UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANA PAULA AKASHI

**Efeitos do ramipril sobre a doença periodontal
induzida experimentalmente em ratos**

BAURU
2016

ANA PAULA AKASHI

Efeitos do ramipril sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Versão Corrigida

BAURU
2016

Akashi, Ana Paula
Ak17e Efeitos do ramipril sobre a doença periodontal
 induzida experimentalmente em ratos / Ana Paula
 Akashi. – Bauru, 2016.
 129p. : il. ; 30 cm.

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

 Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa
em Animais da FOB-USP: projeto de
pesquisa aprovado em 20 de dezembro
de 2011.

Protocolo nº: 042/2011

DADOS CURRICULARES

Ana Paula Akashi

1 de Agosto de 1972

Nascimento Bariri- SP

Filha de Takao Akashi e Maria Aparecida Venturini Akashi

1990-1993

Curso de Graduação em Fisioterapia pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

2001-2002

Curso de Especialização em Fisiologia do Exercício, pela Universidade Federal de São Carlos.

2002-2005

Curso de Pós-Graduação em Biologia Oral, nível Mestrado, pela Universidade do Sagrado Coração.

2008-2009

Curso de Especialização em Reabilitação em Neurologia, pela Universidade Federal de São Paulo.

2011-Atual

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família em especial aos meus pais, Takao e Maria Aparecida por toda dedicação, amor e esforço na minha formação, ao meu marido Fabio por me compreender e apoiar em todos os momentos, à minha irmã Ana Eliza por estar sempre ao meu lado e jamais duvidar da minha capacidade.

Dedico às minhas filhas Ana Clara e Ana Luísa, para que um dia possam entender a importância de estudar sempre.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me dar saúde e colocar pessoas especiais em meu caminho.

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, palavras não conseguirão definir toda a minha gratidão pela confiança, dedicação, paciência e incentivo em todos esses anos. Admiro o profissional competente e a pessoa extraordinária que tive o prazer de conhecer. Serei sempre grata a você.

Ao **Thiago José Dionísio** pela disponibilidade e paciência em ensinar e auxiliar durante todas as fases do desenvolvimento deste estudo. Por me atender prontamente em todos os momentos e conseguir passar tanto conhecimento. Você foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos amigos do doutorado **Rita de Cássia Fabris Stábile, Paulo Frederico e Lilian Gabrielle Gobbo** pelo incentivo, companheirismo e agradável convivência durante toda a jornada acadêmica.

À querida amiga **Gabriela Pereira Souza** por ser minha parceira em muitos momentos, pelo auxílio e apoio durante todas as fases desta pesquisa.

À Banca examinadora: **Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães, Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso** pela participação e complementação do trabalho.

Às professoras **Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriana e Dra. Thaís Marchini Oliveira**, pela disponibilidade em ajudar e pelo enorme auxílio na indução da doença periodontal.

À **Profa. Dra. Camila Rodini** pela contribuição durante a análise histológica deste trabalho.

Às técnicas de histologia **Patricia Germino e Daniele Ceolin** pela disponibilidade em ajudar no desenvolvimento desta pesquisa.

À **Dra. Elza Torres**, pelo incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao professor da Farmacologia **Prof. Dr. Flavio Augusto Cardoso de Faria**.

Às funcionárias do Departamento de Ciências Biológicas, **Vera Lúcia Rufino, Dalva Ribeiro de Oliveira e Viviane Aparecida Parisi** pela prontidão em ajudar e competência para resolver qualquer intercorrência.

À funcionária **Maristela Petenuci Ferrari** do Comitê de Ética em Pesquisa, pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, **Luiz, Erasmo e Elias**, sempre muito prestativos e colaborativos.

Aos meus pais **Takao Akashi e Maria Aparecida Venturini Akashi** que formaram essa base sólida que é a nossa família e proporcionaram toda a educação para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço por estarem sempre presentes, pelo amor, força e incentivo em todas as etapas da minha vida. Vocês são muito importantes e responsáveis por todas as minhas conquistas.

Ao meu marido **Fabio Pizol** pelo amor, compreensão, incentivo e por me transmitir calma. Você me ensinou muitas coisas e me deu os bens mais preciosos, que são as nossas filhas e a nossa família. Obrigada por estar comigo em todos os momentos!

Às minhas irmãs e amigas **Ana Maria, Ana Eliza e Ana Julia** por todos os momentos que passamos juntas, pelas experiências, pelas conversas, risadas e sobretudo pela cumplicidade. Sou grata por ter vocês sempre ao meu lado.

À minha tia **Marina Venturini** por ajudar na nossa criação e estar sempre presente.

Aos meus cunhados **Gervasio e Agnaldo**, ao meu sobrinho e afilhado **Pedro Henrique** por fazerem parte desta grande família.

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Marco Antonio Zago.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, que respeito e admiro, na pessoa de sua excelentíssima Diretora Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À **Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, na pessoa do Presidente Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, na pessoa do Chefe de Departamento Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet.

À todos os **colegas, professores e funcionários** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, que de alguma forma, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A doença periodontal (DP) corresponde a um grupo de doenças inflamatórias que acomete as estruturas periodontais de proteção e de suporte e pode levar à perda dentária. A etiologia está relacionada à placa dentobacteriana que leva à produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias importantes na destruição tecidual. A angiotensina (Ang) II também pode contribuir para a inflamação e destruição tecidual no periodonto agindo como mediador chave. A utilização de drogas que atuem na cascata do sistema renina-angiotensina (SRA) poderia interferir no estado de saúde ou inflamação do tecido mole, na perda óssea alveolar e na expressão gênica dos componentes do SRA e mediadores inflamatórios. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar se o ramipril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), altera a progressão da DP induzida experimentalmente em ratos. Foi utilizado o modelo de indução da DP por colocação de ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito de ratos. Os grupos com 10 animais cada, foram divididos em tratados com ramipril (via gavagem 10 mg/kg/dia) ou água (veículo) durante 14 e 21 dias e o grupo Sham submetido à indução fictícia da DP. Outros quatro grupos foram submetidos ao pré-tratamento com ramipril durante os períodos de 7 e 14 dias e após a indução da DP e tratados por 14 ou 21 dias. As metodologias de avaliação foram: extração de RNA total, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR), análises histológica e da perda óssea alveolar. Os dados foram analisados por meio de gráficos e os resultados foram submetidos à análise unidirecional de variância (ANOVA) e representaram médias e respectivos desvios-padrão. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o ramipril foi capaz de reduzir a progressão da perda óssea no grupo tratado por 21 dias (DP-21d-Rami), entretanto houve aumento do processo inflamatório, além de alteração da expressão de RNAm de ECA-2 e do receptor Mas, alguns mediadores do processo inflamatório, como COX2 e VEGF, e os receptores VEGF-R1 e VEGF-R2.

Palavras-chave: Doença periodontal, sistema renina-angiotensina, ramipril, inflamação.

ABSTRACT

Periodontitis (PD) consists of a group of inflammatory diseases that affect the protecting and supporting periodontal structures, and may lead to tooth loss. The etiology is related to the dentobacterial plaque that produces a large amount of proinflammatory cytokines with an important action on tissue destruction. Angiotensin (Ang) II may also contribute to the inflammation and periodontal tissue destruction by acting as a key mediator. The use of drugs that affect the cascade of the renin-angiotensin system (RAS) might interfere with the healthy or inflammatory status of the soft tissue, alveolar bone loss and gene expression of RAS components and inflammatory mediators. Therefore, the aim of this work was to evaluate whether ramipril, an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, alters the progression of experimentally-induced PD in rats. The model of PD induction by placement of a silk ligature around the right lower first molar was used. Groups with 10 animals each were divided into ramipril-treated (10 mg/kg/day, via gavage), water (vehicle) and the sham surgery group (sham) for 7 or 14 days previously to PD induction and after this period the drug was administered for 14 and 21 days. The techniques employed were: total RNA extraction, reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) as well as histological and alveolar bone loss analyses. Data were analyzed by means of graphs and the results submitted to unidirectional analysis of variance (ANOVA) and represent the means with respective standard deviations. Differences between groups were considered statistically significant when $p < 0.05$. Based on the results obtained in this work, it was concluded that ramipril was able to reduce the progression of alveolar bone loss in the group treated for 21 days (DP-21d-Rami), however, there was an increase in the inflammatory process, besides altering the expression of ACE-2, Mas receptor and some inflammatory mediators such as COX2, VEGF and the receptors VEGF-R1 and VEGF-R2.

Keywords: Periodontal disease, renin-angiotensin system, ramipril, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Visão atual do Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	26
Figura 2	- Aplicação de anestésico na veia peniana (eutanásia).	63
Figura 3	- Hemimandíbula de um dos animais, comparada ao tamanho da lâmina do bisturi.	63
Figura 4	- Demonstração da área de perda óssea demarcada em uma hemimandíbula de rato tratado com ramipril. Imagem analisada no software DinoCapture 2.0 versão 1.4.5.B. A área total A, refere-se a quantidade de osso perdido, análise realizada na face lingual do animal.	63
Figura 5	- Escore 1 - Infiltrado inflamatório ausente, epitélio juncional normal, cimento preservado ou com áreas eventuais de reabsorção cervical, crista óssea alveolar preservada.....	68
Figura 6	- Escore 2 - Infiltrado inflamatório leve, epitélio juncional normal, cimento parcialmente destruído, crista óssea alveolar com reabsorção mínima.	68
Figura 7	- Escore 3 - Infiltrado inflamatório moderado, epitélio juncional apical, cimento parcialmente destruído, crista óssea alveolar com reabsorção moderada.	68
Figura 8	- Escore 4 - Infiltrado inflamatório intenso, epitélio juncional apical, cimento gravemente destruído, crista óssea alveolar com reabsorção intensa, ocasionalmente com sequestro ósseo.....	68
Figura 9	- Perdas ósseas em mm ² dos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H ₂ O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H ₂ O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a	

indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). * vs Sham. # DP-21d H₂O vs 14d-DP-14d Rami e DP-21d Rami.73

Figura 10 - Escore dos parâmetros inflamatórios dos animais do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). * DP-14d Rami e DP-21d Rami vs. 14-DP-21d Rami.74

Figura 11 - Expressão de RNAm para angiotensinogênio relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).75

Figura 12 - Expressão de RNAm para ECA relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP- 14d Rami (tratados

com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....76

Figura 13 - Expressão de RNAm para o receptor AT_{1a} relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....76

Figura 14 - Expressão de RNAm para o receptor AT₂ relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....77

Figura 15 - Expressão de RNAm para ECA-2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-

14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

* vs Sham.....78

Figura 16 - Expressão de RNAm para receptor MAS relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

DP-14d H₂O vs DP-21d Rami.....78

Figura 17 - Expressão de RNAm para IL-1 β relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....79

Figura 18 - Expressão de RNAm para IL-6 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do

grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....80

Figura 19 - Expressão de RNAm para TNF relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....80

Figura 20 - Expressão de RNAm para COX-2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).
DP-14d H₂O vs DP-21d Rami.....81

Figura 21 - Expressão de RNAm para VEGF relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....81

Figura 22 - Expressão de RNAm para VEGF-R1 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).
*vs Sham.....82

Figura 23 - Expressão de RNAm para VEGF-R2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com

ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).	
*vs Sham. # DP-14d H ₂ O vs 14d-DP-21d Rami.	83

Figura 24 - Expressão de RNAm para RANK relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H ₂ O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H ₂ O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....	83
---	----

Figura 25 - Expressão de RNAm para RANK L relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H ₂ O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H ₂ O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....	84
---	----

Figura 26 - Expressão de RNAm para OPG relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H ₂ O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H ₂ O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami	
---	--

(tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).....	84
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa.....	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AGT	Angiotensinogênio
Ang	Angiotensina 1
Ang II	Angiotensina 2
Ang III	Angiotensina 3
Ang IV	Angiotensina 4
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang 1-9	Angiotensina 1-9
Ang 1-12	Angiotensina 1-12
Ang 2-8	Angiotensina 2-8
Ang 3-8	Angiotensina 3-8
ARB	Angiotensin Receptor Blockers (Antagonistas/bloqueadores dos receptores de Angiotensina)
AT ₁	Receptor de Angiotensina tipo 1
AT _{1a}	Receptor de Angiotensina tipo 1a
AT _{1b}	Receptor de Angiotensina tipo 1b
AT ₂	Receptor de Angiotensina tipo 2
AT ₄	Receptor de Angiotensina tipo 4
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COX-2	Ciclooxygenase-2
CPP	Carboxil peptidases
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EDFH	Fator derivado da hiperpolarização do endotélio
ET-1	Endotelina-1
<i>et al.</i>	e colaboradores
ET-1	Endotelina-1
EUROPA	European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril in Stable Coronary Artery Disease
FOB/USP	Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
HOPE	Heart Outcomes Prevention Evaluation
IL (1/6/8/10)	Interleucina (1/ 6/ 8/ 10)
IL-1 β	Interleucina 1-beta
Imunoglobulina	(Ig)

IAM	Infarto agudo do miocárdio
INF- γ	Interferon gamma
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LP	Ligamento Periodontal
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatrativa de Monócitos-1
mg	miligrama(s)
min	minutos
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
NAP-1	Peptídeo ativador de neutrófilos-1
NEP	Peptidase neutra (neprilina)
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
nm	nanometro
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
μ g	microgramas
μ l	microlitros
OPG	Osteoprotegerina
PAI-1	Fator ativador de plasminogênio-1
PEP	Prolil peptidase
PGI ₂	Prostaciclina PGI ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear kapa B
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Transcrição Reversa)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase)
SHAM	Grupo controle
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (Fator de Necrose Tumoral-alfa)
TGF- β	Fator de crescimento transformador - β
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)

VEGF-R1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i> (Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular)
VEGF-R2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> (Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular)
7d-DP-14d Rami	7 dias de pré-tratamento com ramipril, indução da doença periodontal, 14 dias de pós-tratamento com ramipril
7d-DP-21d Rami	7 dias de pré-tratamento com ramipril, indução da doença periodontal, 21 dias de pós-tratamento com ramipril
DPd-14 H ₂ O	Indução da doença periodontal, 14 dias de pós-tratamento com veículo
DP-21 H ₂ O	Indução da doença periodontal, 21 dias de pós-tratamento com veículo
DP-14d Rami	Indução da doença periodontal, 14 dias de pós-tratamento com ramipril
DP-21d Rami	Indução da doença periodontal, 21 dias de pós-tratamento com ramipril
14d-DP-14d Rami	14 dias de pré-tratamento com ramipril, indução da doença periodontal, 14 dias de pós-tratamento com ramipril
14d-DP-21d Rami	14 dias de pré-tratamento com ramipril, indução da doença periodontal, 21 dias de pós-tratamento com ramipril

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	23
1.1	Sistema Renina-Angiotensina (SRA) Clássico.....	25
1.1.1	Angiotensinogênio	27
1.1.2	Renina	27
1.1.3	Angiotensina I.....	27
1.1.4	Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	28
1.1.5	Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2)	28
1.1.6	Angiotensina II.....	29
1.1.7	Angiotensina 1-9.....	31
1.1.8	Angiotensina 1-7.....	31
1.1.9	Angiotensina 1-12.....	32
1.1.10	Angiotensina III (Ang 2-8).....	32
1.1.11	Angiotensina IV (Ang 3-8)	32
1.1.12	Receptores de Angiotensinas.....	32
1.2	Sistema Renina-Angiotensina local	35
1.3	Drogas que afetam o SRA	37
1.4	Doença periodontal (DP)	39
1.5	Ang II e Inflamação.....	42
1.6	Citocinas.....	44
1.6.1	Interleucina-1 beta (IL-1 β)	44
1.6.2	Interleucina-6 (IL-6)	45
1.6.3	Fator de Necrose tumoral- α (TNF- α)	46
1.6.4	Ciclooxigenase-2 (COX-2)	46
1.6.5	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	47
1.6.6	Receptor 1 e 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R1 e VEGF-R2).....	48
1.6.7	Receptor Ativador de NF-kB (RANK)	48
1.6.8	Ligante do Receptor Ativador de NF-kB (RANKL).....	48
1.6.9	Osteoprotegerina (OPG)	49

2	PROPOSIÇÃO	51
3	MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1	Indução experimental de doença periodontal (DP) por meio da colocação de ligadura.....	57
3.2	Animais e caracterização dos grupos experimentais.....	58
3.3	Obtenção de espécimes para os diferentes experimentos.....	62
3.4	Extração do RNA.....	64
3.5	Análise da Quantidade e Qualidade do RNA total.....	65
3.6	Tratamento do RNA total com DNase e transcrição reversa	65
3.7	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa (qPCR).....	66
3.8	Análise histológica.....	67
3.9	Cálculos e análises estatísticas.....	69
4	RESULTADOS.....	71
4.1	Perda óssea	73
4.2	Escore dos parâmetros inflamatórios	73
4.3	Análise da expressão de RNAm no tecido gengival	74
4.3.1	Expressão de RNAm para os componentes do Sistema Renina-Angiotensina (RAS).....	74
4.3.1.1	Angiotensinogênio.....	74
4.3.1.2	Renina	75
4.3.1.3	Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	75
4.3.1.4	Receptor de Angiotensina Tipo _{1a} (AT _{1a})	76
4.3.1.5	Receptor de Angiotensina Tipo _{1b} (AT _{1b})	77
4.3.1.6	Receptor de Angiotensina Tipo ₂ (AT ₂).....	77
4.3.1.7	Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2)	77
4.3.1.8	Receptor Mas	78
4.3.2	Expressão de RNAm para citocinas	79
4.3.2.1	Interleucina-1 beta (IL-1 β)	79
4.3.2.2	Interleucina-6 (IL-6)	79
4.3.2.3	Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α)	80
4.3.2.4	Ciclooxigenase-2 (COX-2).....	81
4.3.2.5	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	81

4.3.2.6	Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R1)	82
4.3.2.7	Receptor 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R2)	82
4.3.2.8	Receptor Ativador de NF- κ B - (RANK)	83
4.3.2.9	Ligante do Receptor Ativador de NF- κ B (RANKL)	84
4.3.2.10	Osteoprotegerina (OPG)	84
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO	127

*1 INTRODUÇÃO E
SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA*

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) clássico é um sistema fisiológico endócrino envolvido no controle da pressão arterial pela liberação de Angiotensina II (Ang II) que consiste em uma cascata enzimático-hormonal responsável por regular a função cardiovascular, adrenal e renal, controlando o balanço eletrolítico (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; LEUNG, 2004; CAREY; SIRAGY, 2003; PEACH, 1977).

A renina uma enzima produzida pelos rins age sobre o angiotensinogênio plasmático, produzido pelo fígado, formando o decapeptídeo Ang I (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰), que é clivado na ligação Phe⁸-His⁹ pela enzima conversora de Ang I (ECA), presente em abundância no endotélio pulmonar, liberando o octapeptídeo ativo Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸). Quando a Ang II interage com os receptores AT₁ é capaz de provocar: vasoconstrição, hipertensão, diminuição do fluxo renal e aumento da atividade noradrenérgica periférica, além de regular os mecanismos de fibrose, crescimento e migração celular. Ao interagir com os receptores AT₂, os efeitos são antagônicos aos do AT₁ como vasodilatação, inibição da proliferação e crescimento celular e modulação da matriz extracelular (SKRBIC; IGIC, 2009).

Atualmente o SRA é considerado o maior sistema fisiológico envolvido na regulação da função vascular e na lesão vascular patológica devido à disfunção endotelial, remodelação e inflamação vascular. Entre os fatores envolvidos na lesão vascular está a Ang II que pode ser convertida em peptídeos menores como Ang III, Ang IV, Ang (1-7) que são funcionais e regulam o tônus e a estrutura vascular (MONTEZANO *et al.*, 2014).

Existem peptídeos truncados formados na cascata do SRA que foram identificados como biologicamente ativos como o Ang 2-8 (heptapeptídeo, também chamado de Ang III) que possui ações similares às da Ang II, enquanto o hexapeptídeo Ang 3-8 (Ang IV) exerce suas ações via receptores regulados por insulina e a Ang 1-7 tem ações opostas às da Ang II. Existem ainda, vias alternativas

1.1.1 Angiotensinogênio

O angiotensinogênio humano, uma enzima alfa 2 globulina de 452 aminoácidos, é sintetizado no fígado. O RNAm que codifica essa proteína também é abundante no tecido gorduroso, determinadas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e rins (CAMPBELL; HABENER, 1986; CASSIS; SAVE; PEACH, 1988). Vários hormônios como glicocorticóides, hormônio tireoidiano e a própria Ang II (BEM-ARI; GARRISON, 1988) estimulam a síntese de angiotensinogênio.

1.1.2 Renina

A enzima renina é uma glicoproteína de 340 aminoácidos, sintetizada e armazenada sob a forma inativa denominada pró-renina nas células justaglomerulares dos rins, que são células musculares lisas modificadas localizadas nas paredes das arteríolas aferentes (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Com a queda de pressão arterial, reações intrínsecas nos próprios rins fazem com que muitas moléculas de pró-renina sejam clivadas liberando a renina. A secreção da renina é controlada por três mecanismos: dois agem predominantemente nos rins (mecanismo de mácula densa e mecanismo barorreceptor infra-renal) e o terceiro que age por meio do Sistema Nervoso Central (mecanismo do receptor β -adrenérgico). O mecanismo denominado de *feedback* negativo de alça curta deriva do fato de que elevações da secreção de renina aumentam a formação de Ang II, que, interagindo com seus receptores renais, inibe a liberação de renina nas células justaglomerulares. O mecanismo de *feedback* negativo de alça longa consiste na inibição da liberação da renina devido ao aumento da pressão arterial induzido pela Ang II (JACKSON; GARRISON, 1995).

1.1.3 Angiotensina I

A angiotensina I é um peptídeo de 10 aminoácidos (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) desprovido de propriedades vasoconstritoras para produzir alterações funcionais significativas na função circulatória; serve como

substrato para vias enzimáticas formadoras de Ang II (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

1.1.4 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A enzima conversora de angiotensina humana, uma metaloprotease de ligação de membrana, contém 1.278 resíduos de aminoácidos e possui 2 domínios homólogos, cada um com um local catalítico e com uma região de ligação do zinco (SOUBRIER *et al.*, 1988; BERSTEIN *et al.*, 1989). A ECA é encontrada abundantemente no endotélio dos vasos pulmonares (RYAN *et al.*, 1975, RYAN *et al.*, 1976) e também no plasma e em diversos tecidos orgânicos como: endotélio vascular (CALDWELL *et al.*, 1976; RYAN *et al.*, 1976), cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais (HALL *et al.*, 1976; ERDÖS; SKIDGEL, 1986; SCHULZ *et al.*, 1988).

1.1.5 Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2)

A ECA-2 tem sido descrita como uma metaloprotease dependente de zinco com atividade de carboxipeptidase que está envolvida na geração de peptídeos de angiotensina alternativos, como Ang I em Ang 1-9, que tem como principal função a conversão de Ang II em Ang 1-7. A expressão de genes da ECA-2 é descrita no sistema cardiovascular, no córtex renal, medula, em alguns tecidos do trato gastrointestinal e nos testículos (RAIZADA; FERREIRA, 2007).

A ECA-2 está presente em macrófagos, células endoteliais e musculares lisas (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006) e tem sido sugerida como um importante regulador das funções cardíacas e do desenvolvimento (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

A redução de ECA-2 com consequente diminuição na produção de Ang 1-7 está associada à lesão vascular na hipertensão, diabetes, aterosclerose e doenças renais (FRAGA-SILVA *et al.*, 2014), já o aumento da ECA-2 pode ter valor terapêutico por promover a vasodilatação (IMAI, 2010).

1.1.6 Angiotensina II

A Ang II é considerada o principal peptídeo efector do SRA (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). Além do seu efeito vasoconstritor e estimulador sobre a secreção de aldosterona, possui ação inotrópica e cronotrópica positiva sobre o coração (PEACH, 1977). Em adição aos seus efeitos no sistema cardiovascular, tem-se demonstrado que a Ang II está envolvida em outras funções, tais como mitogênese de fibroblastos da pele, síntese de DNA por células do ligamento periodontal, regulação da formação óssea, crescimento celular, apoptose, geração de espécies reativas ao oxigênio, secreção hormonal, ações pró-fibrogenéticas, tônus vascular e indução da liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) em fibroblastos gengivais humanos (NICKENIG *et al.*, 1997; LUNDERGAN *et al.*, 1999; HIRUMA *et al.*, 1997; HAGIWARA *et al.*, 1998; LAMPARTER *et al.*, 1998; LEUNG, 2004; SEGAWA, 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Estudos com animais e humanos mostram que a Ang II tem respostas pró-inflamatórias nas artérias, coração e rim por meio da regulação da expressão de citocinas, quimiocinas, espécies reativas ao oxigênio (ROS), moléculas de adesão e ativação de genes da inflamação (PACURARI *et al.*, 2014).

A Ang II aumenta a produção de hormônios vasoativos e fatores de crescimento, os quais podem promover a proliferação celular, síntese de proteínas e fibroses contribuindo para o processo de crescimento na remodelação arterial em células vasculares (FELDT *et al.*, 2008).

Vários estudos têm mostrado a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II. As primeiras descrições de uma via alternativa de formação da Ang II foram relatadas por Boucher; Asselin; Genest (1974) nas glândulas submandibulares de rato, por Cornish; Joyner; Gilmore (1979) na bochecha de hamster e por Trachte e Lefer (1979) no músculo papilar cardíaco de gato. Cornish; Joyner; Gilmore (1979) também observaram a formação de Ang II de forma independente da ECA na artéria coronária de hamster. Okunishi; Miyazaki; Toda (1984) identificaram uma enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina na artéria mesentérica de cão, a qual também é insensível aos inibidores da ECA (como por exemplo, o captopril). Urata *et al.* (1990a) demonstraram *in vitro* um duplo

caminho para a formação de Ang II em homogenatos de coração humano. Esses autores observaram que aproximadamente 80% da formação total de Ang II estava associada à presença de uma serino-protease até então desconhecida, enquanto a atividade formadora de Ang II dependente da ação da ECA, era responsável apenas, por aproximadamente 11% da formação total de Ang II. Esta serino-protease cardíaca foi posteriormente purificada e identificada como um novo membro da família quimase e desde então, denominada de quimase do coração humano (URATA *et al.*, 1990b).

Embora várias enzimas, incluindo a tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1), tonina, catepsina G (EC 3.4.21.20), calicreína (3.4.21.34) e quimase I de rato (EC 3.4.21.39), possam produzir Ang II *in vitro* por meio da clivagem da ligação Phe⁸-His⁹ da Ang I (URATA; NISHIMURA; GANTEN, 1995; HOLLENBERG; FISHER; PRICE, 1998), a atividade fisiológica das mesmas no sistema cardiovascular *in vivo* não está esclarecida. Além disso, algumas destas enzimas, como por exemplo, tripsina e quimotripsina, também degradam a Ang II (LE TRONG; NEURATH; WOODBURY, 1987), deixando em dúvida a função destas enzimas na formação deste hormônio. Interessante notar que, enquanto as quimases humana e de hamster clivam eficientemente Ang I, formando Ang II (TAKAI *et al.*, 1996; URATA *et al.*, 1990b), a quimase I de rato apresenta principalmente atividade de degradação da Ang II (LE TRONG; NEURATH; WOODBURY, 1987). Dados gerados a partir da suscetibilidade dessas diferentes enzimas a inibidores de proteases permitiram a classificação das enzimas formadoras de Ang II em três categorias (ARAKAWA, 1996). A primeira categoria corresponde à metalodipeptidil carboxipeptidase conhecida como ECA. A segunda categoria inclui um grupo de serino-proteases sensíveis à quimostatina, tais como a enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina da artéria mesentérica de cão (OKUNISHI *et al.*, 1987), quimase (URATA *et al.*, 1990b; TAKAI *et al.*, 1996), catepsina G (TONNESEN *et al.*, 1982) e elastase-2 (PAULA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2002a; SANTOS *et al.*, 2002b; SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004). A terceira categoria agrupa as serino-proteases sensíveis à aprotinina, destacando-se a calicreína (MARUTA; ARAKAWA, 1983), tripsina (ARAKAWA, 1996) e tonina (BOUCHER; ASSELIN; GENEST, 1974).

1.1.7 Angiotensina 1-9

A angiotensina 1-9 (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹) é conhecida como um peptídeo com pouca atividade biológica (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006). Acredita-se que seja inativa até que a ECA a clive e libere Ang 1-7. Subseqüentemente a Ang 1-7 é inativada pela liberação do dipeptídeo C-terminal para formar Ang 1-5 (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵) (CHEN *et al.*, 2005).

Por ser provavelmente o principal produto do metabolismo de Ang I em plaquetas, a Ang 1-9 pode estar envolvida na regulação da função plaquetária (KRAMKOWSKI, MOGIELNICKI, BUCZKO, 2006). Em concentrações micromolares, Ang 1-9 inibe a ECA (SNYDER; WINTROUB, 1986; MARCIC *et al.*, 1999) e potencializa a ação da bradicinina em seu receptor B₂ (MARCIC *et al.*, 1999). Em coração humano, a catepsina A (CATA) gera derivados Ang 1-9 e Ang 1-7 a partir de Ang I (JACKMAN *et al.*, 2002).

1.1.8 Angiotensina 1-7

A angiotensina 1-7 é um componente bioativo do SRA, um heptapeptídeo (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) amino-terminal formado diretamente da Ang I pela hidrólise de endopeptidases neutras e a partir da Ang II por prolil endopeptidases, prolil carboxipeptidases ou ECA-2 (SANTOS *et al.*, 1988; SANTOS; COMPAGNOLE-SANTOS, 1994). Algumas destas enzimas como a neprilisina estão envolvidas no metabolismo do fator natriurético atrial e bradicinina. A ECA também tem sido envolvida no metabolismo e quebra da Ang 1-7, sugerindo uma interação entre diferentes sistemas de peptídeos cardiovasculares (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

A Ang 1-7 está presente na circulação e nos tecidos vinculada à proteína G acoplada ao receptor Mas. É considerada atualmente como um sistema contra-regulatório ao da Ang II e seu receptor AT1 por mediar a vasodilatação, inibição do crescimento, respostas anti-inflamatórias, efeitos anti-trombóticos e anti-arritmogênicos (SANTOS; FRÉZARD; FERREIRA, 2005; MONTEZANO *et al.*, 2014), além de exercer atividade anti-nociceptiva (COSTA *et al.*, 2014).

A Ang 1-7 possui efeito vasoprotetor demonstrado em modelos experimentais, na prevenção da calcificação vascular pela diminuição de proteínas osteogênicas (SUI *et al.*, 2013). Pode ainda 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-eclâmpsia (TRASK; FERRARIO, 2007).

1.1.9 Angiotensina 1-12

A Ang 1-12 é um substrato endógeno da produção de peptídeos de Angiotensina biologicamente ativo por um mecanismo não dependente da renina que relaciona-se à função cardíaca como conversora de Ang II, demonstrando efeito vasoconstritor (AHMAD *et al.*, 2014).

1.1.10 Angiotensina III (Ang 2-8)

A degradação da Ang II pelas aminopeptidases forma o heptapeptídeo Ang III que atua nos receptores AT₁ e AT₂ ou ainda em receptores específicos, que ainda não têm função muito bem determinada (CAMPBELL, 2001). A Ang III pode ser convertida pela aminopeptidase em um hexapeptídeo bioativo, a Ang IV (CHAI *et al.*, 2000).

1.1.11 Angiotensina IV (Ang 3-8)

Pouco se sabe sobre as funções da Ang IV, tem sido sugerido que ela pode estar envolvida no processo cognitivo e aquisição da memória, já que ela se liga especificamente aos receptores AT₄ localizados predominantemente no cérebro e exerce suas ações via receptores regulados por insulina (ALBISTON *et al.*, 2001; PEDERSON *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 1999).

1.1.12 Receptores de Angiotensinas

A Ang II possui interações com diferentes tipos de receptores, conhecidos como AT₁ e AT₂. No músculo esquelético vascular, o receptor AT₁, membro da

família de receptores ligados à proteína G, possui 7 regiões transmembrânicas com 359 aminoácidos, é mediador da angiogênese e possui propriedades vasoconstritoras, enquanto que o receptor AT₂ tem 363 aminoácidos, possuindo propriedades vasodilatadoras e inibindo a angiogênese. Os subtipos de receptores AT₁ e AT₂ apresentam estruturas genômicas e localizações diferentes, e também expressão e regulação específicas para cada tecido. Em quimiorreceptores do corpo da carótida, o receptor AT₁ pode mediar a liberação de cálcio intracelular. As funções da Ang II, tais como constrição vascular, proliferação celular e liberação da aldosterona são conhecidas por serem mediadas via receptores AT₁. Em ratos e camundongos, dois subtipos de receptores AT₁ foram clonados e caracterizados: AT_{1a} e AT_{1b} (LINDERMAN; GREENE, 2001; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; LAM; LEUNG, 2002; HIRASAWA *et al.*, 2002; INAGAMI *et al.*, 1994; de GASPARO; SIRAGY, 1999; de GASPARO *et al.*, 2000; SPETH; THOMPSON; JOHNS, 1995; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

A expressão de AT₁ está aumentada na aterosclerose e sua inibição assim como o aumento de AT₂, possuem efeito protetor no desenvolvimento da aterosclerose e desordens metabólicas (FUKUDA *et al.*, 2010).

O receptor AT₂ possui grande potencial na proteção e regeneração no SRA por suas propriedades anti-inflamatórias, anti-fibrose e anti-apoptose, apesar de sua expressão ser escassa nos tecidos saudáveis, apresenta-se elevado no dano tecidual, vascular, lesão neuronal, infarto do miocárdio e isquemia cerebral (NAMSOLLECK *et al.*, 2014). Sua ação anti-inflamatória está relacionada à inibição da atividade do NF-κB (Fator Nuclear Kappa B), redução de TNF-α (Fator de Necrose Tumoral-α) e de IL-6 (Interleucina-6) (ROMPE *et al.*, 2010), redução de IL-2 (Interleucina-2) e INF-γ (interferon gamma) (CURATO *et al.*, 2010), aumento da IL-10 (Interleucina 10) (DHANDE; ALI; HUSSAIN, 2013), na redução do estresse oxidativo relacionado à isquemia no acidente vascular cerebral (McCARTHY *et al.*, 2009) e redução da expressão de NADPH-oxidase com consequente diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PENDERGRASS *et al.*, 2009; DANDAPAT *et al.*, 2008).

O efeito cardioprotetor do AT₂ segundo Kaschina *et al.* (2008) no infarto do miocárdio melhora a função cardíaca com diminuição da cicatriz e a longo prazo

melhora a rigidez cardíaca. Em um modelo de hipertensão induzida por hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo, a administração de um agonista de AT₂, o C21, teve ação antifibrótica e anti-inflamatória (REHMAN *et al.*, 2012).

O receptor AT₂ contribuiu na remodelação cardíaca nos casos de fibrose cardíaca devido ao envelhecimento durante o tratamento com ARB (bloqueadores dos receptores de Angiotensina), com melhora na rigidez arterial, espessura e elasticidade da aorta (JONES; BLACK; WIDDOP, 2012; PAULIS *et al.*, 2012). Na hipertensão pulmonar, o tratamento com C21 (agonista de AT₂) retardou a progressão da doença pulmonar e cardíaca diminuindo as citocinas pró-inflamatórias (BRUCE *et al.*, 2012).

Após indução de acidente vascular cerebral (AVC) em ratos, a estimulação do AT₂ e a administração de C21, houve redução da mortalidade pós-AVC, déficits motores e apoptose neuronal sugerindo efeito neuroprotetor (LEE *et al.*, 2012).

Há evidências de um receptor de angiotensina adicional denominado AT₄, que interage com um peptídeo de Ang truncado, a Ang IV ou Ang 3-8 (Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸). AT₄ foi originalmente definido como específico, com local de ligação de alta afinidade para Ang IV (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006) e parece estar relacionado à consolidação da memória, fluxo sangüíneo, reabsorção tubular renal e proliferação celular (WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

O receptor Mas é sugerido como um receptor funcional de angiotensinas (JACKSON *et al.*, 1988), ele interage com a Ang 1-7 ou outros peptídeos de angiotensina, o que sugere alguma relevância funcional *in vivo* (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). É caracterizado como um receptor acoplado à proteína G, originalmente descrito como um fator envolvido na tumorigênese (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). Apresenta efeitos semelhantes aos do receptor AT₂, porém contrários aos efeitos associados ao receptor AT₁. Tem sido demonstrado com relação ao receptor Mas, assim como o receptor AT₂, efeitos anti-inflamatórios, antifibrose, antiapoptose e regeneração neuronal (NAMSOLLECK *et al.*, 2014)

1.2 Sistema Renina-Angiotensina local

Estudos comprovam a existência de um SRA local, agindo não apenas como um sistema endócrino, mas também exercendo funções parácrinas e autócrinas (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Existem dados de sistemas locais capazes de gerar angiotensinas de forma independente do SRA circulante em vários tecidos, tais como cérebro, coração, rim, gônadas, ovários, osso, músculo esquelético, tecido adiposo, pâncreas, corpo da carótida, cordão umbilical e polpa dental (CAMPBELL, 1987; PHILLIPS; SPEAKMAN; KIMURA, 1993; OBERMÜLLER *et al.*, 2004; LEUNG, 2004, GOKER *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007).

Componentes do SRA têm sido identificados no olho, que podem ter importância fisiológica na manutenção da pressão ocular e patologicamente, relação com as retinopatias associadas à hipertensão e diabetes (WILKINSON-BERKA; AGROTIS; DELIYANTI, 2012).

Artigos demonstram evidências acerca da existência de alguns componentes do SRA no tecido gengival e em fibroblastos gengivais de diferentes espécies (OHUCHI *et al.*, 2002; SEGAWA *et al.*, 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI *et al.*, 2004).

Ohuchi *et al.* (2002) sugeriram, por meio da utilização de drogas antagonistas de receptores de Ang II, que a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaio estimulada pela fenitoína e nifedipina é mediada indiretamente por receptores AT₁ presentes em fibroblastos gengivais em cultura. Os autores também sugeriram que a Ang II é sintetizada localmente nestas células.

Segawa *et al.* (2003) investigaram o efeito da Ang II sobre a produção de PGE₂ em fibroblastos gengivais humanos. Um antagonista de receptores AT₁, mas não um antagonista de receptores AT₂, foi capaz de inibir a produção de PGE₂ estimulada pela Ang II administrada exogenamente.

Berggreen e Heyeraas (2003) sugeriram, com a utilização de drogas antagonistas de receptores AT₁, a existência destes receptores 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 cultivadas ocorre via receptores AT₁. Adicionalmente, em complemento aos achados farmacológicos, os autores demonstraram a presença dos receptores AT₁ e AT₂ nestas células com auxílio da técnica de Western Blot.

Os receptores AT₁ e AT₂ foram encontrados na polpa dental por Souza *et al.* (2007), demonstrando a participação destes receptores de Ang II na pulpite, pelo envolvimento tanto no estabelecimento como na modulação das alterações pulpare.

Experimentos do nosso laboratório mostraram que no tecido gengival de ratos existe a expressão de RNAm para todos os componentes do SRA, presença da renina (experimentos de imunohistoquímica) e atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em homogenatos de tecido gengival (SANTOS *et al.*, 2009).

Adicionalmente, outro estudo do nosso laboratório confirmou a existência de RNAm para alguns destes componentes do SRA (receptores AT_{1a}, AT_{1b} e AT₂ e ECA) mostrando ainda indícios da presença da enzima Elastase-2 no mesmo tecido. Demonstrou ainda, por meio de imunohistoquímica, a presença de algumas destas proteínas (AT₁, AT₂, Renina e ECA) também no tecido gengival de ratos (LIMA *et al.*, 2011).

A presença de alguns destes componentes também já foi observada em tecido gengival humano, em um trabalho publicado por Nakamura *et al.* (2011) que demonstraram, por meio de PCR convencional e Western Blot, a presença de RNAm e da proteína do receptor de Ang II do tipo 1 (AT₁). Além disso, foi possível observar a expressão de RNAm para ECA, Catepsina D e Angiotensinogênio em fibroblastos de gengiva humana.

O aumento na ativação do SRA tecidual tem sido demonstrado em doenças cardiovasculares como a aterosclerose, infarto do miocárdio, falência cardíaca, diabetes e doença renal independentemente da elevação da pressão arterial (KUMAR; SINGH; BAKER, 2009).

Portanto, acredita-se que mudanças no SRA teciduais específicos possam estar associadas à fisiologia ou fisiopatologia dos respectivos tecidos e órgãos onde se encontram, permitindo assim que a ação de drogas que atuem nesses sistemas locais possam auxiliar no tratamento de várias patologias (LEUNG, 2004; ZIMMERMAN; DUNHAM, 1997).

1.3 Drogas que afetam o SRA

A alteração da atividade do SRA é utilizada para o tratamento da hipertensão arterial e falência cardíaca. Várias drogas são empregadas na diminuição da pressão arterial, incluindo os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), antagonistas/bloqueadores dos receptores da Ang II (ARB) e inibidores da renina (NUSSBERGER *et al.*, 2008).

Os inibidores da ECA melhoram a função endotelial bloqueando a degradação de bradicinina e inibindo a produção de endotelina-1 (ET-1) e Ang II pelo endotélio. A manutenção do nível de bradicinina possui efeito sobre o endotélio aumentando o nível de prostaciclina e do fator derivado da hiperpolarização do endotélio (EDHF), os quais induzem a vasodilatação e inibem a proliferação de células lisas vasculares e a adesão plaquetária (BRUNNER *et al.*, 2005). Possuem efeito anti-hipertensivo devido às suas propriedades anti-inflamatórias (VERMA *et al.*, 2009; SCHIEFFER, 2004), por aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) vascular, efeito antioxidante e diminuição do risco cardiovascular por interferir na aterogênese reduzindo a morbidade e mortalidade em diversos tipos de pacientes (WATANABE *et al.*, 2005, DZAU, 2005; YUSUF *et al.*, 2000)

Esses medicamentos parecem ter efeito similar às estatinas, com ação anti-inflamatória associada aos benefícios relacionados à redução de biomarcadores inflamatórios como a proteína C-reativa (KOVACS *et al.*, 2005).

Existem vários inibidores da ECA como captopril, enalapril, lisinopril, entre eles, o quinapril, ramipril e o perindopril são lipofílicos e possuem grande afinidade com essa enzima encontrada em abundância, e por isso podem promover maior supressão da atividade da ECA tecidual (PORRITT *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2008).

Estudos mostram que o ramipril melhora a função endotelial em várias regiões vasculares com atenuação da geração de trombina e diminuição na concentração de fibrinogênio reduzindo complicações aterotrombóticas, com possível efeito cardioprotetor (EKHOLM *et al.*, 2002).

Segundo Tian *et al.* (2014), a utilização de ramipril em ratos com diabetes tipo 2 reduziu a resistência à insulina, com ação antioxidante no endotélio vascular e redução acentuada de espécies reativas de oxigênio (ROS) agindo na prevenção da inflamação e aterogênese vascular, podendo até mesmo impedir os processos fisiopatológicos que contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas.

Skowasch *et al.* (2006) referiram diminuição na agregação plaquetária durante terapia com ramipril, captopril e enalapril. Entretanto, não houve redução significativa durante a utilização do enalapril, sugerindo que a afinidade do inibidor da ECA tecidual não afeta os efeitos antitrombóticos, já que o ramipril é um inibidor da ECA tecidual e o captopril e enalapril são inibidores não-teciduals. O efeito de redução da agregação plaquetária depende de maior tempo de tratamento e dosagem.

Perindopril no estudo EUROPA (European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril in Stable Coronary Artery Disease) e ramipril no estudo HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation), foram os únicos inibidores da ECA que mostraram associação terapêutica com a prevenção de eventos cardiovasculares e menor mortalidade cardiovascular em pacientes com alto risco para doença coronária cardíaca. Adicionalmente, o tratamento com ramipril em um estudo placebo randomizado controlado, pós infarto agudo do miocárdio (IAM), reduziu todas as causas de mortalidade em 27% e os eventos cardiovasculares adversos em 19%. Em pacientes com ou alto risco para doença coronariana, a única

evidência preventiva de agentes terapêuticos inibidores da ECA refere-se ao perindopril e ramipril (FOX, 2003; YUSUF *et al.*, 2000).

A inibição da ECA (ramipril) e o bloqueio do receptor AT₁ (telmisartan) no processo de remodelação durante a sobrecarga de pressão cardíaca mostrou efeitos benéficos similares a respeito da hipertrofia cardíaca, fibrose, ciclo de células e capilarização, diferenças entre as duas abordagens terapêuticas foram pequenas, mas a terapia combinada não teve efeito adicional benéfico (MULLER *et al.*, 2013).

O ramipril foi capaz de diminuir a pressão sanguínea, inibir a ECA cardíaca e diminuir a hipertrofia cardíaca em ratos com nefrotomia subtotal (VELKOSKA *et al.*, 2011).

A maioria das evidências recentes sugerem que o estresse oxidativo, inflamação e hipertensão estão inter-relacionados e se influenciam mutuamente na patologia de eventos cardiovasculares (PACURARI *et al.*, 2014).

Desse modo, os medicamentos que interferem no SRA têm se mostrado importantes para o tratamento da hipertensão, problemas cardíacos e outras patologias, pois os benefícios clínicos relacionados a esses medicamentos podem influenciar o processo inflamatório como o gerado pela doença periodontal.

1.4 Doença periodontal (DP)

A doença periodontal compreende um grupo de lesões que afetam os tecidos periodontais de proteção (gengiva), chamada de gengivite e de suporte (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), denominada de periodontite que pode levar à perda dentária (FLEMMIG, 1999).

É um dos processos patológicos mais comum que afeta a dentição humana, sendo que a periodontite generalizada afeta de 5% a 15% de qualquer população (OLIVER, 1998; BURT, 2005).

A periodontite é uma doença inflamatória crônica e a principal causa é a placa dentobacteriana que se acumula sobre a superfície dentária, sobre o nível e abaixo

da margem da gengiva. Esse acúmulo causa inflamação e fibrose da gengiva, levando à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar. Com a progressão da doença, os tecidos moles separam-se da superfície dentária resultando na lesão característica da periodontite crônica – a bolsa periodontal (WILSON, 1995; VAN DYKE; SERHAN, 2003).

Nesse processo, as interações entre patógenos microbianos e vários sistemas na resposta do hospedeiro desempenham um papel crítico no desenvolvimento e progressão da DP via liberação de vários mediadores inflamatórios e imunológicos (PAGE, 1991; EBERSOLE, 2003).

As bactérias periodontopatogênicas, como a *Porphyromonas gingivalis* possuem muitos materiais bioativos que induzem as respostas do hospedeiro, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (OFFENBACHER, 1996). Dentre estes materiais, o lipopolissacarídeo (LPS) que é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é capaz de desencadear intensa imuno-estimulação e atividade inflamatória (DARVEU *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2008).

Os LPS dos periodontopatógenos têm se mostrado capazes de estimular várias células do hospedeiro a produzir citocinas, incluindo os macrófagos e fibroblastos (KENT *et al.*, 1998). Os fibroblastos, que são as células residentes mais abundantes nos tecidos moles periodontais (gengiva e ligamento periodontal), possuem receptores e moléculas responsáveis pelo reconhecimento da invasão bacteriana, podendo assim responder com a ativação de cascatas intracelulares necessárias para a produção de citocinas e participar dos mecanismos de defesa do tecido conjuntivo (LINDHE *et al.*, 2005).

Algumas citocinas produzidas pelos fibroblastos do tecido periodontal em resposta ao reconhecimento bacteriano, contribuem para o desenvolvimento da reabsorção óssea induzida pelo processo inflamatório da DP, devido à capacidade de estimular o recrutamento, a diferenciação, ou a fusão de células precursoras na formação de osteoclastos, podendo ainda aumentar a sua sobrevivência (SILVA *et al.*, 2007).

Diversos estudos mostram as citocinas como importantes mediadores associados à patogênese da periodontite (GARRINSON *et al.*, 1988, LINDEMANN *et*

al., 1988; AGARWAL *et al.*, 1995). Vários mediadores inflamatórios como a interleucina -1 (IL-1), Interleucina -6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), prostaglandinas e Metaloproteinases de Matriz (MMPs) estão envolvidos no desenvolvimento da periodontite afetando as atividades dos leucócitos, osteoblastos e osteoclastos promovendo a remodelação do tecido sistêmico e no local (NOH *et al.*, 2013).

A IL-8 conhecida como peptídeo ativador de neutrófilos-1 (NAP-1) por sua capacidade de atrair neutrófilos, é importante no início e na manutenção da inflamação podendo contribuir para a destruição dos tecidos periodontais (BASTOS *et al.*, 2009; BAGGIOLINI *et al.*, 1989).

Os níveis elevados de interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6 no fluido gengival têm sido relacionados com periodontites que não respondem ao tratamento (FLEMMIG, 1999). A IL-2 é essencial para o crescimento e diferenciação de células T (LIAO *et al.*, 2011).

Segundo estudos, o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) possui papel importante na perda óssea e quando foi inibido experimentalmente em ratos desencadeou a diminuição da osteoclastogênese (GRAVES *et al.*, 2001; GARLET *et al.*, 2007)

O Fator de Necrose Tumoral mostrou ser capaz de estimular a expressão de RNAm para outras citocinas inflamatórias como: IL-1 β , INF- γ e RANKL e quando ocorre a sua inibição, acontece a redução da inflamação e perda óssea (GASPERSIC *et al.*, 2003; GARLET *et al.*, 2007).

O mediador inflamatório TGF- β 1 possui ação pró-fibrótica induzindo a síntese da matriz e poderia ser um marcador da progressão da doença periodontal. Os níveis de TGF- β 1 estavam aumentados no soro, saliva e fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite, sendo o patógeno periodontal *P. gingivalis* relacionado às alterações na resposta imune incluindo a expressão de TGF- β 1 (KHALAF; LÖNN; BENGTSSON, 2014).

Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório utilizando alguns medicamentos capazes de interferir no SRA demonstram a presença de

componentes do SRA no tecido gengival de ratos, além da influência dessas drogas no início e na progressão da DP induzida experimentalmente em ratos. Quando um inibidor da enzima Renina (Alisquireno) foi administrado aos animais, na dose de 30mg/Kg/dia, por 7 e 14 dias, a perda óssea observada foi significativamente menor do que aquela quantificada nos animais que não receberam a droga. Os mesmos resultados foram encontrados quando um antagonista do receptor AT₁ (Losartan) foi administrado na dose de 50 mg/Kg/dia pelo mesmo período. No entanto, a ação sistêmica de uma droga inibidora da ECA (Enalapril), na dose administrada de 10mg/Kg/dia, não foi capaz de reverter o processo de perda óssea induzida por ligadura, demonstrando uma possível ação de vias alternativas à da ECA para a formação de Ang II (LIMA, 2011).

Já no estudo com o inibidor da ECA captopril, o medicamento não foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar em todos os grupos de ratos com indução de doença periodontal (SOUZA, 2014).

Estudos de meta-análise de todo o mundo mostram relações estatisticamente significantes entre doenças cardiovasculares e doenças periodontais, associadas também com diabetes e síndrome metabólica (RETTORI *et al.*, 2014). As doenças cardiovasculares como a aterosclerose, que possui forte relação com os componentes do SRA, apresentam entre os fatores de risco o aumento do colesterol (LDL) e do fator de necrose tumoral em indivíduos com periodontite (RAMIREZ-TORTOSA *et al.*, 2010).

Embora existam poucos trabalhos relacionando o início e a progressão da DP com o SRA, a atividade biológica de seus componentes sugere potencial para contribuir com a patogênese das periodontites (GURKAN *et al.*, 2009).

1.5 Ang II e inflamação

Assim como a estimulação bacteriana leva à produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias importantes na destruição tecidual observada na DP, a Ang II também pode contribuir para a inflamação e destruição tecidual no periodonto, atuando como mediador chave, semelhante às características de uma citocina nestes processos (MARCHESI *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2003).

A Ang II possui ações relacionadas a todos os passos da sequência de eventos que envolvem o processo inflamatório, como aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias, ativação da infiltração de células imunocompetentes e influência sobre a inflamação induzida imunologicamente (GURKAN *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2003).

Estaria envolvida também em várias modalidades sensoriais, inclusive a nocicepção (COSTA *et al.*, 2014).

Estimula ainda a síntese de eucosanóides (Leucotrieno C4, Prostaglandina E₂ (PGE₂, Prostaciclina (PGI₂)) que são mediadores da permeabilidade vascular, juntamente com as prostaglandinas (PGs) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é um potente indutor da mitogênese endotelial e também atua na permeabilidade vascular (ICHIKAWI; HARRIS, 1991; SCHLONDORFF *et al.*, 1985; SCHRAMEK *et al.*, 1995).

A Ang II pode contribuir para o recrutamento de células inflamatórias nas etapas de marginação celular, transmigração e migração porque é capaz de regular a produção de moléculas de adesão e de quimiocinas por células residentes, como L-selectina, P-selectina, entre outras (GIBBS *et al.*, 2001; PRASAD *et al.*, 2001; TAYEH; SCICLI, 1998).

Promove a inflamação por indução de NF-kB mediado por genes pró-inflamatórios. O fator de transcrição NF-kB regula a expressão de muitos genes inflamatórios incluindo TNF- α e IL-6 e sua ativação está associada ao choque séptico (HAGIWARA *et al.*, 2009).

A Ang II participa ainda do processo de reparo do tecido, segundo alguns estudos, o bloqueio do SRA diminui a fibrose e o crescimento celular, bem como a produção de proteínas da matriz extracelular, sendo que nestas funções seus efeitos parecem ser indiretos, mediados pela ação de fatores de crescimento e outras citocinas e fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (EGIDO, 1996; MEZZANO *et al.*, 2001; WOLF; NEILSON, 1993).

Portanto, pode-se dizer que a Ang II é de natureza pró-inflamatória, pois modula a expressão de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, moléculas de adesão, endotelina-1, prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e cicloxigenase-2 importantes em todas as etapas do processo de iniciação e manutenção da inflamação e por este motivo pode estar relacionada ao desenvolvimento de uma patologia de caráter inflamatório como a doença periodontal (CHENG *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2003; PHILLIPS; KAGIYAMA, 2002).

1.6 Citocinas

Vários mediadores inflamatórios como a IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , prostaglandinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidos na doença periodontal (FENTOGLU *et al.*, 2011). Segundo Sugawara *et al.* (2002) para compreensão da periodontite pode-se avaliar os fibroblastos gengivais que expressam grandes quantidades de mediadores inflamatórios como TNF e IL-6. Noh *et al.* (2014) referem que a expressão dos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α podem ser parâmetros clínicos de inflamação gengival e periodontite. Dentre as várias citocinas relacionadas à DP, algumas merecem destaque como as interleucinas, IL-1 e IL-6, que quando inibidas diminuem a inflamação, bem como a perda de tecido conjuntivo e perda óssea (BAKER *et al.*, 1999; DELIMA *et al.*, 2002).

1.6.1 Interleucina-1 beta (IL-1 β)

A IL-1 β é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (FERRERO-MILIANI *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que monócitos e macrófagos são ativados como resposta a um processo inflamatório e com isso liberam várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β e também o fator de necrose tumoral (TNF- α), que por sua vez, irão atuar em novos processos destrutivos diretos (GIANNOBILE, 2008).

As funções biológicas da IL-1 β são muito similares às do TNF- α , ela induz a liberação de mediadores secundários, do mesmo modo que um número de citocinas inflamatórias (como IL-6), metabólitos do ácido araquidônico e óxido nítrico (MONTÓN *et al.*, 1998).

1.6.2 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é produzida por diferentes tipos de células como monócitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, queratinócitos, células T e B e está relacionada às respostas imunes e reações inflamatórias (OKADA; MURAKAMI, 1998). Entre suas várias atividades biológicas, realiza a diferenciação dos linfócitos B, a proliferação de linfócitos T e a estimulação de Imunoglobulina (Ig) por linfócitos B e ainda induz a reabsorção óssea sozinha ou em ação com outros agentes de reabsorção óssea (HIRANO *et al.*, 1990).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que regula muitas funções celulares como as respostas imunes, incluindo a proliferação, apoptose e reatividade vascular, com importante papel na fase aguda da inflamação e modulação de doenças cardiovasculares como a hipertensão (PACURARI *et al.*, 2014; STEINER *et al.*, 2009; KWAN *et al.*, 2004; MACKIEWICZ, 1997). Ratos diabéticos tipo I possuem grande quantidade circulante de IL-6 com aumento da contratilidade vascular (TANG *et al.*, 2011). De acordo com Bartold; Haynes (1991) a IL-6 mostrou-se elevada em tecidos gengivais inflamados em comparação aos tecidos saudáveis avaliados por imunohistoquímica (BARTOLD; HAYNES, 1991).

Além disso, a IL-6 pode promover indiretamente a osteoclastogênese, por meio do aumento da liberação de RANKL derivada de osteoblastos e de células sinoviais (TAGA; KISHIMOTO, 1997). A partir de estudos extensivos, tanto sobre IL-1 como IL-6, durante as últimas duas décadas, sugere-se a participação destas citocinas em lesões inflamatórias, especialmente a periodontite (SIPE, 1995; MACKIEWICZ, 1997; TAGA; KISHIMOTO, 1997; KWAN *et al.*, 2004; BARKSBY *et al.*, 2007).

1.6.3 Fator de Necrose tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina que atua na necrose hemorrágica do tecido e possui efeito antitumoral (BOSTRÖM; LINDER; BERGSTRÖM, 1998).

É um mediador primário da inflamação segregado por monócitos e macrófagos em resposta aos componentes bacterianos orais como lipopolissacarídes (LPS), coordena a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e a produção e ativação de outras citocinas como IL-6, collagenases, Prostaglandina E₂ (PGE₂), quimiocinas, Proteína quimioatrativa de Monócitos-1 (MCP-1) e moléculas de adesão em todos os tipos de células, além de fatores relacionados à reabsorção óssea (BASTOS *et al.*, 2009; OKADA; MURAKAMI, 1998; STRIETER *et al.*, 1993).

O TNF- α é considerada uma das principais citocinas envolvidas na patogênese da doença periodontal e quando seu nível aumenta no tecido, pode ocorrer a liberação da collagenase de fibroblastos gengivais humanos (OKADA; MURAKAMI, 1998), levando à destruição de colágeno e reabsorção óssea (BOSTRÖM; LINDER; BERGSTRÖM, 1998).

Possui importante papel na regulação da osteoclastogênese devido a sua ação na expressão de RANK-L (CHEN *et al.*, 2014).

Níveis elevados de TNF- α circulante representam maior risco de doenças cardiovasculares e a inflamação desempenha papel importante na remodelação vascular (PACURARI *et al.*, 2014).

1.6.4 Ciclooxigenase-2 (COX-2)

A COX-2 é uma enzima responsável pela formação de prostaglandina E₂ a partir do ácido araquidônico que regula a angiogênese. É expressa constitutivamente no corno dorsal do cordão espinhal e está presente no processo inflamatório. Evidências sugerem que a expressão da COX-2 pode facilitar a transmissão de impulsos nociceptivos (RAMER; BRUNE, 2001).

Estudos mostraram que a COX-2 pode ter um papel fisiológico nas funções renais. A COX-2 constitutiva foi mostrada em rins de ratos, particularmente na

mácula densa e tornou-se aumentada em ratos com dietas com restrição de sódio. A COX-2 endotelial confere vasoproteção e ação antiaterogênica graças a seu maior produto, a prostaciclina (PGI₂), que é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (RAMER; BRUNE, 2001).

Um estudo de nosso laboratório mostrou que a inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), por meio do tratamento com drogas inibidoras seletivas para essa enzima (meloxicam a 3 mg/Kg/dia), levou à diminuição significativa da expressão do RNAm para o VEGF, bem como a diminuição da perda óssea gerada pela DP induzida experimentalmente em ratos. Pode-se observar um aumento da expressão da proteína VEGF nos tecidos dos ratos que apresentavam maior grau de doença instalada, sugerindo sua relação com a progressão da DP. Entretanto, não foi investigada a sua correlação com a presença dos componentes do SRA (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

1.6.5 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é uma macromolécula importante na inflamação por atuar na angiogênese e tem sido implicada na progressão da periodontite (FERRARA; GERBER; LECOURTER, 2003).

A Ang II regula a síntese de VEGF pela NAD(P)H oxidase que serve como fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FELIERS *et al.*, 2005). A Ang II atua através de dois tipos de receptores, AT₁ e AT₂ e a atividade pró-angiogênico de Ang II é mediada pelo receptor AT₁, em parte, por meio da ativação da via relacionada com o VEGF (TAMARAT *et al.*, 2002).

É uma das substâncias mais potentes para induzir o crescimento de células endoteliais e aumentar a permeabilidade vascular (FERRARA, 1999; FERRARA, 2005).

O VEGF induz a proliferação de células endoteliais, promove a migração de células e inibe a apoptose, bem como a permeabilidade dos vasos sanguíneos, desempenhando, assim, um papel central na regulação da angiogênese (FERRARA; GERBER; LECOURTER, 2003).

A expressão do VEGF é desencadeada em resposta à hipóxia e por uma variedade de citocinas e quando se apresenta desregulada contribui para a etiologia de várias doenças que são caracterizadas por angiogênese anormal (FERRARA, 2002), como a angiogênese da retina e crescimento vascular patológico na retinopatia diabética (OTANI *et al.*, 1998; MORAVSKI *et al.*, 2000).

1.6.6. Receptor 1 e 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R1 e VEGF-R2)

Os receptores VEGF-R1 e VEGF-R2 realizam a ativação e sinalização da cascata que promove a migração, proliferação e sobrevivência das células endoteliais (BAUMGARTEM *et al.*, 2015). O VEGF e seus receptores (VEGF-R1 e VEGF-R2) são peças-chaves na angiogênese e também estão envolvidos em certos processo patológicos, como a periodontite e a perda óssea ocasionada durante a progressão da doença (VIRTEJ *et al.*, 2013).

1.6.7 Receptor Ativador de NF- κ B (RANK)

O RANK é uma proteína de membrana do tipo I expressa na superfície de osteoclastos e em células dendríticas facilitando a sinalização imunológica e está associada ao processo de reabsorção óssea. RANK e OPG são as moléculas-chave na regulação da diferenciação dos osteoclastos (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; NARDUCCI *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2009; ARIKAN *et al.*, 2009). Quando o RANKL liga-se ao RANK, induz diferenciação das células precursoras de osteoclastos (LACEY *et al.*, 1998) e reabsorção óssea periodontal.

1.6.8 Ligante do Receptor Ativador de NF- κ B (RANKL)

O RANKL é um polipeptídeo de 314 aminoácidos, membro da família das citocinas (TNF), desempenha importante papel na reabsorção óssea por ser um regulador central para o desenvolvimento e função dos osteoclastos. O nível de RNA-m de RANKL está aumentado em processos inflamatórios como da DP. As citocinas IL-1 β e TNF- α podem regular a expressão de RANKL em células periodontais e aumentar a formação de osteoclastos (CHEN *et al.*, 2014).

A reabsorção óssea periodontal é induzida por osteoclastos e o equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea pelos osteoblastos determina o nível de massa óssea. O RANKL, seu receptor RANK e a osteoprotegerina (OPG) são moléculas chaves na regulação da diferenciação, recrutamento e função dos osteoclastos (NAGASAWA *et al.*, 2007).

O RANKL é expresso na membrana de células do estroma da medula óssea (osteoblastos imaturos) e pode ser liberado da superfície celular por clivagem proteolítica e ligar-se ao RANK ou à OPG. A OPG, por sua vez, é formada pelos osteoblastos quando estes reagem com citocinas (ANDERSON *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997; YASUDA *et al.*, 1998; IKEDA *et al.*, 2004; VALLÉS *et al.*, 2008).

A razão existente entre RANKL e OPG é considerada um parâmetro importante para o controle da reabsorção óssea, com papel principal no controle dos graus de reabsorção ou densidade óssea uma vez que a OPG bloqueia a interação entre RANK e RANKL. É considerado um estimulador poderoso da reabsorção óssea ao ligar-se ao RANK, com função oposta ao se ligar à OPG (MONOV *et al.*, 2006; BAUD'HUIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; NARDUCCI; NICOLIN 2009; DUARTE *et al.*, 2009; ARIKAN *et al.*, 2009; MINE *et al.*, 2010).

1.6.9 Osteoprotegerina (OPG)

A osteoprotegerina (OPG) é um antagonista aos efeitos de RANKL, atuando, portanto, na preservação da integridade óssea. Sendo assim, a expressão de RANKL e OPG é determinante para regular a atividade osteoclástica e reabsorção óssea (UDAGAWA *et al.*, 1999; SUDA *et al.*, 1999, SAGLAM *et al.*, 2015).

O equilíbrio entre os níveis de RANKL e OPG regula a destruição do tecido ósseo que pode ocorrer na periodontite. Tem sido observado que os locais de reabsorção óssea ativa apresentam um padrão diferencial de expressão de RANKL/OPG quando em comparação aos locais onde a reabsorção óssea é mínima ou está ausente. Nas regiões com maior expressão de RANKL (RANKL>OPG) as lesões são progressivas, enquanto que nos locais onde a expressão de RANKL e OPG é semelhante (RANKL=OPG), ou a OPG é prevalente (RANKL<OPG), as lesões são potencialmente estáveis (MENEZES *et al.*, 2008)

Também tem sido sugerido que as citocinas e hormônios relacionados ao processo de reabsorção óssea e antirreabsorção convergem no sistema RANKL-OPG. RANKL e OPG, então, atuam como um sistema efetor para regulação da formação osteoclástica, com a OPG atuando como protetora do esqueleto na reabsorção óssea excessiva (UDAGAWA *et al.*, 1999; SUDA *et al.*, 1999).

Conforme descrito anteriormente, a doença periodontal (DP) é uma afecção que envolve a participação de células residentes, células estruturais e mediadores inflamatórios. Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que no tecido gengival de rato existe a expressão de RNAm para todos os componentes do SRA, presença da renina (experimentos de imunohistoquímica) e atividade da ECA (em homogenatos de tecido gengival). Ainda, que a utilização de drogas que atuem na cascata do SRA poderia interferir no estado de saúde ou inflamação do tecido mole, na perda óssea alveolar e na expressão gênica de componentes do SRA e mediadores inflamatórios. O ramipril, um inibidor da ECA, apresenta-se como melhor alternativa entre esses medicamentos devido a sua lipossolubilidade.

Desta forma, justifica-se a realização de investigações adicionais para que aspectos relativos à inibição da ECA e sua possível correlação com a progressão da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos sejam esclarecidos. Os resultados poderão trazer contribuições importantes para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na DP, os quais poderão ser úteis nas terapias preventivas e curativas dessa doença.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

- Verificar o efeito do ramipril, medicamento inibidor da ECA, sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos.

Objetivos específicos:

- Verificar a perda óssea alveolar em ratos submetidos à indução experimental da DP, tratados com ramipril.
 - Avaliar microscopicamente o estado inflamatório dos tecidos periodontais em ratos submetidos à indução de doença periodontal (DP), tratados com ramipril.
 - Avaliar se existe aumento dos componentes do SRA e mediadores inflamatórios no modelo de DP induzida experimentalmente em ratos tratados com ramipril.
-
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, o projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da FOB/USP (Processo nº 042/2011).

Foram utilizados 90 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com massa inicial entre 200 e 300 gramas (aproximadamente 60 dias) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), local onde foram mantidos durante todo o protocolo experimental.

A pesquisa da doença periodontal requer o uso de animais de laboratório para o teste de agentes terapêuticos e para a avaliação da segurança e eficiência de técnicas, drogas e ferramentas para a melhora da cicatrização. Pelo fato da maior parte das doenças periodontais resultarem em destruição irreversível do tecido conjuntivo e do osso alveolar, a indução da periodontite em humanos não representa um procedimento ético. Portanto, os modelos animais, nos quais a doença periodontal é induzida experimentalmente, continuarão indispensáveis para o estudo desta patologia (MADDEN; CATON, 1994).

Neste trabalho foi utilizado um modelo animal de indução de doença periodontal em ratos, conforme publicações do nosso grupo (RODINI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

A escolha dos ratos deve-se à facilidade de manuseio, ao custo relativamente baixo e ao ciclo de vida breve que possibilita a observação das alterações da idade em um curto período de tempo. O estabelecimento da função oclusal nesta espécie ocorre aos 25 dias para o primeiro molar e na idade aproximada de 60 dias, os ratos já estão na fase adulta e possuem o ponto de contato entre molares bem estabelecido (MADDEN; CATON, 1994).

O elevado metabolismo dos ratos acelera a cinética de evolução da doença, o que acaba permitindo um estudo longitudinal em menor tempo, ao se comparar com outras espécies. A indução experimental da doença, pelo próprio procedimento de

colocação da ligadura, pode desencadear reações inflamatórias e o período de 14 dias é suficiente para uma avaliação dos fenômenos inflamatórios em resposta aos biofilmes microbianos aderidos à superfície dentária, simulando a doença, devido à resposta imune inata (RODINI, 2005).

Durante o crescimento deste animal ocorre naturalmente a remodelação óssea, um processo fisiológico e natural, devido a atrição interproximal dos molares (WEINBERG; BRAL, 1999). Devido à essa reabsorção fisiológica, o presente estudo consistiu também na análise comparativa da perda óssea alveolar com os dados obtidos para os animais tratados com veículo (água) ou ramipril após indução experimental, comparados aos animais não submetidos a nenhum tipo de tratamento como os ratos do grupo Sham.

3.2 Indução experimental de doença periodontal (DP) por meio da colocação de ligadura e caracterização dos grupos experimentais

Para o procedimento de indução experimental da doença periodontal, os animais foram anestesiados utilizando Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina (Dopalen – 50 mg/Kg e Anasedan – 10 mg/kg, via intramuscular na perna direita (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Após a anestesia, foram posicionados para a aplicação do protocolo de colocação da ligadura utilizando um fio de seda preta 3.0 (Ethicon), o qual foi colocado na região cervical do primeiro molar inferior direito, tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival. O fio foi colocado na região subgengival e o nó posicionado na região mesial (GYÖRFI *et al.*, 1994; LOHINAI *et al.*, 1998).

Após o processo de indução, todos os ratos foram mantidos no biotério central da FOB/USP com ciclos de claro/escuro de 12 horas cada, temperatura de 22°C e umidade de 65%, alimentados com ração normal marca Labina (*Presence*) e água *ad libitum*.

O medicamento Ramipril ou veículo (água) foi administrado diariamente, sempre no mesmo horário (entre 7:00hs e 8:30hs da manhã) durante períodos pré-estabelecidos conforme os grupos experimentais. As doses da droga foram

ajustadas de acordo com a pesagem semanal dos animais, a fim de assegurar a dosagem correta, de acordo com a massa.

Os grupos de animais foram divididos conforme descrição abaixo:

Grupo Sham: Grupo controle, no qual 10 animais foram submetidos à indução da doença periodontal fictícia (Grupo Sham). Durante esse processo os animais foram anestesiados, passando pela mesma situação de estresse semelhante aos animais submetidos à indução. Foi passado um fio de sutura ao redor do seu primeiro molar e em seguida retirado. Todos receberam água (veículo) e após 14 dias 5 animais foram eutanasiados, enquanto os outros 5 animais, após 21 dias.

Grupo DP-14d H₂O: No primeiro dia, 10 animais foram submetidos ao procedimento de indução de doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon) ao redor do primeiro molar inferior direito, o qual permaneceu durante 14 dias. Durante esse período, receberam 10 mg/kg/dia de água (veículo) por gavagem. No décimo quinto dia todos foram eutanasiados.

Grupo DP-14d Rami: No primeiro dia, 10 animais foram submetidos ao procedimento de indução de doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon) ao redor do primeiro molar inferior direito, o qual permaneceu durante 14 dias. Durante esse período foram submetidos ao tratamento diário com 10 mg/kg/dia de ramipril via gavagem. No décimo quinto dia todos foram eutanasiados.

Grupo 7d-DP-14d Rami: Pré-tratamento em 10 ratos que receberam 10 mg/kg/dia de ramipril (inibidor da ECA) por gavagem durante 7 dias. Após esse período, os animais foram submetidos à indução da doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon) no primeiro molar inferior direito e continuaram o tratamento com ramipril por 14 dias. No décimo quinto dia após a indução da DP todos foram eutanasiados.

Grupo 14d-DP-14d Rami: Pré-tratamento em 10 ratos com 10 mg/kg/dia de ramipril (inibidor da ECA) por gavagem durante 14 dias. Após esse período, os animais foram submetidos à indução da doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon), continuaram com o tratamento com o ramipril por 14 dias. No décimo quinto dia após a indução da DP todos foram eutanasiados.

Grupo DP-21d H₂O: No primeiro dia, 10 animais foram submetidos ao procedimento de indução de doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon) ao redor do primeiro molar inferior direito que foi mantido por 21 dias. Durante esse período, receberam 10 mg/kg/dia de água (veículo) via gavagem. No vigésimo segundo dia todos foram eutanasiados.

Grupo DP-21d Rami: No primeiro dia, 10 animais foram submetidos ao procedimento de indução de doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon) ao redor do primeiro molar inferior direito que foi mantido por 21 dias. Durante esse período, foram submetidos ao tratamento diário com 10 mg/kg/dia de ramipril via gavagem. No vigésimo segundo dia todos foram eutanasiados.

Grupo 7d-DP-21d Rami: Pré-tratamento em 10 ratos com 10 mg/kg/dia de ramipril (inibidor da ECA) por gavagem durante 7 dias. Após esse período, os animais foram submetidos à indução da doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon), continuaram o tratamento com o ramipril por 21 dias. No vigésimo segundo dia após a indução da DP todos foram eutanasiados.

Grupo 14d-DP-21d Rami: Pré-tratamento em 10 ratos com 10 mg/kg/dia de ramipril (inibidor da ECA) por gavagem durante 14 dias. Após esse período, os animais foram submetidos à indução da doença periodontal por ligadura com fio de sutura 3.0 (Ethicon), continuaram com o tratamento com o Ramipril por mais 21 dias. No vigésimo segundo dia após a indução da DP todos foram eutanasiados.

3.3 Obtenção de espécimes para os diferentes experimentos

Os animais tratados com ramipril, com o veículo e os do grupo Sham foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico aplicado na veia peniana, que foi escolhida por ser de fácil acesso e com rápida eficácia no procedimento de eutanásia (**Figura 2**).

Após a eutanásia, as hemimandíbulas foram removidas (**Figura 3**) e o material destinado à análise de perda óssea teve o tecido mole (gengiva) descolado e armazenado em solução de RNAlater (Ambion®, CA, Estados Unidos) e congelado a -80°C para análises de expressão gênica por PCR.

As hemimandíbulas sem o tecido gengival foram devidamente higienizadas com auxílio de água oxigenada 10 volumes e em seguida coradas com azul de metileno 0,1% (LIMA, 2011; MACIEL, 2013). Feito isso, as hemimandíbulas foram fotografadas e a área de perda óssea foi analisada com o uso do software DinoCapture 2.0 versão 1.4.5.B, criado pela Anmo Electronics Corporation (Taipei City, Taiwan, China). (**Figura 4**)

Figura 2. Aplicação de anestésico na veia peniana (Eutanásia).

Figura 3. Hemimandíbula de um dos animais, comparada ao tamanho da lâmina do bisturi.

Figura 4. Demonstração da área de perda óssea demarcada em uma hemimandíbula de rato tratado com ramipril. Imagem analisada no software DinoCapture 2.0 versão 1.4.5.B. A área total A, refere-se a quantidade de osso perdido, análise realizada na face lingual do animal.

Após eutanásia dos animais, as hemimandíbulas foram removidas e separadas da seguinte forma: cinco hemimandíbulas preservadas (tecido ósseo com gengiva), cinco hemimandíbulas que tiveram a gengiva separada (armazenada em um tubo Eppendorf) e o tecido ósseo (tubo Falcon).

As hemimandíbulas preservadas foram utilizadas na confecção de lâminas para a análise histológica, o tecido mole foi submetido a extração de RNA e o tecido ósseo usado a análise de perda óssea.

O procedimento de análise da área de perda óssea foi realizado por 4 examinadores, reduzindo ao máximo o erro por meio da média das áreas obtidas entre os analisadores. Foi utilizada a análise de perda óssea por área, pois em trabalhos prévios que utilizaram a análise por volume, observou-se uma maior chance de erro entre os examinadores, sendo portanto a análise por área mais precisa.

Dos animais eutanasiados, foi removida apenas a hemimandíbula do lado que foi induzido, o outro lado foi descartado. Em estudos posteriores a hemimandíbula contralateral que foi descartada, poderá ser utilizada como comparação com a hemimandíbula com DP induzida, para que se possam verificar as possíveis diferenças dentre elas (com e sem o fio de sutura).

3.4 Extração do RNA

O isolamento do RNA total foi feito com o kit comercial RNAeasy Mini Kit (Qiagen®, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Descrevendo brevemente, as amostras de gengiva foram descongeladas e transferidas para um tubo de microcentrifuga contendo a solução de lise do kit. Em seguida essas amostras foram homogeneizadas com o uso de um rotor e centrifugadas por 3 minutos em velocidade máxima, sendo o sobrenadante coletado e misturado com 350 µl de álcool 70%. Esta mistura foi então transferida para as colunas de sílica e novamente centrifugada por 15 segundos em velocidade máxima.

Os procedimentos supracitados permitiram que o RNA ficasse aderido a esta coluna de sílica, a qual foi lavada com três soluções distintas pertencentes ao kit para a remoção dos possíveis inibidores da reação de PCR. Ao final do protocolo, água livre de DNase e RNase foi adicionada à coluna para a eluição e recuperação do RNA purificado.

As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da transcrição reversa.

3.5 Análise da Quantidade e Qualidade do RNA total

Essa etapa teve por objetivo quantificar e verificar a qualidade do RNA extraído. O aparelho utilizado foi o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®, Estados Unidos), o qual fornece os dados de absorbância em 230, 260 e 280 nanômetros após o carregamento de 2 µL de amostra sem diluição. Este aparelho emite luz nos comprimentos de onda citados acima, e ao mesmo tempo detecta quanto dessa luz foi absorvida pela amostra. No caso do RNA, há a absorção da luz no comprimento de 260 nm e o cálculo utilizado para a quantificação desse DNA é:

[DNA] = Absorbância em 260 nm x fator de diluição x 40 (constante para o RNA).

De posse desses dados, o mesmo aparelho, indicou a quantidade e a qualidade do RNA utilizado no estudo. A qualidade é expressa de acordo com a razão entre as absorbâncias em 260 nm e 280 nm (A260/A280) e 260 nm e 230 nm (A260/A230) as quais devem estar entre 1,9 e 2,1.

3.6 Tratamento do RNA total com DNase e transcrição reversa

Para evitar a possibilidade de contaminação por DNA genômico do RNA total extraído de diferentes tecidos e células, procedeu-se o tratamento de todas as amostras com DNase (gDNA wipeout – Qiagen, Alemanha) durante 2 minutos a 42°C, procedimento realizado conforme as orientações do fabricante. As amostras contendo 1 µg de RNA total cada, foram tratadas com DNase e imediatamente submetidas ao processo de transcrição reversa com o kit Quantitect® Reverse Transcription (Qiagen).

Neste RNA tratado com DNase foi adicionada uma mistura de 1 µL dos primers randômicos e oligo dT, 1 µL da transcriptase reversa e 4 µL do tampão

Quantscript RT. Esta mistura foi incubada a 42°C por 30 min, seguida de outra incubação a 95°C por 3 min.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa (qPCR)

O protocolo qPCR foi realizado conforme padronização estabelecida por trabalhos prévios (MORANDINI *et al.*, 2013; SIPERT *et al.*, 2014). A expressão quantitativa dos componentes do SRA foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman (Applied Biosystems, Foster City, USA) em um aparelho Viia 7 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos da América). Os primers utilizados (Applied Biosystems) para tais reações estão na **Tabela 1**. Esse sistema realiza as reações de amplificação, detecção e quantifica as amostras (Viia 7 - Software versão 1.1) por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles. A expressão foi normalizada pelo RNAm de β -actina. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes Taqman, como determinado pelo fabricante. A reação correspondeu a 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 50 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C.

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

Alvo	Número de Catálogo
B-Actina	Rn00667869_m1
AGT	Rn00593114_m1
Renina	Rn00561847_m1
AT1a	Rn02758772_s1
AT1b	Rn02132799_s1
AT2	Rn00560677_s1
ECA	Rn00561094_m1
ECA-2	Rn01416289_m1
Receptor MAS	Rn00562673_s1
COX-2	Rn01483828_m1
IL-1 β	Rn00580432_m1
IL-6	Rn01410330_m1
TNF	Rn01525859_g1
OPG	Rn00563499_m1
RANK	Rn01426423_m1
RANKL	Rn00589289_m1
VEGF	Rn01511601_m1
VEGF-R1 (Flt)	Rn00570815_m1
VEGF-R2 (kdr)	Rn00564986_m1

3.8 Análise histológica

Para a análise histológica foram utilizados os parâmetros inflamatórios segundo Santos *et al.* (2015). Um pesquisador cego pontuou a inflamação de ratos com 14 dias de doença periodontal induzida experimentalmente. As notas variaram de 1 a 4 e foram baseadas no infiltrado inflamatório, epitélio juncional, cemento e análise da crista óssea alveolar. Mais especificamente, o tecido com o escore 1 (**Figura 5**) não tinha infiltrado inflamatório celular, possuía o epitélio juncional preservado, continha alguns osteoclastos, e os processos alveolares e cemento estavam preservados. Tecido com uma pontuação de 2 (**Figura 6**) tinha infiltrado celular inflamatório leve, epitélio juncional preservado, continha alguns

osteoclastos, menor reabsorção do processo alveolar e destruição parcial do cimento. Uma pontuação 3 (**Figura 7**), o tecido apresentava infiltrado celular inflamatório moderado, migração apical do epitélio de junção, continha um grande número de osteoclastos, degradação moderada dos processos alveolares e destruição parcial do cimento. No tecido com uma pontuação 4 (**Figura 8**) havia acentuado infiltrado celular inflamatório, a migração apical do epitélio juncional continha um grande número de osteoclastos e apresentava reabsorção severa dos processos alveolares e cimento.

Figura 5. Escore 1 - Infiltrado inflamatório ausente, epitélio juncional normal, cimento preservado ou com áreas eventuais de reabsorção cervical, crista óssea alveolar preservada.

Figura 6. Escore 2 - Infiltrado inflamatório leve, epitélio juncional normal, cimento parcialmente destruído, crista óssea alveolar com reabsorção mínima.

Figura 7. Escore 3 - Infiltrado inflamatório moderado, epitélio juncional apical, cimento parcialmente destruído, crista óssea alveolar com reabsorção moderada.

Figura 8. Escore 4 - Infiltrado inflamatório intenso, epitélio juncional apical, cimento gravemente destruído, crista óssea alveolar com reabsorção intensa, ocasionalmente com sequestro ósseo.

3.9 Cálculos e análises estatísticas

O programa estatístico GraphPad Prism 5, criado por GraphPad Software, Inc (Califórnia, Estados Unidos) foi utilizado para analisar os dados. Os resultados dos dados paramétricos foram submetidos a uma análise unidirecional de variância (ANOVA) e representam as médias de cinco animais por grupo experimental.

Para os dados não-paramétricos foi usado o Kruskal Wallis e as diferenças nos valores médios entre os grupos foram avaliadas considerando $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão da média e submetidos ao teste de Tukey.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Perda óssea

Nos grupos DP-14d H₂O, DP-14d Rami, 7d-DP-14d Rami, DP-21d-H₂O, 7d-DP-21d Rami e 14d-DP-21d Rami a perda óssea foi maior comparada aos animais Sham, com diferenças estatisticamente significativas. Nos grupos 14d-DP-14d-Rami e DP-21d Rami houve bloqueio da perda óssea em comparação ao grupo DP-21d H₂O, sugerindo que a droga administrada durante esses períodos de tempo, foi capaz de diminuir a progressão da perda óssea alveolar nos animais com DP (Figura 9).

Figura 9. Perdas ósseas em mm² dos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). * vs Sham. # DP-21d H₂O vs 14d-DP-14d Rami e DP-21d Rami.

4.2 Escore dos parâmetros inflamatórios

Os escores de 1 a 4 estão relacionados com a progressão da inflamação no tecido periodontal. Os animais dos grupos DP-14d Rami e DP-21d Rami tratados com ramipril apresentaram escore maior que 3, indicando grave processo inflamatório quando comparados ao grupo 14d-DP-21d Rami que recebeu pré-tratamento de 14 dias e após a indução da DP mais 21 dias de tratamento com

ramipril. Os outros animais submetidos aos tratamentos com ramipril tanto após quanto prévios à indução da doença periodontal não apresentaram melhora significativa em relação aos grupos que utilizaram água. O processo inflamatório estava instaurado tanto nos tempos de 14 quanto 21 dias e o tratamento com o ramipril não interferiu na progressão da inflamação, exceto no grupo 14d-DP-21d Rami. (**Figura 10**)

Figura 10. Escore dos parâmetros inflamatórios dos animais do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). * DP-14d Rami e DP-21d Rami vs. 14-DP-21d Rami.

4.3 Análise da expressão de RNAm no tecido gengival

4.3.1 Expressão de RNAm para os componentes do Sistema Renina-Angiotensina (RAS)

4.3.1.1 Angiotensinogênio

Com relação à expressão de RNAm para AGT não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 11**).

Figura 11. Expressão de RNAm para angiotensinogênio relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.1.2 Renina

A expressão de RNAm para Renina foi detectada em todos os grupos avaliados. Porém os resultados foram inconsistentes não sendo possível análise estatística e confecção de gráfico.

4.3.1.3 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A expressão de RNAm para a enzima conversora de angiotensina permaneceu sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (**Figura 12**).

Figura 12. Expressão de RNAm para ECA relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

Receptores de Angiotensina

4.3.1.4 Receptor de Angiotensina Tipo 1a (AT_{1a})

A expressão de RNAm para AT_{1a} nos grupos não apresentou diferenças estatisticamente significativas (**Figura 13**).

Figura 13. Expressão de RNAm para o receptor AT_{1a} relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.1.5 Receptor de Angiotensina Tipo 1_b (AT_{1b})

A expressão de RNAm para AT_{1b} foi detectada em todos os grupos avaliados. Porém os resultados foram inconsistentes não sendo possível análise estatística e confecção de gráfico.

4.3.1.6 Receptor de Angiotensina Tipo 2 (AT_2)

Com relação a expressão de RNAm para AT_2 não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 14**).

Figura 14. Expressão de RNAm para o receptor AT_2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.1.7 Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2)

A expressão de RNAm para a Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2) permaneceu sem diferenças estatisticamente significativas entre os animais com DP submetidos ao tratamento com veículo comparados aos animais com DP submetidos ao tratamento com ramipril. Os animais tratados com o veículo após a indução da DP apresentaram uma maior expressão de RNAm para ECA-2 quando comparados aos animais do grupo Sham. Da mesma forma os animais dos grupos DP-14d Rami e 14d-DP-14d Rami apresentaram uma maior e significativa expressão de RNAm para ECA-2 (**Figura 15**)

Figura 15. Expressão de RNAm para ECA-2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). * vs Sham.

4.3.1.8 Receptor Mas

Com relação ao RNAm para os receptores do tipo Mas houve menor expressão, com diferença estatisticamente significativa do receptor Mas no grupo DP-21d Rami comparado ao grupo DP-14d H₂O (**Figura 16**).

Figura 16. Expressão de RNAm para receptor MAS relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). # DP-14d H₂O vs DP-21d Rami.

4.3.2 Expressão de RNAm para citocinas

4.3.2.1 Interleucina-1 beta (IL-1 β)

Com relação à expressão de RNAm para IL-1 β não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 17**).

Figura 17. Expressão de RNAm para IL-1 β relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.2.2 Interleucina-6 (IL-6)

Com relação à expressão de RNAm para IL-6 não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 18**).

Figura 18. Expressão de RNAm para IL-6 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.2.3 Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α)

Com relação a expressão de RNAm para TNF- α não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 19**).

Figura 19. Expressão de RNAm para TNF relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.2.4 Ciclooxygenase-2 (COX-2)

A expressão de RNAm para COX-2 foi significativamente maior no grupo submetido ao tratamento com ramipril DP-21d comparado aos animais do grupo DP-14d H₂O (**Figura 20**).

Figura 20. Expressão de RNAm para COX-2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). # DP-14d H₂O vs DP-21d Rami.

4.3.2.5 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Com relação a expressão de RNAm para VEGF não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 21**).

Figura 21. Expressão de RNAm para VEGF relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.2.6 Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R1)

Os animais do grupo Sham apresentaram uma maior expressão de RNAm para o receptor 1 de VEGF (VEGF-R1) comparados aos animais do grupo 14d-DP-21d Rami (**Figura 22**)

Figura 22. Expressão de RNAm para VEGF-R1 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). *vs Sham

4.3.2.7 Receptor 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R2)

Exceto o grupo DP-14 H₂O, todos os outros grupos apresentaram uma menor e significativa expressão de RNAm para VEGF-2 quando comparados aos animais do grupo Sham. Na comparação entre DP-14d H₂O houve menor expressão do receptor 2 de VEGF para 14d-DP-21d Rami (**Figura 23**).

Figura 23. Expressão de RNAm para VEGF-R2 relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução). *vs Sham. # DP-14d H₂O vs 14d-DP-21d Rami.

4.3.2.8 Receptor Ativador de NF-KB (RANK)

Com relação à expressão de RNAm para RANK não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 24**).

Figura 24. Expressão de RNAm para RANK relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.2.9 Ligante do Receptor Ativador de NF-KB (RANKL)

Com relação à expressão de RNAm para RANKL não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 25**).

Figura 25. Expressão de RNAm para RANKL relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

4.3.2.10 Osteoprotegerina (OPG)

Com relação à expressão de RNAm para OPG não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados (**Figura 26**).

Figura 26. Expressão de RNAm para OPG relativa à β -actina nos animais do grupo Sham (submetidos à indução fictícia), do grupo DP-14d H₂O (tratados com veículo durante 14 dias após a indução), do grupo DP-14d Rami (tratados com ramipril durante 14 dias após a indução), do grupo 7d-DP-14d rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo 14d-DP-14d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 14 dias após a indução), do grupo DP-21d H₂O (tratados com veículo 21 dias após a indução), do grupo DP-21d Rami (tratados com ramipril 21 dias após a indução), do grupo 7d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 7 dias antes da indução e 21 dias após a indução) e do grupo 14d-DP-21d Rami (tratados com ramipril 14 dias antes da indução e 21 dias após a indução).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O modelo de doença periodontal experimentalmente induzida em ratos utilizado em estudos anteriores (SOUZA, 2014; MACIEL, 2013; LIMA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2008, RODINI, 2005), mostrou-se efetivo e bem estabelecido nos grupos, capaz de promover a perda óssea alveolar.

As características básicas de acentuada perda óssea alveolar e formação da bolsa periodontal são bem definidas no modelo experimental utilizado, fortalecendo o papel da placa dentobacteriana e do fio de seda como um fator local para o acúmulo da referida placa na iniciação da doença periodontal inflamatória (RODINI, 2005).

As análises microscópicas comparadas com as macroscópicas não revelaram resultados totalmente coincidentes, pois observou-se que o tecido alveolar encontrava-se mais preservado nos animais com maiores períodos de tratamento com ramipril (14d-DP-21d-Rami) uma vez que se detectou menor infiltrado inflamatório e melhor preservação do cemento, epitélio juncional e crista óssea alveolar (**Figura 6**). Em relação à técnica de indução da DP, o trabalho de Rodini (2005) demonstrou intenso infiltrado inflamatório adjacente aos biofilmes microbianos associados à ligadura desde as primeiras 24 horas de indução, que se mantiveram até o período de 56 dias. Nem sempre os eventos macroscópicos observados, como a perda óssea alveolar, são condizentes com as características microscópicas observadas (LIMA, 2011).

O infiltrado de neutrófilos pode causar citotoxicidade em células endoteliais, as quais são fundamentais para a homeostase dos tecidos (PHILLIPSON; KUBES, 2011; MOCSAI, 2013). Os tratamentos com inibidores da ECA tais como captopril e enalapril reduziram esta toxicidade dos neutrófilos em culturas de células endoteliais (ANDERSSON *et al.*, 2014), o que pode explicar a melhor preservação do tecido periodontal e menor perda de osso alveolar em ratos tratados com ramipril neste estudo. Além disso, a possibilidade de menor disponibilidade de Ang II por meio do tratamento com ramipril pode ter acarretado menor perda de osso alveolar, uma vez que, quando este peptídeo se liga aos receptores AT₁ nos osteoblastos, uma maior

produção de RANKL é detectada. Este RANKL por sua vez liga-se aos receptores RANK nos osteoclastos os quais promovem a reabsorção óssea (SHIMIZU *et al.*, 2008). Desta forma, os resultados do presente estudo e de outros publicados, demonstram que o ramipril interfere na migração de células inflamatórias e na preservação do tecido alveolar durante a progressão do DP induzida experimentalmente em ratos, mecanismos estes que serão elucidados em trabalhos futuros.

Segundo Rodini (2005) a perda óssea pode ser observada a partir do primeiro dia após indução da doença periodontal e atingir seu pico aos 14 dias, comprometendo o suporte do dente já no período de 28 dias após indução. Entretanto, a partir do período de 42 dias ocorre uma desaceleração no processo de perda óssea alveolar, provavelmente devido ao distanciamento da fonte agressora (fio e placa dentobacteriana) em relação aos tecidos periodontais do rato.

No presente trabalho, nos grupos pré-tratamento de 14 dias com ramipril, indução da DP e tratamento com medicamento por mais 14 dias (14d-DP-14d-Rami) e indução da DP e 21 dias de tratamento (DP-21d Rami) houve bloqueio da perda óssea em comparação ao grupo que utilizou veículo por 21 dias após indução da DP (DP-21d H₂O), sugerindo que a droga administrada durante esses períodos de tempo, foi capaz de diminuir a progressão da perda óssea alveolar nos animais com a doença.

Trabalhos prévios do nosso laboratório, com utilização de outras drogas anti-hipertensivas que afetam o SRA comprovaram a diminuição da perda óssea alveolar. O uso de losartan (antagonista de receptores da Ang II) e alisquireno (inibidor de renina) foram capazes de diminuir a perda óssea alveolar, apesar de possuírem mecanismos de ação diferentes no SRA (LIMA, 2011). Entretanto, em um estudo recente com um inibidor da ECA, o captopril, por períodos de tratamento semelhantes ao do ramipril, não houve interferência na progressão da perda óssea alveolar (SOUZA, 2014).

Apesar dos medicamentos ramipril, enalapril e captopril serem inibidores da ECA e possuírem efeitos similares, existem diferenças em relação à absorção, duração da ação e efeitos colaterais. Entre eles, o ramipril é lipofílico e têm grande

afinidade com essa enzima encontrada em nível tissular, promovendo assim maior supressão da atividade da ECA (PORRITT *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2008).

O ramipril é um inibidor da ECA tecidual enquanto o enalapril e o captopril são inibidores da ECA não teciduais, embora essa característica não afete os efeitos antitrombóticos desses medicamentos, em um estudo apenas o ramipril e o captopril reduziram a agregação plaquetária (SKOWASCH *et al.*, 2006). Outro estudo refere o efeito aterotrombótico benéfico do tratamento a longo prazo com ramipril pela redução da trombina e da concentração do fibrinogênio (EKHOLM *et al.*, 2002).

Uhal *et al.* (1998) mostraram que a administração de ramipril reduziu a expressão e deposição de colágeno e TGF- β 1 em um modelo de rato com fibrose pulmonar. Entretanto, um estudo recente (DÍAZ-PIÑA *et al.*, 2015), demonstrou que o uso de inibidores da ECA como o enalapril e o captopril e a utilização do losartan (inibidor do receptor de Ang II) poderiam desempenhar um papel pró-fibrose por induzir ao aumento da expressão de moléculas como TGF- β 1 e colágeno em cultura de fibroblastos de pulmão humano.

Estudos comparando alguns inibidores da ECA demonstram melhores resultados com o uso de ramipril. Pacientes que tomaram inibidores da ECA por 30 dias após internação por falência cardíaca, a terapia com enalapril e captopril foi associada com maior mortalidade comparada ao tratamento com ramipril, enquanto o perindopril foi associado com uma redução equivalente na mortalidade comparada ao ramipril (PILOTE *et al.*, 2008). Tratamentos com perindopril e ramipril têm sido associados com menor incidência de mortalidade em pacientes com infarto agudo do miocárdio comparados às outras terapias com inibidores da ECA (enalapril, fosinopril, captopril, quinapril e lisinopril) (PILOTE *et al.*, 2004).

Segundo Ruddy; Mroczek (1993) ao se comparar a segurança clínica e eficácia do ramipril e enalapril, verificaram maior média na diminuição de atividade da ECA plasmática com ramipril em todas as dosagens (71%) comparada com enalapril (48%), sugerindo que o ramipril possui maior inibição da ECA na circulação.

Em outro estudo comparando-se o efeito do ramipril e enalapril em pacientes com hipertensão arterial essencial, verificou-se que o ramipril é tão efetivo como o enalapril na diminuição da pressão em pacientes com hipertensão essencial de leve

a moderada com duração do efeito hipertensivo relativamente longo em ambos, entretanto, com o ramipril houve uma tendência a um efeito anti-hipertensivo mais prolongado resultando em uma ação mais uniforme no período de 24 horas de tratamento (YASKY *et al.*, 1996).

Em um estudo com os inibidores da ECA, telmisartan e ramipril, assim como a combinação das duas terapias, ambas tiveram efeitos benéficos parecidos a respeito da hipertrofia cardíaca, fibrose, ciclo de células e capilarização, com diferenças pequenas entre as duas abordagens, entretanto a terapia combinada não teve efeito adicional benéfico (MULLER *et al.*, 2013).

O ramipril ainda desempenhou efeito antioxidante no endotélio vascular de ratos diabéticos tipo 2, prevenindo o estresse oxidativo e o dano aos vasos (TIAN *et al.*, 2014), como em um estudo feito por Becker (1991) no qual o ramipril preservou a função endotelial em coelhos.

Portanto, o uso do ramipril tem mostrado ação efetiva na melhora clínica dos pacientes e na terapia baseada em evidências, os medicamentos perindopril e ramipril possuem melhores resultados clínicos a longo prazo (DINICOLANTONIO *et al.*, 2013).

No presente estudo o ramipril não conseguiu diminuir a perda óssea alveolar nos grupos com menor tempo de tratamento e nos grupos com maior tempo de tratamento Rami-7d-DP-21d e Rami-14d-DP-21d.

Uma possível explicação para a ineficácia dos inibidores da ECA na progressão da DP, poderia ser o aumento da biodisponibilidade de bradicinina no ambiente inflamado, associado ao efeito causado pela não clivagem da bradicinina. Segundo Ceconi *et al.* (2007) a seletividade para o lugar da bradicinina nos inibidores da ECA em ordem decrescente é perindopril, ramipril, quinapril, trandolapril e enalapril.

A bradicinina possui efeitos vasoativos que favorecem a instalação e a progressão da inflamação pela produção de mediadores pró-inflamatórios como a prostaglandina E₂ (PGE₂) conhecida pela indução da reabsorção óssea (RAHMAN *et al.*, 1992).

Os benefícios dos inibidores da ECA ocorrem por mecanismos distintos, que incluem melhora na disponibilidade de bradicinina no paciente (vasodilatação, através da produção de NO), aumento do ativador de plasminogênio tecidual, aumento da fibrinólise, efeito antioxidante, efeito no aumento da anti-remodelação, preservação da função endotelial, anti-adesão de monócitos (efeito anti-aterosclerótico) e inibição da conversão de Ang I em Ang II (assim reduzindo a vasoconstrição, hipertrofia, adesão de monócitos, inibidor do ativador de plasminogênio-1 e trombogênese, produção de radicais livres e disfunção endotelial) (DINICOLANTONIO *et al.*, 2013).

Além disso, os resultados com maior período de pré-tratamento e tratamento com ramipril que não apresentaram diminuição da perda óssea sugerem que houve uma adaptação ao medicamento com produção de Ang II a partir de vias alternativas que representam 40% da clivagem de Ang I em Ang II (VERDECCHIA *et al.*, 2008). A presença de quimases, catepsinas, neprilisina (NEP), carboxil peptidases (CPP) no tecido inflamado, pode ter gerado Ang II independentemente da ação da ECA (KHER, 2009). Outra possibilidade seria um aumento da produção local de elastase-2, outra via não sensível aos inibidores da ECA e que também leva à formação de Ang II (PAULA, 1998; SANTOS, 2002a, 2002b).

Em um recente estudo Santos *et al.* (2015) demonstraram em homogenatos gengivais de humanos que o uso combinado de captopril e quimostatina (serino protease inibitória) diminuiu a formação de Ang II pela Ang I, enquanto que, apenas o uso de captopril não foi capaz de inibir a formação de Ang II sugerindo que durante o bloqueio de uma enzima endógena funcional pode haver ação de outra na produção de Ang II.

No presente estudo, os níveis de Ang II local e circulante não foram avaliados, já a expressão de RNAm para angiotensinogênio (AGT) no tecido gengival foi avaliada e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Nakamura *et al.* (2011) encontraram RNAm para ECA e AGT em fibroblastos gengivais humanos cultivados, mas a expressão de renina foi muito baixa.

Em trabalhos anteriores do laboratório utilizando o mesmo tecido, também não foi possível detectar a expressão de RNAm para a Renina (SOUZA, 2014;

MACIEL, 2013). Como a renina é uma enzima relacionada à produção de Ang I por clivar o AGT, é constantemente encontrada em células endoteliais presentes nas arteríolas eferentes dos tecidos e na circulação sanguínea. Por este motivo, era esperado que não fosse detectada a expressão de RNAm no tecido estudado, pois provavelmente a renina detectada no tecido gengival seja captada da circulação (LIMA, 2011; SANTOS *et al.*, 2009).

Não foi encontrada alteração na expressão de RNAm da ECA nos grupos controle nem nos grupos tratados com um inibidor da ECA como o ramipril. A ECA está presente em muitos tecidos corporais como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, veias sanguíneas e pode ser considerada uma enzima tecidual base, com menos de 10% encontrada no plasma (DZAU *et al.*, 2002).

Segundo Fagyas *et al.* (2014a) a atividade da ECA seria controlada por inibidores endógenos, como a albumina do soro humano (FAGYAS *et al.*, 2014b) que poderia atuar suprimindo a ação da ECA circulante independente de sua concentração, sendo assim poderia existir bastante enzima porém inativa. Da mesma maneira, um inibidor exógeno da ECA como o Ramipril poderia não alterar a expressão dessa enzima, mas alterar a sua função.

Foi detectado um aumento na expressão de RNAm para o ECA-2 nos grupos de animais que utilizaram veículo (DP-14d H₂O e DP-21d H₂O) e nos animais dos grupos tratados com medicamento DP-14d Rami e 14d-DP-14d Rami em comparação aos do grupo Sham. Velkoska *et al.* (2011) referem que a inibição da ECA com ramipril reduziu os níveis de ECA cardíaca e manteve o nível de ECA-2 cardíaca favorecendo a diminuição de Ang II e o aumento de Ang 1-7, mas a infusão de Ang 1-7 foi associado com aumento da pressão sanguínea e aceleração da fibrose e hipertrofia cardíaca em ratos.

A ECA-2 tem ação na formação de Ang 1-9 e Ang 1-7 pela clivagem de Ang I, a Ang 1-7 possui efeitos cardiovasculares benéficos mediados pelo receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2013).

Embora não seja uma comparação justa devido aos tempos de tratamento e do uso de veículo, o receptor Mas teve menor expressão do RNAm no grupo DP-21d Rami comparado ao grupo DP-14d H₂O. Como a regulação da Ang 1-7 depende da

ECA-2 que estava aumentada nos grupos que utilizaram veículo, pode-se até justificar a maior expressão do receptor Mas no grupo DP-14 H₂O. Entretanto era de se esperar que houvesse aumento do receptor Mas nos grupos tratados com ramipril, já que o nível de Ang 1-7 fica aumentado utilizando-se tratamento com inibidores da ECA e inibidores dos receptores de Ang II (ARB) como o losartan (FERRARIO, 2006).

Estudos sugerem a existência de um controle independente da sinalização da Ang II para a regulação da ECA-2 e do receptor Mas, como encontrado em rim hipertensivo e no coração (MENG *et al.*, 2014). Ainda em pacientes que apresentavam insuficiência cardíaca e foram tratados com inibidores da ECA, utilizando-se a infusão local de Ang 1-7, a mesma não foi capaz de provocar vasodilatação local, ação esperada pelo aumento do receptor Mas (DAVIE; McMURRAY, 1999). Wang *et al.* (2014) verificaram um aumento na expressão de RNAm do receptor Mas utilizando os medicamentos alisquireno (inibidor de renina) e valsartan (inibidor do receptor AT₁), mostrando que um duplo bloqueio do SRA poderia interferir no eixo ECA-2/Ang 1-7/receptor Mas.

Os receptores AT_{1a}, AT_{1b} e AT₂ não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Trabalhos prévios do nosso laboratório mostraram um aumento na expressão de RNAm para AT_{1a} no grupo tratado com captopril (14d-DP-21d Capto) comparado ao que utilizou água (DP-21 H₂O), diferente dos resultados utilizando o mesmo protocolo de pesquisa, mas com outra droga inibidora da ECA o enalapril, no qual ocorreu o inverso e o medicamento causou diminuição na expressão de RNAm AT_{1a} para o grupo tratado (MACIEL, 2013; LIMA, 2011).

Com relação ao receptor AT_{1b}, os dados obtidos não foram suficientes para a confecção de gráfico conforme aconteceu utilizando outros inibidores da ECA, como captopril e enalapril (SOUZA, 2014; MACIEL, 2013; LIMA, 2011), que podem ter diminuído a biodisponibilidade de Ang II, resultando em menor expressão desses receptores.

Os receptores AT₂ e Mas são caracterizados por apresentarem efeitos semelhantes, porém contrários aos efeitos associados ao receptor AT₁, como efeitos

anti-inflamatório, antifibrose, antiapoptose e regeneração neuronal, possivelmente inibindo processos patológicos e permitindo a recuperação de doenças (NAMSOLLECK *et al.*, 2014).

Nesse estudo houve menor expressão do RNAm para o receptor Mas no grupo DP-21d Rami comparado ao DP-14d H₂O, apesar desse grupo apresentar menor perda óssea. Entretanto, o escore inflamatório foi maior que 3, indicando infiltrado inflamatório moderado que poderia ocorrer pela diminuição do receptor Mas. Oliveira-Lima *et al.* (2015) mostraram que a deficiência do receptor Mas resultou em exacerbação da inflamação cerebral e sistêmica induzida por LPS em ratos.

Em um estudo com captopril usando o mesmo modelo experimental, também não houve ação anti-inflamatória (SOUZA, 2014), como apresentado em outros modelos experimentais (WILLIAMS *et al.*, 2005; REGAN *et al.*, 1996.; MURLEY *et al.*, 2004).

Em tecidos saudáveis o receptor AT₂ é pouco expresso (NAMSOLLECK *et al.*, 2014; STECKELINGS *et al.*, 2010) então, era esperado que a expressão de RNAm para AT₂ nos animais do grupo Sham fosse menor em relação aos animais com a DP tratados com o veículo, o que não foi constatado nos resultados de RT-PCR. Existe na literatura um estudo que apresenta diminuição da expressão do receptor AT₂ nos ventrículos esquerdos de ratos *Wistar Kyoto* (WKY) e *Spontaneously Hypertensive rats* (SHR) após tratamento com captopril (MIGUEL-CARRASCO *et al.*, 2010), entretanto em outro estudo com o mesmo medicamento, não houve alteração na expressão do RNAm de AT₂ em tecidos saudáveis ou com doença periodontal (SOUZA, 2014).

O momento de maior produção de RNAm para AT₂ e o receptor Mas pode ter ocorrido antes daquele analisado no presente estudo, assim como possivelmente ocorreu com outros alvos, portanto em estudos futuros a análise dos períodos deve ser mais precoce na tentativa de se detectar os picos de produção de RNAm para a expressão de receptores na membrana celular.

A periodontite é um doença inflamatória crônica e a composição e os níveis de resposta imune como as citocinas e quimiocinas, têm sido usadas como um

marcador confiável para compreensão da progressão da doença (KHALAF *et al.*, 2014).

A Ang II ligada aos receptores AT₁ pode desencadear um processo inflamatório (KANEKO *et al.*, 2011), no qual podem ser encontrados diversos mediadores tais como: TGF- β , IL-1 β , TNF- α , OPG, RANKL, VEGF. No presente estudo, além de todos os componentes do SRA, foram avaliadas as expressões de RNAm para alguns mediadores inflamatórios importantes.

As citocinas IL-1 β e IL-6 estão fortemente relacionadas às doenças inflamatórias como a periodontite (SUNSUKE *et al.*, 2013).

Fibroblastos gengivais podem expressar grande quantidade de mediadores inflamatórios como TNF e IL-6 (SUGAWARA *et al.*, 2002). No estudo em que foram dosadas citocinas em pacientes com doença periodontal severa, acompanhada de grande perda óssea, houve aumento da expressão de IL-6, IL-8 e TNF- α , sugerindo que tais medidas poderiam ser utilizadas como diagnóstico ou prognóstico da doença (NOH *et al.* 2013).

Neste trabalho, a expressão de RNAm para IL-1 β e IL-6 não apresentou diferenças entre os grupos tratados com ramipril e não-tratados, no entanto vários estudos apresentam resultados diferentes em relação aos níveis de citocinas durante a doença periodontal.

Hagiwara *et al.* (2009) demonstraram que o pré-tratamento com enalapril inibiu a secreção de citocinas inflamatórias resultando em diminuição na ativação de NF- κ B (RANK), que regula a expressão de muitos genes inflamatórios tais como TNF- α e IL-6, em um modelo de ratos com sepse induzida por LPS.

No trabalho de Bartold; Haynes (1991), no qual foram analisados fibroblastos humanos para dosar a produção de IL-6 na doença periodontal, foi observado que um nível mais elevado de IL-6 foi expresso em tecidos gengivais inflamados quando comparados aos tecidos saudáveis. Além disso, Sawada *et al.* (2012), demonstraram que talvez possa existir um sinergismo entre IL-1 β e IL-6 durante o processo inflamatório, uma vez que essas citocinas encontram-se aumentadas em células advindas da gengiva de indivíduos com periodontite.

Entretanto, em um estudo para determinar o perfil das citocinas no soro, saliva e fluido gengival crevicular em pacientes com periodontite e controles saudáveis, os autores verificaram diminuição dos níveis de IL-6 na saliva e fluido gengival nos indivíduos com periodontite (KHALAF *et al.*, 2014). Segundo Oleksy *et al.* (2002) proteinases derivadas de agentes patológicos como da *Porphyromonas gingivalis*, podem inativar as citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, sugerindo que o estado pró-inflamatório pode ser suprimido no local da doença, possibilitando o crescimento e sobrevivência de bactérias.

Era esperado que a expressão de RNAm para IL-1 β aumentasse na DP e diminuísse com o tratamento com ramipril, o que não ocorreu no presente estudo e em outro estudo do nosso laboratório utilizando captopril (SOUZA, 2014). Em um estudo com ratos WKY e SHR utilizando captopril (80 mg/kg/dia) com tempo de tratamento de 12 semanas, encontraram decréscimo na expressão de RNAm para IL-1 β e IL-6 nos grupos submetidos ao tratamento (MIGUEL-CARRASCO *et al.*, 2010). Em ratos com nefropatia diabética o uso de alisquireno e/ou valsartan diminuíram a expressão de RNAm para as citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (WANG *et al.*, 2014).

Araújo *et al.* (2013), utilizaram olmesartan e foi possível observar o aumento nos níveis da IL-1 β indicando sua participação na progressão da DP.

É possível que o período analisado no presente estudo tenha sido muito longo e a maior produção de RNAm para IL-1 β e IL-6 tenha ocorrido antes, assim sendo, seria necessário em estudos futuros, a avaliação de períodos mais precoces na tentativa de se detectar os surtos de produção de RNAm para as citocinas inflamatórias.

O TNF- α é considerado uma das principais citocinas envolvidas na progressão da inflamação na doença periodontal, auxiliando na destruição do tecido e na perda óssea decorrente da doença (BOSTRÖM; LINDER; BERGSTRÖM, 1998). É produzida por monócitos e macrófagos em resposta aos componentes bacterianos orais, tais como LPS (BROOK, 2006; KURIYAMA *et al.*, 2006). Aumento nos níveis de TNF- α podem promover a liberação da collagenase de fibroblastos

gingivais humanos (OKADA; MURAKAMI, 1998), levando à destruição de colágeno e reabsorção óssea (BOSTRÖM; LINDER; BERGSTRÖM, 1998).

No presente trabalho os níveis de TNF- α não se mostraram aumentados. É possível que o momento de maior produção de RNAm para TNF- α também tenha ocorrido antes do analisado, reforçando a necessidade de se estudar as citocinas inflamatórias em períodos mais agudos.

Os resultados mostraram que a expressão de COX-2 estava aumentada no grupo DP-21dRami em relação ao grupo DP-14H2O. A COX-2 é uma enzima responsável pela formação da Prostaglandina E₂ a partir do ácido aracdônico, por isso está relacionada à inflamação. A concentração de prostaglandina E₂, IL-1 β e IL-6 são maiores em indivíduos com doença periodontal e na saliva de indivíduos com gengivite a presença de PGE₂ ainda continua presente mesmo após profilaxia (SYNDEGAARD *et al.*, 2014).

Segundo Oliveira *et al.* (2008) a inibição da COX-2 diminuiu a expressão de VEGF e a perda óssea alveolar durante a progressão da periodontite experimental em ratos. Desse modo era de se esperar que a COX-2 estivesse diminuída no grupo com doença periodontal tratado com ramipril por 21 dias já que esse grupo apresentou redução da perda óssea alveolar.

O VEGF está envolvido no mecanismo da regulação da inflamação sendo expresso em abundância na maioria dos tecidos inflamados, entretanto a sua participação na progressão da doença periodontal ainda não está estabelecida (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A expressão de RNAm para VEGF mostrou-se sem diferenças significativas quando comparados os grupos entre si e com o grupo Sham. Na DP, a COX-2 e portanto o VEGF deveriam estar bem expressivos principalmente nos grupos Sham e nos ratos que utilizaram veículo, já que são moduladores que atuam no processo inflamatório (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Nos grupos tratados com ramipril era de se esperar uma diminuição de VEGF, como ocorreu em um estudo com ratos, no qual o uso de um inibidor da ECA, o perindopril foi capaz de diminuir a Ang II que induz a expressão de VEGF, atenuando assim a permeabilidade vascular na retinopatia diabética (KIM *et al.*, 2009).

Porém, por se tratar de uma análise da expressão de RNAm e sem quantificação dos níveis de proteínas, pode-se supor que a proteína VEGF já havia sido formada no momento de análise por RT-PCR.

Pode-se verificar ainda no nosso estudo que para os receptores de VEGF, o VEGF-R1 apresentou maior expressão no grupo Sham comparado ao grupo 14d-DP-21d Rami e o VEGF-R2 estava aumentado no Sham em comparação aos outros grupos, menos o 14-DP-21d, o que era esperado.

Considerando-se que a Ang II aumenta a expressão de VEGF e dos receptores VEGF, como ocorreu em estudos com células endoteliais da retina (OTANI *et al.*, 1998; MORAVSKI *et al.*, 2000), o bloqueio do SRA, como é o caso do ramipril, poderia diminuir a expressão de VEGF. Os medicamentos lisinopril e losartan bloquearam a expressão de VEGF e a angiogênese em músculos de ratos submetidos à estimulação elétrica crônica (AMARAL *et al.*, 2001).

A interação de Ang II com os receptores AT₁ inibe a expressão de RNAm para osteocalcina (HAGIWARA *et al.*, 1998) e promove a ativação dos osteoclastos que induzem à reabsorção óssea periodontal (LI *et al.*, 2008; NAGASAWA *et al.*, 2007).

O nível de RNA-m de RANKL está aumentado em processos inflamatórios como da DP. As citocinas IL-1 β e TNF- α podem regular a expressão de RANKL em células periodontais e aumentar a formação de osteoclastos (CHEN *et al.*, 2014). Tem sido relatado maior nível de RNAm de RANKL na periodontite avançada em comparação aos grupos com periodontite moderada e indivíduos saudáveis, além de sua relação com uma importante bactéria periodontal como a *Porphyromonas gingivalis* (WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007). Segundo Jin *et al.* (2007) a reabsorção óssea pode ser diminuída pela inibição de RANK e RANKL durante a periodontite experimental em ratos.

O receptor ativador de NF- κ B (RANK) é expresso na superfície dos osteoclastos e possui um importante papel no processo de reabsorção óssea. Seu ligante RANKL, expresso na superfície de osteoblastos, liga-se a ele e impulsiona sinais de diferenciação e ativação celular em precursores osteoclásticos, promovendo assim, a reabsorção óssea (NAGASAWA *et al.*, 2000).

No presente estudo, a expressão de RNAm para RANK e RANKL não apresentou alterações nos grupos avaliados. Assim como aconteceu com os outros alvos, esse resultado pode estar relacionado ao momento de expressão no qual foi feita a RT-PCR, pois era de se esperar que em animais com a doença periodontal que apresentaram grandes perdas ósseas, fosse constatado um aumento de RANK juntamente com maior expressão de RANKL, que atuam no processo de reabsorção óssea.

RANK, RANKL e OPG possuem numerosos reguladores comuns incluindo a interleucina-6 (IL-6) (PALMQVIST *et al.*, 2002) fator de crescimento tumoral (TGF- β) (MURAKAMI *et al.*, 1998) e fator de necrose tumoral (TNF) (HOFBAUER *et al.*, 1999).

O RANK-L, seu receptor RANK e outro receptor chamado osteoprotegerina (OPG) são moléculas-chave na regulação do recrutamento, função e diferenciação dos osteoclastos (SUDA *et al.*, 1999). A osteoprotegerina (OPG) é um antagonista aos efeitos de RANKL, atuando, portanto, na preservação da integridade óssea (UDAGAWA *et al.*, 1999; SUDA *et al.*, 1999).

Nos animais Sham e nos grupos com a doença periodontal tratados com veículo ou com ramipril, a expressão de RNAm para OPG não se mostrou alterada. Segundo Tabari *et al.* (2013) pode ser difícil prever as variações na concentração de OPG nas diferentes fases da doença periodontal, principalmente quando comparada ao RANKL. Enquanto os linfócitos, que são um dos principais produtores de RANKL, estão aumentados nas lesões periodontais ativas, as origens da OPG são quase as mesmas na doença e em estados saudáveis.

Provavelmente a quantidade de OPG não foi suficiente para diminuir a progressão da perda óssea, ao passo que a resposta imune contra patógenos periodontais pode afetar grandemente o curso da DP e a perda óssea continua a ser estabelecida (CHEN *et al.*, 2014; NAGASAWA *et al.*, 2000). Entretanto um estudo utilizando extrato de sumagre (antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano) em ratos após indução de doença periodontal experimental, houve aumento de células do infiltrado inflamatório, osteoclastos e RANKL no grupo submetido a ligadura sem

tratamento e presença de mais células de OPG no grupo com ligadura e tratado com o extrato (SAGLAM *et al.*, 2015)

Em suma, os resultados dessa pesquisa mostraram que ramipril foi capaz de diminuir a progressão da perda óssea na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos no grupos tratados com ramipril DP-21d-Rami. Também pode ser observado que o ramipril altera alguns mediadores do processo inflamatório como COX2 e os receptores de VEGF, além de interferir no processo inflamatório nos ratos tratados por um período mais longo (grupo 14-DP-21- Rami). A utilização da RT-PCR, forneceu a informação de que no ambiente estudado havia a mensagem para a produção de determinadas proteínas, sendo assim há necessidade de mais estudos sobre o tema, principalmente no que diz respeito à quantificação de proteínas no tecido, e em relação ao tempo de estabelecimento do processo inflamatório, avaliando períodos mais precoces.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que apesar do tratamento com ramipril por um período mais longo atenuar a perda óssea, houve aumento do estado inflamatório dos tecidos periodontais.

Os dados de expressão gênica de maneira geral não foram conclusivos, sendo necessário experimentos complementares como expressão proteica e análise em períodos mais precoces para melhor compreensão dos resultados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Ahmad S, Varagic J, Groban L, Dell'Italia L, Nagata S, Kon ND, Ferrario CM. Angiotensin-(1-12): A chymase-mediated cellular Angiotensin II substrate. *Curr Hypertens Rep.* 2014; 16(429): 1-8.

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

Amaral SL, Linderman JR, Morse MM, Greene AS. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II e VEGF. *Microcirculation.* 2001a; 8(1): 57-67.

Amaral SL, Roman RJ, Greene AS. Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in Dahl S rats. *Hypertension.* 2001b; 37 (2 part 2): 386-90.

Andersson P, Bratt J, Heimbürger M, Cederholm T, Palmblad J. Inhibition of neutrophil-dependent cytotoxicity for human endothelial cells by ACE inhibitors. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2014; 80: 339-345.

Arakawa K. Serine protease angiotensin II systems. *J Hypertens Suppl* 1996 Dec;14(5):S3-7.

Arikan F, Buduneli N, Kütükçüler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:283-8.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1045-1049, 1989.

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. DC4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 1999; 67(6): 2804-9.

Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149: 217-225.

Bartold PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 26: 339-345, 1991.

Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, et al. TNF-alpha and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis* 15: 82-87, 2009.

Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D, Rankl RANK. osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:2334-50.

Baumgarten P, Blank AE, Franz K, Hattingen E, Dunst M, Zeiner P, Hoffmann K, Bähr O, Mäder L, Goeppert B, Machein M, Seifert V, Steinbach JP, Plate KH, Harter PN, Mittelbronn M. Differential expression of vascular endothelial growth factor A, its receptors VEGFR-1, -2, and -3 and co-receptors neuropilin-1 and -2 does not predict bevacizumab response in human astrocytomas. *Neuro-Oncology* 2015; Nov (0): 1–11.

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.

Becker RH, Wiemer G, Linz W. Preservation of endothelial function by ramipril in rabbits on a long-term atherogenic diet. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991. 18(2); S110-S115.

Bem-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensin mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1988; 255:E70-9

Berggreen E, Heyeraas KJ. Role of K⁺ATP channels, endothelin A receptors, and effect of angiotensin II on blood flow in oral tissues. *J Dent Res* 2003 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.

Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking associated periodontal disease. *J Clin Periodontol* 25: 767-773, 1998.

Boucher R, Asselin J, Genest J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. *Circ Res* 1974;34-35(Suppl 1):203-9.

Bruce E, Shenoy V, Francis J, Steckelings U, Unger T, Sumners C, et al. AT2 receptor agonist, compound 21, attenuates pulmonary hypertension and associated cardiac pathophysiology via the vasoprotective ACE/Ang(1-7)/Mas axis. *High Blood Pressure Research (HBPR)* 2012. Scientific Sessions. Washington, USA, 2012.

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction – part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the working group on endothelins and endothelial factors of the european society of hypertension. *Journal of hypertension*. 2005; 23(2): 233-246.

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 tissue of the rat. *J Clin Invest*. 1986; 78:31-9.

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

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

Cassis LA, Saye J, PEACH MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension*. 1988; 11:591-6.

Ceconi C, Francolini G, Olivares A, Comini L, Bachetti T, Ferrari R. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have different selectivity for bradykinin binding sites of human somatic ACE. *Eur J Pharmacol*. 2007; 577(1-3): 1-6.

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

Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? Hindawi Publishing Corporation-BioMed Research International. 2014, Article ID731039,1-7.

Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E, Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*. 2005; 11:194-205.

Costa ACO, Romero TRL, Pacheco DF, Perez AC, Savernini A, Santos RRA, Duarte IDG. Participation of AT1 and Mas receptor in the modulation of inflammatory pain. *Peptides*. 2014; 61: 17-22.

Curato C, Slavic S, Dong J, Skorska A, Altarche-XifroW, Miteva K, et al. Identification of noncytotoxic an IL-10 Producing CD8+ AT2R+ T cell population in response to ischemic heart injury. *J Immunol.* 185: 6286-93, 2010.

Dandapat A, Hu CP, Chen J, Liu Y, Khan JA, Remeo F, et al. Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agtr2) decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque. *Biochem Biophys Res Commun.* 366:871-7, 2008.

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

Davie AP, Mc Murray JJV. Effect of angiotensin (1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor. *Hypertension.* 1999; 34(3): 457-460.

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

Dhande I, Ali Q, Hussain T. Proximal tubule angiotensin AT2 receptors mediate anti-inflammatory response via interleukin-10: role in neuroprotection in obese rats. *Hypertension.* 61: 1218-26, 2013.

Díaz-Piña G, Montes E, Checa M, Becerril, Alba CG, Vega A, Páramo I, ordoñez-Razo R, Ruiz V. Profibrosing effect of angiotensin converting enzyme inhibitors in human lung fibroblasts. *Lung.* 2015; 193: 199-202.

Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Júnior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:514-20.

Dzau V. The cardiovascular continuum and renin-angiotensin-aldosterone system blockade. *J Hypertens Suppl.* 2005; 23: S9-17.

Dzau VJ, Berstein K, Celermajer D, et al. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drug Ther.* 2002; 16(2): 149-160.

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

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

Ekholm M, Wallen H, Johnsson H, Eliasson K, Kahan T. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with ramipril reduces thrombin generation in human hypertension. 2002; 103: 151-155.

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

Fagyas M, Uri K, Siket IM, Daragó A, Boczán, Bányai E, Édes I, Papp Z, Tóth A. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone System (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *PloS ONE.* 2014a; 9(4): e87843.doi:10.1371/journal.pone.0087843.

Fagyas M, Uri K, Siket IM, Fülöp GA, Csató V, Daragó A, Boczán, Bányai E, Szentkirályi IE, Maros TM, Szerafin T, Édes I, Papp Z, Tóth A. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone System (RAAS) II: Albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human. *PloS ONE.* 2014b; 9(4): e87844.doi:10.1371/journal.pone.0087844.

Feldt S, Maschke U, Dechend R, Luft FC, Muller DN. The putative (pro) renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro) renin signaling. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2008; 19(4): 743-748.

Fentoglu O, Köroglu BK, Hiçyilmaz H, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol* 38: 8-16, 2011.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.

Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med.* 1999; 77: 527-543.

Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS.* 2005; 94: 209-231.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 795-803.

Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme-2 and angiotensin (1-7): an evolving

story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 2006; 47(3): 515-521.

Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen OS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1² generation. Review. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*. 2006; 147: 227–235.

Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPE study). *Lancet*. 2003; 362(9386): 782-788.

Fraga-Silva RA, Savergnini SQ, Montecucco F, Nencioni A, Caffa I, Soncini D, et al. Treatment with Angiotensin-(1-7) reduces inflammation in carotid atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. 2014; 111(4): 736-47.

Fukuda D, Enomoto S, Hirata Y, Nagai R, Sata M. The angiotensin receptor blocker , telmisartan, reduces and stabilizes atherosclerosis in ApoE and AT1aR double deficient mice. *Biomed Pharmacother*. 2010; 64(10): 712-7.

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

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

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

Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl):1592–1600.

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

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.

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

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.

Gyorfi A, Fazekas A, Suba, Z, Ender F, Rosivall L. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol* 1994; Oct 21(9):601-5.

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

Hagiwara S, Iwasaka H, Matumoto S, Hidaka S, Noguchi T. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in *in vivo* and *in vitro* models*. *Crit Care Med.* 2009; 37(2), 626-633.

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

Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 11: 443-449, 1990.

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.

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999; 25: 255-259.

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

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

Imai Y. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J.* 2010; 74(3): 405-10.

Jackson EK, Garrison JC. Renin and angiotensin. In: Molinoff PB, Ruddon, Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. New York: Mcgraw-Hill, 1995. p.773-58.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH *et al*. RANK-L inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. Journal of Periodontology. 2007; 78(7): 1300-1308.

Jones ES, Black MJ, Widdop RE. Influence of angiotensin II subtype 2 receptor (AT(2)R) antagonist, PD123319, on cardiovascular remodeling of aged spontaneously hypertensive rats during chronic angiotensin li subtype 1 receptor (AT(1)R) blockade. Int J Hypertens. 2012: 543062, 2012.

Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, et al. Angiotensin li type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? Circulation. 118: 2523-32, 2008.

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.

Khalaf H, Lönn J, Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: Possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. 67: 29-35, 2014.

Kher V. Renin inhibition-benefit beyond hypertension control. J Assoc Physicians india. 2009; jul;57: 518-20.

Kim JH, Kim JH, Yu YS, Cho CS, Kim KW. Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. Journal of Cerebral Blood Flour & Metabolism. 2009; 29: 621-628.

Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. Lasers Surg Med. 2007; 39:441-50.

Kovacs I, Toth j, Tarjan J, Koller A. Correlation of flow mediated dilatation with inflammatory markers in patients with impaired cardiac function. Beneficial effects of inhibition of ACE. Eur J Heart Fail. 2005; 8: 451-9.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. Curr Hypertens Rep. 2009; 11(2): 104-110.

Kwan TS, Padrines M, Théoleyre S, Hemann D and Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 49-60.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):165-76.

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

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

Lee S, Brait VH, Arumugam TV, Evans MA, Kim HA, Widdop RE, et al. neuroprotective effect of an angiotensin receptor type 2 agonist following cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Exp Transl Stroke Med.* 4:16, 2012.

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

Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*; 23: 598-604, 2011.

Lima MC. O sistema renina-angiotensina na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. Departamento de Ciências Biológicas. Bauru. Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo, 2011. 145p. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas - Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo, 2011.

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

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

Liu R, Desta T, Raptis M, Darveu RP, Graves D. *Porphyromonas gingivalis* and *E. coli* Lipopolysaccharide Exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008; 79(7): 1241-47.

Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Brit J Pharmacol* 1998 Feb;123(3):353-60.

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.

Maciel RP. Efeitos da Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina Sobre a Doença Periodontal Induzida Experimentalmente em Ratos. Departamento de Ciências Biológicas. Bauru. Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo: 2013, 103p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas - Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo, 2013.

Mackiewicz A. Acute phase proteins and transformed cells. *Int Rev Cytol*. 1997; 170: 225-300.

Madden TE, Caton JG. Animal models for periodontal disease. *Methods Enzymol* 1994; 253:106-19.

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

Martins LC, Martins LMB, Ubaid-Girioli S, Moreno Jr H. Tratamento medicamentoso do paciente com hipertensão de difícil controle. *Ver Bras Hipertens*. 2008; 15(1): 28:33.

Maruta H, Arakawa K. Confirmation of direct angiotensin formation by kallikrein. *Biochem J*. 1983; Jul 213(1):193-200.

McCarthy CA, Vinh A, Callaway JK, Widdop RE. Angiotensin AT2 receptor stimulation causes neuroprotection in a conscious rat model of stroke. *Stroke*. 40: 1482-9, 2009.

Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira RC, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod*. 2008; 34:932-8.

Meng W, Zhao W, Zhao T, et al. Autocrine and Paracrine function of angiotensin 1-7 in tissue repair during hypertension. *American journal of Hypertension*, 2014.

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

Mine Y, Makihiro S, Nikawa H, Murata H, Hosokawa R, Hiyama A, Mimura S. Impact of titanium ions on osteoblast-, osteoclast- and gingival epithelial-like cells. *J Prosthodont Res*. 2010; 54:1-6.

Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *JEM*. 2013; 210(7): 1283-1299.

Monov G, Strbac GD, Baron M, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2006; 8:135-41.

Montezano AC, Cat AND, Rios FJ, Touyz RM. Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep*. 2014; 16:420-431.

Montón C, Rañó A, Torres A. Inflammatory response in pneumonia. *Arch Bronconeumol*. 1998 Nov;34 Suppl 2:11-6.

Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Bertram JF, Shahinfar S, Skinner SL, Wilkinson-Berka JL. Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000; 36:1099–104.

Muller P, Kazakov A, Semenov A, Jagoda P, Friedrich EB, Böhm M, Laufs U. Ramipril and telmisartan exhibit differential effects in cardiac pressure overload-induced hypertrophy without an additional benefit of the combination of both drugs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and therapeutics*. 2013; 18(1) 87-93.

Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K et al. Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 252: 747-752.

Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANK-L) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*. 2007; 43(1): 65-84.

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

Namsolleck P, Boato F, Schwengel K, Paulis L, Matho KS, Geurts N, et al. AT2-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulation BDNF expression. *Neurobiol Dis.* 51: 177-91, 2013.

Narducci P, Nicolin V. Differentiation of activated monocytes into osteoclast-like cells on a hydroxyapatite substrate: an in vitro study. *Ann Anat.* 2009; 191:349-55.

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.

Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH, Kim HH, Park YG. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2013; 6: 847-851

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.

Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H, et al. Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52(4):545-8.

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

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

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

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 248-266, 1998.

Oleksy A, Bandula A, Bugno M, Travis J, Potempa J, Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog.* 2002; 32: 173-81.

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

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

Oliveira-Lima OC, Pinto MCX, Duchene J, Qadri F, Souza LL, Alenina N, Bader M, Santos RAS, Carvalho-Tavares J. Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. *Immunobiology*. 2015; 220: 1311-1321.

Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *J periodontal*. 1998; 69: 269-278.

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

Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *International Journal of Inflammation*, V 2014, article ID 689360, 1-13.

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

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of the receptor activator of NF- β B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- β B in mouse calvariae. *J Immunol*. 2002; 169: 3353-3362.

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

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

Paulis L, Becker STR, Lucht K, Schwengel K, Slavic S, Kaschina E, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation in N ω -nitro-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: the effect on pulse wave velocity and aortic remodeling. *Hypertension*. 59: 485-92, 2012.

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

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

Pendergrass KD, Gwathmey TM, Michalek RD, Grayson JM, Chappell MC. The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 384: 149-54, 2009.

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

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

Phillipson M; Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine.* 2011; 17(11): 1381-1390.

Pilote L, Abrahamowicz M, Eisenberg MJ, Humphries K, Behlouli H, Tu JV. Effect of different angiotensin-converting-enzyme inhibitors on mortality among elderly patients with congestive heart failure. *CMAJ*; 2008; 178(10): 1303-1311.

Pilote L, Abrahamowicz M, Rodrigues E, Eisenberg MJ, Rahme E. Mortality rates in elderly patients who take different angiotensin-converting enzyme inhibitors after acute myocardial infarction: a class effect? *Ann Int Med.* 2004; 141(2): 102-112.

Porritt MJ, Chen M, Rewell SSJ, Dean RG, Burrell LM, Howells DW. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2010; 30, 1520-1526.

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

Rahman S, Bunning RA, Dobson PR, Evans DB, Chapman K, Jones TH. et al. Bradykinin stimulates the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 in human osteoblast-like cells. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1135:97-1012.

Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Battino M, Granados S, Morillo JM, Bompadre S, et al. Periodontitis is associated with altered plasma fatty acids and cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; 20: 133-9, 2010.

Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 59: 291-9, 2012.

Rettori E, De Laurentis A, Dees WL, Endruhn A, Rettori V. Host neuro-immuno-endocrine responses in periodontal disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2014; 20: 4749-4759.

Rodini CO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e Metaloproteinases -2 e -9. Departamento de Ciências Biológicas. Bauru. Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo: 2005, 146p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas - Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo, 2005.

Rompe F, Artuc M, Halberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*. 55:924-31, 2010.

Ryan JW, Day AR, Schultz DR, Ryan US, Chung A, Marlborough DI, *et al.* Localization of angiotensin-converting enzyme (kininase II). Preparation of antibody-hemioctapeptide 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

Saglam M, Koseoglu S, Hatipoglu M, Esen HH, Koksall E. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANK/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(1): 33-41.

Santos CF, Akashi AE, Dionísio TJ, Sipert CR, Didier DN, Greene AS, Oliveira SH, Pereira HJ, Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *Journal Periodontol*. 2009 Jan;80(1):130-9.

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

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

Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, Colombini-Ishikirama BL, Sipert CR, Maciel RP, Akashi AP, Souza GP, Garlet GP, Rodini CO, Amaral SL, Becari C, Salgado MC, Oliveira EB, Matus I, Didier DN, Greene AS. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS ONE*. 2015, 10(8): e0134601. 1-28.

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

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

Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Brage T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *The Journal of Endocrinology*. 2013; 216(2): R1-R17.

Santos RA, Frézard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005; 3(4): 383-91.

Schieffer B, Bunte C, Witte J, et al. Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44: 362-8.

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

Schulz WW, 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.

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

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.

Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, KunugizaY, Kizawa T, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *The FASEB Journal*. 2008; 22: 2465-2475.

Shunsuke S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhance of gingival inflammation induced by synergidm of IL-1 β and IL-6. *Biomedical Research*. 2013; 34(1): 31-40.

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

Sipe JD. Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Arthritis Reum*. 1995; 25: 75-86.

Skowasch D, Viktor A, Schneider-Schmitt M, Lüderitz B, Nickenig G, Bauriedel G. Differential antiplatelet effects of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Clin Res Cardiol*. 2006; 95: 212-216.

Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides*. 2009; Oct; 30(10): 1945-1950.

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

Souza GP. Efeitos do captopril sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. Departamento de Ciências Biológicas. Bauru. Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo: 2014, 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas - Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo, 2014.

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

Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation Research*, V104, N2: 236-244, 2009.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families," *Endocrine Reviews*. 1999; 20 (3): 345–357.

Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res*; 8: 465-8, 2002.

Sui YB, Chang JR, Chen WJ, Zhao L, Zhang BH, YU YR, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular calcification in rats. *Peptides*. 2013; 42: 25-34.

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.

Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, XI J, Ding X, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy. *Journal of Periodontology*. 2014; DOI:10.1902/jop.130696.

Taga T, Kishimoto T. Gp130 and interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15: 797-819.

Takai S, Shiota N, Yamamoto D, Okunishi H, Miyazaki M. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci* 1996;58(7):591-7.

Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI (2002) Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves Vascular Endothelial Growth Factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest*. 2002; 82:747–56.

Tamari ZA, Azadmehr A, Tabrizi MAA, Hamissi J, Ghaedi FB. Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/ osteoprotegerin ratio in periodontal disease and health. *J Periodontal Implant Sci*. 2013; 43: 227-232.

Tang WB, Zhou YQ, Zhao T. et al. Effect of interleukin-6 (IL-6) on the vascular smooth muscle contraction in abdominal aorta of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Chinese Journal of physiology*, V54, N5: 318-323, 2011.

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

Tian S, Ge X, Wu K, Yang H, Liu Y. Ramipril protects the endothelium from high glucose-induced dysfunction through CaMKK β /AMPK and Heme oxygenase-1 activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014; 350:5-13.

Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*. 1982; 69:25-30.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. 1999 Nov;25(5):517-23.

Uhal BD, Gidea C, Bargout R, et al. Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelial cells: a potential antifibrotic mechanism. *Am J Physiol*. 1998; 275(5 Pt 1):L1013–L1017.

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

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

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

Velkoska E, Dean RG, Griggs K, Burchill L, Burrell LM. Angiotensin-(1-7) infusion is associated with increased blood pressure and adverse cardiac remodeling in rats with subtotal nephrectomy. *Clinical Science*. 2011; 120: 335-345.

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

Verma S, Lonn EM, Nanji A, Browne K, Ward R, Robertson A, Conradson H, Hildebrand K, Brant R, Andreson TJ. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on C-reactive protein levels: The ramipril C-reactive protein randomized evaluation (4R) trial results. *Can J Cardiol*. 2009; 25(7): e236-240.

Virtej A, Løes SS, Berggreen E, Bletsa A. Localization and signaling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. *J Endod*. 2013; May 39(5):605-11.

Wang W, Qiu L, Howard A, Solis N, Li C, Wang X, Kopp JB, Levi M. Protective effects of aliskiren and valsartan in mice with diabetic nephropathy. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2014; 15(4): 384-395.

Wara-Aswapati N, Surarit R, Chayasadam A, Boch JA, Pitiphat W. RANK-L upregulation associated with periodontitis and porphyromonas gingivalis. *Journal of Periodontology*. 2007. 78(6); 1062-1069.

Wilkinson-Berka JL, Agrotis A, Deliyanti D. The retinal renin-angiotensin system: roles of angiotensin II and aldosterone. *Peptides*. 2012; 36(1): 142-50.

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

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

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

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.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, Ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000; 342(3): 145-153.

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

ANEXO

ANEXO

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 042/2011

Bauru, 11 de dezembro de 2015.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alteração no título do trabalho de pesquisa, anteriormente denominado **Efeitos da inibição da enzima conversora de angiotensina na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos**, de autoria de Ana Paula Akashi, sob sua orientação, para "*Efeitos do ramipril sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos*", informamos a **APROVAÇÃO** ad referendum desta Comissão, nesta data.

Solicitamos a apresentação do Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Docente do Departamento de Ciências Biológicas