaram alteração na expressão de RNAm de vários componentes do RAS em ratos, incluindo para o receptor AT1a quando foram tratados com Losartan.

A hipótese que o receptor MAS estaria envolvido nos efeitos elucidados por antagonistas do receptor AT1 vem sendo discutida (PERNOMIAN et al., 2015). De fato, o receptor MAS age como um antagonista fisiológico do receptor AT1 por meio da formação constitutiva de um complexo hetero-oligomérico em células transfectadas de mamíferos (KOSTENIS et al., 2005). Consistente com estas observações, Kim et al. (2015) verificaram em cultura de células que a injúria renal ocasionada pelo eixo ECA/ANG II/AT1 poderia ser prevenida prejudicando a expressão do receptor AT1 com tratamento com Ang (1-7) em uma maneira dependente do receptor MAS. Tao et al. (2014) verificaram em fibroblastos cardíacos de ratos que o pré-tratamento com Ang (1-7) preveniu o aumento induzido por Ang II na fosforilação de ERK (p-ERK1/2) e na relação p-ERK/ERK sugerindo que tal via de sinalização estaria envolvida nas ações de Ang II e que os efeitos contra-regulatórios de Ang (1-7) interferiria neste mecanismo. Em outro trabalho, a estimulação com Ang (1-7) mostrou um efeito inibitório na expressão de IL-6 e IL-8 em células pancreáticas, o qual foi associado com a diminuição da inflamação pancreática em células estimuladas com ceruleína, um decapeptídeo que estimula experimentalmente a pancreatite. Os autores sugerem que a ativação da via PIK3/AKT pelo eixo ECA-2/ANG (1-7)/MAS estaria envolvida neste mecanismo de proteção (WANG et al., 2015).

Embora a literatura relate que Losartan e Ang (1-7) possam interferir, de alguma forma, na via de sinalização de Ang II, nas condições experimentais utilizadas em nosso trabalho, estas drogas não modularam a expressão gênica dos seus respectivos receptores (AT1 e MAS) e enzimas (ECA e ECA-2) em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal estimulados por IL-1 β . Contrapondo os resultados de qPCR no qual a mensagem para as enzimas (ECA e ECA-2) foram observadas, as proteínas não foram detectadas no sobrenadante das culturas ou no

---

extrato celular total de ambos os tipos celulares, nos dois tipos de interferência (drogas e silenciamento gênico). Estes resultados corroboram estudos anteriores de nosso laboratório, onde apesar de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal apresentarem expressão gênica positiva para ECA, não foi detectada secreção para o ambiente extracelular (sobrenadante) (ISHIKIRIAMA, 2012; SANTOS et al., 2015). Saijonmaa et al. (2001) demonstraram em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) que IL-1 β (0,1; 1; e 10 ng/mL) ocasionou uma diminuição de ECA (RNAm e proteína) dose e tempo dependente. Além do RNAm, os autores mediram a quantidade de ECA ligada a membrana da célula (análise de ligação do inibidor). Uma possível explicação para a presença da mensagem (RNAm) e a ausência da proteína para ECA em nossos resultados poderia ser atribuída ao tempo de incubação (24 horas) não ter sido suficiente para que a proteína tenha sido traduzida e ocorra sua detecção. Além disso, o estímulo com IL-1 β poderia ter diminuído a concentração desta enzima e por isto não foi detectada. Adicionalmente, o uso de uma metodologia mais específica, como a análise de ligação da ECA na membrana da célula ou HPLC poderia ter sido utilizada, uma vez que esta enzima está localizada principalmente na membrana celular (CORVOL; WILLIAMS, 1998).

É bem descrito na literatura que IL-1 β faz aumentar a secreção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 (PALMQVIST et al., 2008; NADLONEK et al., 2013 ; SUN et al 2015; ALOMAR et al., 2016). Cultura de pré-adipócitos humanos mostrou que estas células são altamente responsivas ao estímulo com IL-1 β , resultando na liberação de várias citocinas, incluindo TNF- α e outras como IL-6, IL-8, IL-10 (ALOMAR et al., 2016). Em células intersticiais de válvula aórtica humana (AVICs) a estimulação com IL-1 β resultou em um significativo aumento de IL-6 e IL-8, MCP-1 (proteína quimioatraente de monócito) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) através da ativação de NF- κ B (NADLONEK et al., 2013). Nossos resultados, tanto para a detecção da proteína por ELISA (IL-6 e IL-8) quanto a expressão do RNAm por qPCR (IL-6, IL-8 e TNF- α) corroboram este fato em ambos os tipos celulares. Já em relação a IL-10, CXCL12, RANK-L a estimulação com IL-1 β em nossas culturas não influenciou a expressão da mensagem destas citocinas. Entretanto, um aumento de IL-1 β , TGF- β , e OPG foi verificado apenas nos experimentos de silenciamento gênico. Morandini et al. (2011) também não observaram alterações na produção de IL-10 em cultura de fibroblastos

---

de gengiva e ligamento periodontal estimuladas com diferentes concentrações de LPS de *P. gingivalis*.

Uma vez que a detecção da produção da proteína é soberana, nossos resultados evidenciaram uma diminuição significativa da secreção das proteínas IL-6 e IL-8 induzida por IL-1 β por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal quando o receptor AT1 foi silenciado. Entretanto, o RNAm para estas citocinas e também para IL-1 β , nas mesmas condições, ou seja, com o receptor AT1 silenciado, foi diminuído apenas em fibroblastos de gengiva. Fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos apresentam diferenças funcionais específicas na síntese de macromoléculas e proteínas, apesar de serem subtipos celulares similares no crescimento e em aspectos morfológicos (MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011). Estes autores sugerem ainda que ambos os subtipos de fibroblastos participem efetivamente na produção de citocinas e quimiocinas no contexto da resposta inflamatória de maneira distinta.

Sabe-se que fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humanos expressam receptores do tipo TOLL (TLR), entre eles TLR2 e TLR4 (UEHARA et al., 2007; TANG et al., 2011; MORANDINI et al., 2013a) e também receptores AT1 (NAKAMURA et al., 2011; SANTOS et al., 2015), sendo este último confirmado em nosso trabalho. Sendo assim, hipotetizamos que a diminuição de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas que tiveram o receptor AT1 silenciado tanto em fibroblastos de gengiva quanto de ligamento periodontal, poderia ocorrer por uma via de sinalização similar a descrita por Nair et al. (2015) e Lv et al. (2015). Uma possível comunicação entre a ligação de Ang II e seu receptor AT1 e a via de sinalização de receptores Toll-Like levaria a ativação de NF- κ B, aumentando a liberação de IL-6 e IL-8. Com o receptor AT1 silenciado, este aumento seria diminuído. Outra hipótese para os nossos resultados em relação à diminuição de IL-6 e IL-8 nas células com o receptor AT1 silenciado seria a diminuição da ativação por Ang II da via de sinalização JAK/STAT por intermédio do receptor AT1. Entretanto, para confirmar qual via de sinalização estaria realmente envolvida na diminuição destas citocinas seria necessário utilizar em estudos futuros Ang II como agonista do receptor AT1 e bloqueadores específicos de ambas as vias (NF- κ B e JAK/STAT) seguidas das dosagens de IL-6 e IL-8. Portanto, é possível afirmar com nossos dados que o receptor AT1 está envolvido de alguma forma com a secreção

---

de citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-8, independente de qual via de sinalização estaria envolvida.

Em contrapartida aos resultados do silenciamento gênico do receptor AT1, o pré-tratamento com Losartan e também com Ang (1-7) não modularam a expressão e secreção de IL-6 e IL-8 induzida por IL-1 β . Estes resultados corroboram dados da literatura em que se constatou, também em fibroblastos de gengiva humana, que o silenciamento do receptor AT1 foi capaz de diminuir significativamente o aumento da expressão gênica e da proteína IL-6 induzida pelo estímulo com IL-1 β . Entretanto, estes autores relatam, que o uso de um antagonista do receptor AT1, não reduziu significativamente os níveis de IL-6 (NAKAMURA et al., 2011). Por outro lado, sabe-se que em cultura de células do músculo liso vascular de aorta de ratos (VSMCs), um antagonista do receptor de Ang II extracelular (CV-11974) não influenciou os efeitos intracelulares deste peptídeo (HALLER et al., 1996). Além disso, Ang II tem sido relacionada com a translocação do receptor AT1 para o compartimento nuclear em neurônios (LU et al., 1998) e a localização nuclear do receptor AT1 resulta numa ativação nuclear específica (MORINELLI et al., 2007). Sendo assim, estes fatos sugerem que Ang II e o receptor AT1 em fibroblastos de gengiva humana exercem suas funções principalmente no interior das células (NAKAMURA et al., 2011). Considerando estas observações, é possível hipotetizar que em nossos resultados com fibroblastos, a ausência do receptor AT1 ou sua diminuição, observada no silenciamento gênico deste receptor, poderia interferir na liberação de citocinas, como IL-6 e IL-8 e não o seu bloqueio por um antagonista extracelular do receptor AT1, como o Losartan. Além disso, para a concentração das drogas utilizadas neste trabalho, talvez fosse necessário um tempo de pré-tratamento maior do que o escolhido em nossos experimentos.

Em relação às citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L e OPG, observamos, tanto em gengiva quanto em ligamento, que o pré-tratamento com Losartan e Ang (1-7) também não interferiu na expressão gênica das mesmas. O silenciamento do receptor AT1 não alterou a expressão dos níveis gênicos de TNF- α , IL-10, TGF- β , CXCL12, RANK-L induzidos por IL-1 β nos dois tipos celulares. Entretanto, nos experimentos com fibroblastos de gengiva foi detectado aumento significativo do RNAm para OPG.

Vários trabalhos têm relacionado a interferência de ambas as drogas utilizadas neste estudo na expressão de citocinas em diferentes tipos celulares. Ang (1–7) aumenta os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminui a expressão dos níveis de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , em células microgliais de rato. A ação de Ang (1-7) no receptor MAS e a diminuição da expressão da subunidade de NF- κ B estariam envolvidos neste mecanismo (LIU et al., 2016). Por outro lado, Losartan tem sido relacionado com o aumento de IL-10 experimentalmente em ratos (Danielyan et al., 2010) e em camundongos (KHALIL et al., 2000). Losartan *in vitro*, é capaz de suprimir a osteoclastogênese acompanhada por uma diminuição da fosforilação de ERK mediada por RANK-L em osteoclastos e *in vivo* pode aumentar a massa óssea (CHEN et al., 2015). Concentrações de TNF- α no sobrenadante de miócitos cardíacos aumentados previamente com estímulo por Ang II foram diminuídos com pré-tratamento com Losartan, mostrando a interação ativa entre Ang II e TNF- α na evolução da cascata isquêmica (FROLKIS et al., 2001). Por outro lado, em células mononucleares de sangue periférico, Losartan induziu a secreção de TGF- β e TNF- α com aumento de suas concentrações (KAYNAR et al., 2005).

Uma regulação positiva de AT2 foi observada com o uso de Losartan (Santos et al., 2015), sugerindo que o bloqueio de AT1 com este antagonista produza Ang II endógena livre que possa estimular AT2 (CHRY SANT et al., 2007). Em camundongos, Losartan diminuiu marcadores de osteoclastos, como RANK, RANK-L enquanto a osteoprotegerina (OPG), um inibidor da reabsorção óssea, foi aumentada (MOURA et al., 2016). Olmesartan, outro antagonista do receptor AT1, reduziu o processo inflamatório e a perda óssea em ratos, por diminuir os níveis de expressão de COX-2, MMP-2, MMP-9, RANKL e RANK e aumentar OPG (ARAÚJO et al., 2013). Em conjunto, estes dados nos fazem sugerir que o aumento de OPG observado em nossos resultados quando o receptor AT1 foi silenciado em fibroblastos de gengiva talvez ocorra por uma estimulação do receptor AT2 por Ang II livre endogenamente. Estudos mostraram que camundongos transgênicos que apresentam expressão e níveis circulantes aumentados de OPG desenvolvem osteopetrose (SIMONET et al., 1997). Por outro lado, camundongos deficientes em OPG desenvolvem o contrário, ou seja, osteoporose severa associada a um número aumentado de fraturas (BUCAY et al., 1998). Sendo os fibroblastos as células mais

---

numerosas nos tecidos periodontais é possível especular que este aumento de OPG nestas células que tiveram o receptor AT1 silenciado em nosso trabalho poderia exercer um papel protetor na DP.

Diante dos resultados encontrados até o momento e dos achados da literatura, podemos perceber que existem diferentes vias de sinalização envolvidas na modulação das citocinas inflamatórias mediados pelo SRA e o quanto é importante o estudo deste sistema para um melhor entendimento da participação celular na imunopatogênese periodontal. Este trabalho nos ajudou a esclarecer o envolvimento do receptor AT1 com a liberação de duas das principais citocinas inflamatórias envolvidas na periodontite, IL-6 e IL-8 por células residentes que participam ativamente neste processo. Sendo assim, estudos complementares envolvendo estas vias de sinalização se fazem necessários para um melhor entendimento da relação do SRA na iniciação e progressão da inflamação periodontal.

---

6 CONCLUSÕES

---

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram o envolvimento do eixo ECA / ANG II / AT1 na modulação da secreção de citocinas e quimiocinas importantes no processo inflamatório crônico.

Sendo assim, podemos concluir especificamente que:

- Fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal têm a expressão de alvos do SRA e de citocinas inflamatórias modulados pelo estímulo por IL-1 β de maneira distinta.
  - A secreção de IL-6 e IL-8 induzida por IL-1 β é diminuída pelo silenciamento do receptor AT1, mas não pelo bloqueio com o antagonista Losartan em ambos os tipos celulares.
  - Em fibroblastos de gengiva, mas não de ligamento periodontal, o silenciamento do receptor AT1, aumentou a expressão gênica de OPG.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

Alomar SY, Gentili A, Zaibi MS, Kepczyńska MA, Trayhurn P. IL-1 β (interleukin-1 β) stimulates the production and release of multiple cytokines and chemokines by human preadipocytes. Arch Physiol Biochem. 2016 Feb; 18:1-18.

Arancibia R, Oyarzún A, Silva D, Tobar N, Martinez J, Smith PC. Tumor necrosis factor- α inhibits transforming growth factor- β -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. J Periodontol. 2013; 84: 683-93.

Araújo AA, Lopes de Souza G, Souza TO, de Castro Brito GA, Sabóia Aragão K, Xavier de Medeiros CA, et al. Olmesartan decreases IL-1 β and TNF- α levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2013 Oct;386(10):875-84.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest. 1989;84(4):1045-9.

Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. Cell Signal. 2014; 26(10):2147-60.

Bandow K, Nishikawa, Y, Ohnishi T, Kakimoto K, Soejima K, Iwabuchi S, et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1 β expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. J Cell Physiol. 2007;392-98.

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

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

Berstein KE, Martin BM, Edwards AS, Bernstein EA. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J Biol Chem*. 1989; 264: 11945-51.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.

Bruneval P, Hinglais N, Alhenc-Gelas F, Tricottet V, Corvol P, Menard J, et al. Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry*. 1986, 85(1): 73-80.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998 May 1;12(9):1260-8.

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

Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1986 Jul;78(1):31-9.

Capettini LSA, Montecucco, F, Mach F, Stergiopulos N, Santos RAS, Silva, RF. Role of Renin-Angiotensin System in inflammation immunity and aging. *Curr Pharm Des*. 2012;18(7):963-70.

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

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 Hypertens*. 2010; 23(12):1318-25.

Chappell MC. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol*. 2012 Oct;2(4):2733-52.

Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med*. 2006; 354:610-21.

Chen S, Grover M, Sibai T, Black J, Rianon N, Rajagopal A, et al. Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. *Mol Genet Metab*. 2015 May;115(1):53-60.

Chrysant SG. The pathophysiologic role of the brain renin-angiotensin system in stroke protection: clinical implications. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2007 Jun;9(6):454-9.

Correa MV, Nolly MB, Caldiz CI, de Cingolani GE, Cingolani HE, Ennis IL. Endogenous endothelin 1 mediates angiotensin II-induced hypertrophy in electrically paced cardiac myocytes through EGFR transactivation, reactive oxygen species and NHE-1. *Pflugers Arch*. 2014 Sep;466(9):1819-30.

Corvol P, Williams TA (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. Ajea Barret. San Diego, Academic Press:1066-76.

Da Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Sachs D, Barroso LC, Costa VV, et al. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol*. 2010 ;185(9):5569-76.

Danielyan L, Klein R, Hanson LR, Buadze M, Schwab M, Gleiter CH, et al. Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res*. 2010 Apr-Jun;13(2-3):195-201.

De Gasparo M, Siragy HM. The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept*. 1999; 81(1-3):11-24.

Diaz-Piña G, Montes E, Checa M, Becerril C, Alba CG, Vega A, et al. Profibrosing Effect of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors in Human Lung Fibroblasts. *Lung*. 2015;193:199–202.

Du JQ, Sun CW, Tang JS. Effect of angiotensin II type 1 receptor on delayed rectifier potassium current in catecholaminergic CATH.a cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Sep;25(9):1145-50.

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

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012 Oct;91(10):914-20.

Ender, SA, Dallmer A, Lässig F, Lendeckel U, Wolke C. Expression and function of the ACE2/angiotensin(1-7)/Mas axis in osteosarcoma cell lines U-2 OS and MNNG-HOS. *Mol Med Rep*. 2014;10:804-10.

Ferrario, C. M. and Chappell, M. C. Novel angiotensin peptides. *Cell. Mol. Life Sci*. 2004, 61: 2720-27.

Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 1996;28(1):104-8.

Folkis I, Gurevitch J, Yuhas Y, Iaina A, Wollman Y, Chernichovski T, et al. Interaction between paracrine tumor necrosis factor-alpha and paracrine angiotensin II during myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Jan;37(1):316-22.

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

Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS, Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2003; 38: 219-17.

Garrido AM, Griending KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 302(2):148-58.

Gemmell E, Roderick I. Marshall, Gregory J. Seymour. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 1997;14 (1):112-43.

Giannobile WV Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol* 2008. 79: 1592– 1600.

Goker H, Haznedaroglu IC, Beyazit Y, Aksu S, Tuncer S, Misirlioglu M, et al. Local umbilical cord blood renin-angiotensin system. *Ann Hematol*. 2005; 84:277-81.

Gomes B P, Jacinto RC, Pinheiro ET, Souza EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Phorphyromonas endodontais*, *Prevotella intermedia* an *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Aug; 20(4): 211-5.

Gong Q, Hou F. Silencing of angiotensin II type-1 receptor inhibits high glucose induced epithelial e mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells via inactivation of mTOR/p70S6K signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;469:183-88.

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

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

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 Mar;156(3):543-50.

Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol* 2014; doi: 10.1111/omi.12065.

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

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

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension.* 2001 Jan;37(1):72-6.

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 Jan;230(1):176-8.

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

Inagami T, Iwai N, Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Chaki S et al. Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptors. *Eur Heart J.* 1994; 15 Suppl D:104-7.

Ip SP; Tsang SW; Wong TP; Che CT; Leung PS. Saralasin, a Nonspecific Angiotensin II Receptor Antagonist, Attenuates Oxidative Stress and Tissue Injury in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. *Pancreas.* 2003 Apr;26(3):224-29.

Ishikiriama BLC. Estudo da expressão e produção de componentes do sistema renina-angiotensina por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal. [tese na

---

internet]. Bauru (SP): Universidade de São Paulo; 2012. [acesso em 2016 fev]. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/25BellaLunaColombiniIshikiriama_Rev.pdf

Kandalam U, Clark MA. Angiotensin II activates JAK2/STAT3 pathway and induces interleukin-6 production in cultured rat brainstem astrocytes. *Regul Pept*. 2010 Jan 8;159(1-3):110-6.

Kaynar K, Ulusoy S, Ovali E, Vanizor B, Dikmen T, Gul S. TGF-beta and TNF-alpha producing effects of losartan and amlodipine on human mononuclear cell culture. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Oct;10(5):478-82.

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

Khalil A, Tullus K, Bakhiet M, Burman LG, Jaremko G, Brauner A. Angiotensin II type 1 receptor antagonist (losartan) down-regulates transforming growth factor-beta in experimental acute pyelonephritis. *J Urol*. 2000 Jul;164(1):186-91.

Kim CS, Kim IJ, Bae EH, Ma SK, Lee J, Kim SW. Angiotensin-(1-7) Attenuates Kidney Injury Due to Obstructive Nephropathy in Rats. *Plos One*. 2015 Nov 10;10(11):e0142664.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 2005 Apr 12;111(14):1806-13.

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

Lam SY, Leung OS. A locally generated angiotensin system in rat carotid body. *Regul Pept* 2002; 107: 97-103.

Lemos VS, Silva DMR, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RAS. The Endothelium-Dependent Vasodilator Effect of the Nonpeptide Ang(1-7) Mimic AVE 0991 Is Abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2005;46: 274-79.

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

Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*. 1997; 29(1 Pt 2):394-400.

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

Liu M, Shi P, Sumners C. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) on microglia. *J Neurochem*. 2016 Jan;136(1):163-71.

Lu D, Yang H, Shaw G, Raizada MK. Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology*. 1998 Jan;139(1):365-75.

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

Lv J, Chen Q, Shao Y, Chen Y, Shi J. Cross-talk between angiotensin-II and toll-like receptor 4 triggers a synergetic inflammatory response in rat mesangial cells under high glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Apr 3;459(2):264-9.

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

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*. 1995; 375:247-50.

Maurer M, Von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 1882-86.

Meng Y, Li T, Zhou GS, Chen Y, Yu CH, Pang MX, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/Mas axis protects against lung fibroblast migration and lung fibrosis by inhibiting the NOX4-derived ROS-mediated RhoA/Rho kinase pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jan 20;22(3):241-58.

Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol*. 2006 Aug;80(2):220-6.

Moran CS, Cullen B, Campbell JH, Golledge J. Interaction between angiotensin II, osteoprotegerin, and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Res*. 2009;46(3):209-17.

Morandini AC, Chaves Souza PP, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Sipert CR, Souza Costa CA, Santos CF. Toll-like receptor 2 knockdown modulates interleukin (IL)-6 and IL-8 but not stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4):535-44a.

Morandini AC, Chaves Souza PP, Ramos-Junior ES, Souza Costa CA, Santos CF. MyD88 or TRAM knockdown regulates interleukin (IL)-6, IL-8, and CXCL12 mRNA expression in human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*. 2013 Sep;84(9):1353-60b.

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

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

Mori T, Hashimoto A. Direct positive chronotropic action by angiotensin II in the isolated mouse atrium. *Life Sci*. 2006; 79(7):637-40.

Morinelli TA, Raymond JR, Baldys A, Yang Q, Lee MH, Luttrell L, *et al*. Identification of a putative nuclear localization sequence within ANG II AT(1A)receptor associated with nuclear activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Apr;292(4):C1398-408.

Moura AP, Montalvany-Antonucci CC, Rodrigues de Albuquerque Taddei S, Queiroz-Junior CM, Bigueti CC, Garlet GP, *et al*. Effects of angiotensin II type I receptor blocker losartan on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016 Mar;149(3):358-65.

Nadlonek N, Lee JH, Reece TB, Weyant MJ, Cleveland JC Jr, Meng X, Fullerton DA. Interleukin-1 Beta induces an inflammatory phenotype in human aortic valve interstitial cells through nuclear factor kappa Beta. *Ann Thorac Surg*. 2013 Jul;96(1):155-62.

Nair AR, Ebenezer PJ, Saini Y, Francis J. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2015 Jul 15;335(2):238-47.

Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1 β -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119(5):345-51.

Nedoszytko B, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, Roszkiewicz J, Nowicki R J. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014; 31 (2): 84-91.

Neil M. O'Brien-Simpson, Paul D. Veith, Stuart G. Dashper, Eric C. Reynolds. Antigen of bacteria associated with periodontitis *Periodontology* 2000. 2004 June 35(1):101–34.

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

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

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

Oarhe CI, Dang V, Dang M, Nguyen H, Gopallawa I, Gewolb IH, et al. Hyperoxia downregulates angiotensin-converting enzyme-2 in human fetal lung fibroblasts. *Pediatr Res.* 2015 May;77(5):656-62.

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

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

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

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

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976 Mar;34(3):235-49.

Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hånström L, Lerner UH. IL-1beta and TNF-alpha regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2008 Jun;87(6):558-63.

Palomeque J, Delbridge L, Petroff MV. Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival. *Front Biosci*. 2009; 14(1):5118-33.

Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern MED*. 1998 15; 128 (2):127-37.

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

Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*. 1995; 26: 1154-9.

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

Pernomian L, Pernomian L, Gomes MS, da Silva CH. Pharmacological significance of the interplay between angiotensin receptors: MAS receptors as putative final mediators of the effects elicited by angiotensin AT1 receptors antagonists. *Eur J Pharmacol*. 2015 Dec 15;769:143-6.

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

Pinheiro SVB, Simões e Silva AC, Sampaio WO, De Paula RD, Mendes EP, Bomtempo ED, et al. Nonpeptide AVE 0991 is an Angiotensin - (1-7) receptor MAS agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 2004; 44: 490-6.

Queiroz-Junior CM, Silveira KD, de Oliveira CR, Moura AP, Madeira MF, Soriani FM, et al. Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):814-23.

Querques F, Cantilena B, Cozzolino C, Esposito MT, Passaro F, Parisi S, et al. Angiotensin receptor I stimulates osteoprogenitor proliferation through TGFβ-mediated signaling. *J Cell Physiol*. 2015 Jul;230(7):1466-74.

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

Rietschel ET, Brade H, Host O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:39-81.

Rosenstiel P, Gallinat S, Arlt A, Unger T, Sievers J, Lucius R. Angiotensin AT2 receptor ligands: do they have potential as future treatments for neurological disease? *CNS Drugs*. 2002;16(3):145-53.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18: 217–42.

Ryan JW, Day AR, Schultz DR, Ryan US , Chung A, Marlborough DI, et al. Localization of angiotensin-converting enzyme (kininase II). Preparation of antibody-hemeoctapeptide conjugates. *Tissue Cell*. 1976; 8:111-24.

Ryan JW, Ryan US, Schultz DR, Whitaker C, Chung A, Dorer FE. Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem J*. 1975; 146:497-9.

Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005, 32(6):108-29.

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

Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *Plos One*. 2015; 10(8): 1-26.

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.

Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS*. 2003; 8258-63.

Santos, RAS, Ferreira, A.J., Simoes e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2 – angiotensin (1-7) - Mas axis. *Exp Physiol*. 2008; 93 (5): 510-27.

Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F. Downregulation of angiotensin-converting enzyme by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in cultured human endothelial cells. *J Vasc Res*. 2001 Jul-Aug;38(4):370-8.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res* 2000;87:1195–201.

Schulz W W, Hagler HK , Buja LM, Erdös EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest*. 1988; 59(6):789-97.

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

Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(8):797-814.

Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Barroso LC, Queiroz-Junior CM, Costa VV, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. *Peptides*. 2013 Aug;46:53-63.

Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *British Journal of Pharmacology*. 2013;169: 477-92.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.

Sipert CR, Morandini AC, Dionísio TJ, Machado MAAM, Oliveira SHP, Campanelli AP, et al. In vitro regulation of CCL3 and CXCL12 by bacterial by-products is dependent on site of origin of human oral fibroblasts. *JOE*. 2014; 40(1): 95-100a.

Sipert CR, Morandini AC, Dionísio TJ, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Santos CF. MicroRNA-146a and microRNA-155 show tissue-dependent expression in dental

---

pulp, gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. J Oral Sci. 2014 Jun;56(2):157-64b.

Sipert CR, Morandini AC, Modena, KCS, Dionísio TJ, Machado MAAM, Oliveira SHP, et al. CCL3 and CXCL12 production *in vitro* by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Phorphyromonas gingivalis* LPS. J Appl Oral Sci. 2013; 21(2): 99-105.

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

Soubrier F, Alheng-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:9386-90.

Sun F, Shi J, Chen S, Deng C, Hu X, Li H, Li G, Liu Y, Dong N. Lazaroid U-74389G inhibits the osteoblastic differentiation of IL-1 β -induced aortic valve interstitial cells through glucocorticoid receptor and inhibition of NF- κ B pathway. Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Aug;152:114-23.

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

Tallant EA, Lu X, Weiss RB, Chappell MC, Ferrario C M. Bovine Aortic Endothelial Cells Contain an Angiotensin-(1-7) Receptor. Hypertension. 1997; 29:388-93.

Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, Huang DM. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. Arch Oral Biol. 2011 Oct;56(10):1064-72.

Tao L, Qiu Y, Fu X, Lin R, Lei C, Wang J, Lei B. Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene aceturate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF- κ B pathways in human retinal pigment epithelium. J Neuroinflammation. 2016 Feb;(1):13-35.

Tao X, Fan J, Kao G, Zhang X, Su L, Yin Y, Zrenner B. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced signaling associated with activation of a tyrosine phosphatase in Sprague-Dawley rats cardiac fibroblasts. Biol. Cell. 2014;106: 182-92.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem. 2000; 275: 18138-144.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 33238-243.

Trask AJ, Ferrario CM. Angiotensin 1-7: Pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardio Vasc Reviews*. 2007; 25 (2):162-74.

Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2007;86:249-54.

Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van der Reijden WA, Van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*. 2002 Nov;29(11):1023-8.

Wang J, Liu R, Qi H, Wang Y, Cui L, Wen Y, Li H, Yin C. The ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis protects against pancreatic cell damage in cell culture. *Pancreas*. 2015 Mar;44(2):266-72.

Wang K, Hu X, Du C, Tu S, Zhang F, Xie X. Angiotensin-(1-7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression. *Mol Cell Biochem*. 2012 Jun;365(1-2):19-27.

Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991 a nonpeptide mimic of the effects of Angiotensin - (1-7) on the endothelium. *Hypertension*. 2002; 40: 847-52.

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 angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994;18(1):21-53.

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.

Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*. 2006 Feb 24;311(5764):1141-6.

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

Zhang J, Fu M, Myles D, Zhu X, Du J, Cao X, Chen YE. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Lett.* 2002 Jun 19;521(1-3):180-4.

Zhang Y, Kou J, Wang C, Wang K. Role of reactive oxygen species in angiotensin II: induced receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression in mouse osteoblastic cells. *Mol Cell Biochem.* 2014;396: 249–55.

Zhimin Feng, Weinberg Aaron. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000* 2006;40:50-76.

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