UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

GABRIELA PEREIRA DE SOUZA

**Avaliação dos efeitos do losartan na doença periodontal induzida
experimentalmente em ratos**

BAURU
2018

GABRIELA PEREIRA DE SOUZA

**Avaliação dos efeitos do losartan na doença periodontal induzida
experimentalmente em ratos**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Versão Corrigida

BAURU
2018

Pereira de Souza, Gabriela

Avaliação dos efeitos do losartan na doença
periodontal induzida experimentalmente em ratos /
Gabriela Pereira de Souza. – Bauru, 2018.

125p. : il. ; 31cm.

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 tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP:
projeto de pesquisa aprovado
em **21 de outubro de 2016**.

Protocolo nº: 020/2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a DEUS que sempre cuidou de mim, aos meus amores **Nicolas Pereira Silva**, ao meu marido **Alysson de Paula Silva**, à minha mãe **Maria Aparecida Pereira de Souza**, ao meu pai **Mauro de Souza** e a todos os meus amigos que me possibilitaram chegar a este momento.*

AGRADECIMENTOS

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
Agradeço imensamente a CAPES.*

Agradeço a Deus por me dar força e saúde para concluir mais uma fase de minha jornada acadêmica.

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

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

Agradeço imensamente ao Dr. Thiago José Dionísio por todo apoio e ajuda durante minha jornada tanto do mestrado como do doutorado, imenso carinho e admiração por ele.

À secretária Dalva Oliveira, pela ajuda nos momentos que precisei.

À Maristela Petenuci Ferrari secretária da Comissão de Pesquisa.

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

À técnica de laboratório Viviane Aparecida Parisi, pela ajuda no uso dos equipamentos dos laboratórios.

À Dra. Adriana Maria Calvo por toda ajuda e atenção destinados ao auxílio na compreensão e estruturação deste trabalho. À Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama, pelo auxílio na indução da doença periodontal e em outras fases de minha pesquisa.

Às colegas de laboratório Gabriela Moraes e Giovana Weckwerth, por auxiliarem durante os procedimentos de indução da doença periodontal.

Aos funcionários do biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB/USP), sempre muito prestativos. Obrigada pela ajuda.

*"I have a dream
A song to sing
To help me cope
With anything."*

Abba

RESUMO

A doença periodontal (DP) compreende um grupo de lesões que afeta os tecidos periodontais de proteção e de suporte e pode acarretar na perda dentária. Interações entre patógenos microbianos e vários sistemas desempenham um papel crítico no desenvolvimento e progressão da DP via liberação de vários mediadores inflamatórios e imunológicos. Experimentos recentes de nosso grupo de pesquisa mostraram que existe a expressão de RNAm para todos os componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), presença da renina e atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em tecido gengival de ratos e que o losartan inibe a perda óssea no modelo de DP induzida experimentalmente em ratos. Portanto, o presente trabalho propõe-se a investigar os mecanismos pelos quais o losartan (antagonista do receptor AT1) possui efeitos anti-inflamatórios no modelo da DP induzida experimentalmente em ratos. Para tanto, foi utilizado o modelo de indução da DP por colocação de ligadura ao redor do primeiro molar inferior de ratos divididos em treze grupos com 15 animais cada, que foram tratados com losartan (50 mg/kg/dia) via gavagem. As técnicas utilizadas neste trabalho foram: indução da DP em ratos, a análise tomográfica da perda óssea alveolar (MicroCT), análise 2D com uso de software específico (ImageJ), RT-PCR e análise histológica do tecido periodontal. Após a coleta, os dados foram devidamente analisados por meio de gráficos e tabelas, sendo utilizado ANOVA, seguida de um pós-teste para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro de um mesmo ensaio. Foi adotado nível de significância de 5%. O losartan foi capaz de atuar no aumento da expressão de enzimas, citocinas, quimiocinas e receptores, tais como: AT2, MAS, AT1a, AT1b, AGT, OPG, ALP, PHEX, RUNX2, BGLAP, IL-18, IL-21 e MMPs. Além disso, promoveu a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-10 e $\text{INF}\beta$, indicando assim seu papel anti-inflamatório, dados observados na análise molecular do tecido gengival e ósseo. Macroscopicamente foi confirmado que o tratamento com losartan foi capaz de atenuar a perda óssea. Os achados histológicos corroboram com as análises de MicroCT e RT-PCR. Concluiu-se então que o losartan possui efeito protetor na preservação do periodonto em animais submetidos à DP devido à diminuição de moléculas envolvidas na inflamação.

Palavras-chave: Doença Periodontal. Receptor AT1. Losartan.

ABSTRACT

Assessment of the effects of losartan on experimentally induced periodontal disease in rats

Periodontal disease (PD) comprises a group of lesions that affect the periodontal tissues of protection and support and can lead to tooth loss. Interactions between microbial pathogens and various systems play a critical role in the development and progression of PD through release of various inflammatory and immunological mediators. Recent experiments from our research group have shown that mRNA expression exists for all components of the Renin-Angiotensin System (RAS), presence of renin and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity in rat gingival tissue and that losartan inhibits the bone loss in the experimentally induced PD model in rats. Therefore, the present work aims to investigate the mechanisms by which losartan (AT1 receptor antagonist) has anti-inflammatory effects in the PD model induced experimentally in rats. For this, the PD induction model was used by placing ligation around the lower first molar of rats divided into thirteen groups with 15 animals each, which were treated with losartan (50mg / kg / day) via gavage. The techniques used in this work were: induction of PD in rats, tomographic analysis of alveolar bone loss (MicroCT), 2D analysis using specific software (ImageJ), RT-PCR and histological analysis of periodontal tissue. After the data collection, the data were analyzed by means of graphs and tables, using ANOVA, followed by a post-test to determine the significance of the difference between groups within the same trial. A significance level of 5% was adopted. Losartan was able to increase the expression of enzymes, cytokines, chemokines and receptors, such as AT2, MAS, AT1a, AT1b, AGT, OPG, ALP, PHEX, RUNX2, BGLAP, IL-18, IL-21 and MMPs. In addition, it promoted the reduction of proinflammatory cytokines such as IL-6, IL-10 and INF β , thus indicating its anti-inflammatory role, data observed in the molecular analysis of gingival and bone tissue. Macroscopically it was confirmed that treatment with losartan was able to attenuate bone loss. Histological findings corroborate with MicroCT and RT-PCR analyzes. It was concluded that losartan has a protective effect on the preservation of the periodontium in animals submitted to PD due to the decrease of the molecules involved in the inflammation.

Key words: Periodontal disease. Receptor AT1. Losartan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Principais Componentes do Sistema renina-angiotensina	19
Figura 2.	Grupos 1 a 4- Pré-tratamento por 30 dias em todos os animais destes grupos (15 por grupo), no 31º dia foi realizada a indução da doença periodontal, pós-tratamento por 1, 3, 7 ou 14 dias com losartan (50 mg/kg/dia) e então todos os membros dos grupos foram eutanasiados e suas hemimandíbulas foram separadas para as seguintes técnicas.....	50
Figura 3.	Grupos 5 a 8 - Indução da doença periodontal em todos os animais destes grupos (15 por grupo), seguido de tratamento por 1, 3, 7 ou 14 dias com losartan (50 mg/kg/dia) e então todos os membros dos grupos foram eutanasiados e suas hemimandíbulas foram separadas para as seguintes técnicas.	50
Figura 4.	Grupos 9 a 12 - Indução da doença periodontal em todos os animais destes grupos (15 por grupo), seguido de tratamento por 1, 3, 7 ou 14 dias com água e então todos os membros dos grupos foram eutanasiados e suas hemimandíbulas foram separadas para as seguintes técnicas.....	51
Figura 5.	A e B Sequência da colocação da ligadura na região cervical do primeiro molar inferior. C) O nó foi mantido na região mesial e D) o fio inserido em todas as faces do dente.....	52
Figura 6.	Representação da medida da perda óssea em mandíbula de rato (Software ImageJ).....	54
Figura 7.	Escore Histológico.....	61
Figura 8.	Representação gráfica da perda óssea observada nas mandíbulas dos ratos após a DP, análise realizada com o software ImageJ.....	65
Figura 9.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival dos receptores AT1a, AT1b, AT2 e MAS.	67
Figura 10.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival do Angiotensinogênio, ECA e ECA2.	68
Figura 11.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de RANK, RANKL e OPG.	69
Figura 12.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de ALPL, ALP, PHEX e RUNX2.....	70
Figura 13.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de OCN e BGLAP.	71

Figura 14.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de MIP-1 α	71
Figura 15.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de COX-2, TGF β , CCL2 e CCL3.	72
Figura 16.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de TNF α , Receptor de TNF α , IL-1 α e IL-1 β	73
Figura 17.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de IL-17, IL-18 e IL-21.	74
Figura 18.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de IFN α , IFN β e IFN γ	75
Figura 19.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de IL-6, IL-10 e IL-13.	76
Figura 20.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de MMP2 e MMP9.	77
Figura 21.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de TLR2 e TLR4.	78
Figura 22.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de Catalase e ELA-2.	79
Figura 23.	Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de ALDH.	79
Figura 24.	Representação gráfica da expressão gênica no osso dos receptores AT1a, AT1b, AT2 e MAS.	81
Figura 25.	Representação gráfica da expressão gênica no osso do Angiotensinogênio e das Enzimas Conversoras de Angiotensina 1 e 2.	82
Figura 26.	Representação gráfica da expressão gênica no osso de BGLAP, RANK, RANKL, OPG e OCN.	84
Figura 27.	Representação gráfica da expressão gênica no osso de ALP, PHEX, RUNX2 e ALPL.	85
Figura 28.	Representação gráfica da expressão gênica no osso de COX-2, CCL2 e CCL3.	86
Figura 29.	Representação gráfica da expressão gênica no osso de TNF α e IL-1 β	87
Figura 30.	Representação gráfica da expressão gênica no osso de VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2.	88

Figura 31.	Representação gráfica da expressão gênica no osso de IL-6, IL-10 e Receptor de IL-6.....	89
Figura 32.	Representação gráfica da análise de microCT do volume do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. # vs período correspondente no grupo DP + H2O.....	90
Figura 33.	Representação gráfica da análise de microCT do diâmetro das trabéculas do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.....	90
Figura 34.	Representação gráfica da análise de microCT da distância entre as trabéculas do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.....	91
Figura 35.	Representação gráfica da análise de microCT do número de trabéculas do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.....	91
Figura 36.	Escore histológico representativo dos grupos propostos neste estudo. O escore representa a soma dos parâmetros de Infiltrado Inflamatório, posição de epitélio juncional, grau de reabsorção do cimento e crista óssea alveolar. Os escores estão descritos detalhadamente na figura 16 (a, b, c, d). * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa.....	59
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGT	angiotensinogênio
Ang	angiotensina
AT1	receptor de angiotensina tipo 1
AT1a	receptor de angiotensina tipo 1a
AT1b	receptor de angiotensina tipo 1b
AT2	receptor de angiotensina tipo 2
COX-2	ciclo-oxigenase-2
DP	doença periodontal
ECA	enzima conversora de angiotensina
ECA-2	enzima conversora de angiotensina 2
<i>et al.</i>	e colaboradores
FOB/USP	Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
LPS	lipopolissacarídeo
µL	microlitros
OPG	osteoprotegerina
RANK	receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	ligante do receptor do fator nuclear kapa B
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT	transcrição reversa
RT-PCR	Reverse Transcription – quantitative polymerase chain reaction - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase
SRA	sistema renina-angiotensina
TNF-α	fator de necrose tumoral α
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-R1	receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-R2	receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
PRRs	Pattern Recognition Receptors – Receptores de Reconhecimento de Padrões
TGF	Transforming Growth Factor – Fator de crescimento transformador
TLR	Toll-like Receptor –Receptor Toll-like

IL	Interleucina
IFN	Interferon
MyD88	Myeloid Differentiation factor 88 – Fator de diferenciação mielóide 88
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain – Domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo
NF κ B	Nuclear factor kappa B – Fator nuclear kappa B
MIP-1 α (CCL3)	Proteína inflamatória de macrófago 1 α
MMP-2	Metaloproteinases da matriz 2
MMP-9	Metaloproteinases da matriz 9
PMN	Leucócitos polimorfonucleares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	17
1.1	Doença periodontal (DP)	17
1.2	Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	18
1.2.1	Angiotensinogênio (AGT)	20
1.2.2	Renina	20
1.2.3	Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	20
1.2.4	Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2).....	21
1.2.5	Angiotensina I	21
1.2.6	Angiotensina II.....	21
1.2.7	Receptores da Angiotensina.....	23
1.2.7.1	Receptor AT1.....	23
1.2.7.2	Receptor AT2.....	23
1.2.7.3	Receptor MAS	24
1.2.7.4	Elastase-2.....	25
1.3	Outros alvos que atuam no processo inflamatório.....	25
1.3.1	Ciclooxigenase 2 (COX-2)	25
1.3.2	TGF β	26
1.3.3	Fator Nuclear Kappa B (NF κ B).....	26
1.3.4	Metaloproteinases da matriz (MMP).....	26
1.3.5	Proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1/CCL2).....	26
1.3.6	Proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α /CCL3).....	27
1.3.7	IFN γ , α e β	28
1.4	Interleucinas na Doença Periodontal	28
1.4.1	Interleucina 1 α (IL-1 α)	29
1.4.2	Interleucina 17 (IL-17).....	29
1.4.3	Interleucina 18 (IL-18).....	29
1.4.4	Interleucina 21 (IL-21).....	30
1.4.5	Interleucina 8 (IL-8).....	30
1.4.6	Receptor de IL-8.....	30
1.4.7	Interleucina 10 (IL-10).....	30
1.4.8	Interleucina 13 (IL-13).....	30
1.4.9	Interleucina 1 β (IL-1 β).....	31
1.4.10	Interleucina 6 (IL-6).....	31
1.4.11	Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)	32
1.4.12	TNF-R1	32
1.4.13	Receptores Toll-Like (TLRs)	32
1.4.14	Catalase	33
1.4.15	Aldeído desidrogenase (ALDH).....	33
1.5	Mediadores da remodelação óssea.....	34
1.5.1	Osteoprotegerina (OPG).....	34

1.5.2	Osteocalcina (OCN).....	35
1.5.3	Proteína gama-carboxiglutamato óssea (BGLAP).....	35
1.5.4	Fosfatase Alcalina (ALP)	35
1.5.5	Enzima reguladora de fosfato homólogo a endopeptidases (PHEX).....	36
1.5.6	RUNX2	36
1.5.7	Receptor Ativador de NF-KB (RANK).....	37
1.5.8	Ligante do Receptor Ativador de NF-KB (RANKL)	37
1.6	Mediadores da Angiogênese	38
1.6.1	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).....	38
1.6.2	Receptor 1 e 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-R1 e VEGF-R2).....	38
1.7	Evidências de um Sistema Renina-Angiotensina local em tecidos bucais	39
1.8	Drogas que afetam o SRA.....	39
2	PROPOSIÇÃO	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Animais e caracterização dos grupos experimentais.....	49
3.2	Indução experimental de doença periodontal (DP) por meio da colocação de ligadura.....	51
3.3	Obtenção de espécimes para os diferentes experimentos	53
3.4	Perda Óssea Alveolar	53
3.4.1	Análise Tomográfica	54
3.4.2	Análise realizada no CTAan	55
3.5	Extração do RNA da gengiva	55
3.6	Extração do RNA do osso	56
3.7	Análise da Quantidade e Qualidade do RNA total.....	57
3.8	Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real (gengiva e osso)	58
3.9	Análise Histológica (HE)	60
3.10	Forma de análise dos resultados.....	62
4	RESULTADOS	65
4.1	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PERDA ÓSSEA.....	65
4.2	RESULTADOS DAS ANÁLISES TOMOGRÁFICAS (MICROCT).....	90
4.3	RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	92
5	DISCUSSÃO	97
6	CONCLUSÃO.....	107
	REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Doença periodontal (DP)

A doença periodontal (DP) corresponde a um grupo de doenças inflamatórias que resultam na destruição do periodonto (PIHLSTROM; MICHALOWICZ *et al.*, 2005; KINANE; STATHOPOULOU *et al.*, 2017). São doenças infecciosas e possuem etiologia relacionada a microrganismos gram-negativos podendo manifestar-se de inúmeras maneiras. Estes possuem uma variedade de fatores que permitem o aumento de sua virulência e capacidade de se multiplicarem e persistirem no periodonto (VAN DYKE; SERHAN, 2003). É um dos processos patológicos mais comuns que afeta a dentição humana, sendo que a periodontite generalizada afeta entre 5 a 15% da população mundial (OLIVER, 1998; BURT, 2005).

Uma das principais causas dos processos inflamatórios que afetam o periodonto é o biofilme que se acumula sobre a superfície dentária, o que pode ocasionar inflamação e fibrose gengival, levando à destruição do ligamento periodontal e perda do tecido ósseo alveolar. Conforme a doença progride, os tecidos moles separam-se do tecido ósseo, o que resulta na formação de lesão característica: a bolsa periodontal (WILSON, 1995; VAN DYKE; SERHAN, 2003).

As bactérias causadoras da doença periodontal, como a *Porphyromonas gingivalis* possuem muitos materiais bioativos que induzem as respostas do hospedeiro, incluindo a produção de citocinas que favorecem o processo inflamatório (pró-inflamatórias) (OFFENBACHER, 1996). Dentre estes materiais, o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana, que é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, é capaz de desencadear uma estimulação imunológica e atividade inflamatória (DARVEU *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2008).

Algumas citocinas produzidas pelos fibroblastos do tecido periodontal em resposta ao reconhecimento bacteriano contribuem para o desenvolvimento da reabsorção óssea induzida pelo processo inflamatória 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).

Há alguns anos o nosso laboratório atua com modelos experimentais de inflamação e ação de fármacos e foram encontrados resultados que demonstram a interferência desses fármacos atuantes no sistema renina-angiotensina sob o processo inflamatório na DP. Quando um inibidor da renina (alisquireno) foi administrado aos animais, na dose de 30mg/kg/dia, por 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 capaz de inibir a ECA (enalapril), na dose administrada de 10 mg/kg/dia, não foi capaz de reverter o processo de perda óssea induzida por ligadura ao redor do primeiro molar, o que indica ação de vias alternativas para a formação da Angiotensina II (SANTOS, *et al.* 2015). Em estudo realizado com outro inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), captopril, também não foi possível reduzir a perda óssea alveolar, assim como o enalapril (SANTOS, *et al.* 2015).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O sistema renina-angiotensina (SRA) corresponde a um sistema biológico que está fortemente relacionado ao controle do volume de líquido extracelular e da pressão arterial. Este sistema está relacionado aos processos inflamatórios, pois atua de modo a reverter a tendência à hipotensão arterial por meio da indução de vasoconstricção arteriolar periférica no local inflamado (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

São conhecidos os sistemas renina-angiotensina sistêmico e o local, o sistêmico é capaz de promover a liberação de angiotensina (Ang) II, a qual exerce seus efeitos pela interação com receptores específicos (PEACH, 1977; LEUNG, 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006), descrito há bastante tempo, e o local, descrito mais recentemente desempenha papel importante na homeostase circulatória (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Um dos componentes do sistema, a Ang I é gerada pela ação da renina, enzima produzida nos rins, que age sobre o angiotensinogênio plasmático, que é produzido no fígado, formando o decapeptídeo inativo Ang I, presente em

abundância no endotélio pulmonar, e após devido à ação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA-2) ocorre a liberação do octapeptídeo ativo Ang II que irá interagir com seus receptores e desempenhar algumas funções no organismo.

O SRA é um dos principais sistemas controladores da homeostasia hidroeletrolítica, e o faz por meio da produção e liberação de hormônios, principalmente a aldosterona (ZANCHETTI *et al.*, 1976; NIEMINEN *et al.*, 1981; YOGI *et al.*, 2012). A Ang II tem um importante papel estimulante para a secreção de aldosterona, pela zona glomerulosa do córtex adrenal (RICE; RICHTER, 1943; DE NICOLA *et al.*, 1992).

A Figura 1 demonstra os principais componentes que atuam no sistema renina-angiotensina que foram descritos acima e outros que serão descritos a seguir.

Figura 2. Principais Componentes do Sistema renina-angiotensina

1.2.1 Angiotensinogênio (AGT)

Angiotensinogênio (AGT) é o nome dado à uma proteína α 2 globulina de 452 aminoácidos que é sintetizado no fígado. O RNAm que codifica essa proteína é abundante principalmente no tecido adiposo, em algumas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e nos rins (CAMPBELL; HABENER, 1986; CASSIS; SAVE; PEACH, 1988). Inúmeros hormônios e a própria Ang II estimulam a síntese de AGT (GARRISON, 1988).

1.2.2 Renina

A renina é uma glicoproteína que atua como enzima e possui 340 aminoácidos. Permanece armazenada sob a forma inativa (pró-renina) nas células justaglomerulares renais, localizadas nas paredes das arteríolas aferentes (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Atua clivando o AGT em Ang I.

A diminuição do fluxo sanguíneo relacionada a uma diminuição do sódio estimula a clivagem da pró-renina em renina. A queda da pressão arterial leva a reações intrínsecas nos próprios rins e 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 (mácula densa e 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, ao interagir com os seus receptores renais, inibem 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).

1.2.3 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A ECA é uma enzima que atua clivando Ang 1-9 em Ang 1-7 e Ang I em Ang II. É composta por 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; BERNSTEIN *et al.*, 1989).

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

Esta enzima consiste em uma metaloprotease dependente de zinco com atividade de carboxipeptidase. Possui importante papel na conversão de Ang II em Ang 1-7 e Ang I em Ang 1-9 e vem sendo sugerida como um importante regulador das funções cardíacas e do desenvolvimento celular (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

1.2.5 Angiotensina I

Corresponde a um peptídeo de 10 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), porém diferente da Ang II não possui propriedades vasoconstritoras, ou seja, não produz alterações funcionais significativas na função circulatória, atuando, portanto, apenas como um substrato na formação da Ang II e Ang 1-9 (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006, KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006).

1.2.6 Angiotensina II

A Ang II é o principal peptídeo do SRA (octapeptídeo: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) formado após a clivagem da Ang I e possui diversos efeitos, incluindo o controle da pressão arterial, homeostase hídrica e eletrolítica, além da regulação do crescimento celular (CASSIS *et al.*, 1996, PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Possui importante papel na vasoconstrição e estimulação da secreção de aldosterona, e também ação inotrópica e cronotrópica positiva sobre o coração (PEACH, 1977). Está relacionada também à mitogênese de fibroblastos na pele, síntese de DNA por células do ligamento periodontal, regulação da formação de tecido ósseo, crescimento celular, 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 *et al.*, 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

A Ang II é também um estimulador específico de células mesangiais renais, levando à proliferação e/ou apoptose das células (LODHA S, DANI D, MEHTA R *et al.*, 2002; EFRATI S, BERMAN S, GOLDFINGER N *et al.*, 2007).

Sabe-se que a Ang II pode ser formada a partir da ação da ECA, assim como por outras vias, tais como quimase humana (URATA *et al.*, 1990b) e elastase-2 de rato que agem clivando a Ang I (PAULA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2002a; SANTOS *et al.*, 2002b; SANTOS *et al.*; 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

As primeiras descrições de uma via alternativa de formação de Ang II foram relatadas na década de 70 pelos pesquisadores Boucher, Asselin e Genest (1974) nas glândulas submandibulares de rato, por Cornish, Joyner e Gilmore (1979) na bochecha de hamster e por Trachte e Lefer (1979) no músculo papilar cardíaco de gato. Cornish, Joyner e Gilmore (1979) também observaram a formação de Ang II de forma independente da ECA na artéria coronária de hamster. Okunishi, Miyazaki e Toda (1984) identificaram uma enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina na artéria mesentérica de cão, a qual também é insensível a inibidores da ECA (como por exemplo o captopril). A atividade formadora de Ang II dependente da ação da ECA é responsável somente por aproximadamente 11% da formação total de Ang II (URATA *et al.*, 1990a). 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).

1.2.7 Receptores da Angiotensina

1.2.7.1 Receptor AT1

A ação da Ang II está relacionada ao receptor ao qual esta irá se ligar. Existem quatro subtipos de receptores descritos, são eles: AT1, AT2, AT3 e AT4 (WRIGHT; HARDING, 1994), sendo que a Ang II se liga preferencialmente aos receptores AT1 e AT2 (MALLOW, TRINDL e LOFFLER, 2000). No músculo esquelético vascular, há o receptor AT1, que é um membro da família de receptores ligados à proteína G, possui 7 regiões transmembrânicas com 359 aminoácidos, é um mediador da angiogênese e possui propriedades vasoconstritoras. Já o receptor AT2 tem 363 aminoácidos e possui propriedade vasodilatadora, inibindo, assim, a angiogênese, portanto o receptor AT2 é caracterizado por apresentar efeitos contrários aos efeitos associados ao receptor AT1. 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 das carótidas, por exemplo, 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: AT1a e AT1b (LINDERMAN; GREENE, 2001; PAUL; MEHR; FREUTZ, 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 em casos de aterosclerose e sua inibição, assim como o aumento de AT2, além disso possuem efeito protetor no desenvolvimento da aterosclerose e desordens metabólicas (FUKUDA *et al.*, 2010).

1.2.7.2 Receptor AT2

O receptor AT2, segundo estudos, tem demonstrado efeito anti-inflamatório, antifibrose, antiapoptose e regeneração neuronal, associados a eles, o que pode contrabalançar processos patológicos e permitir a recuperação de doenças

(NAMSOLLECK P *et al.*, 2014). Sua ação anti-inflamatória está relacionada à inibição da atividade do NF- κ B (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 relaciona 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 no infarto do miocárdio melhora a função cardíaca com diminuição da cicatriz e em longo prazo melhora a rigidez cardíaca (KASCHINA *et al.*, 2008). 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).

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). Em casos de 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).

Em tecidos saudáveis, o receptor AT2 é pouco expresso (NAMSOLLECK *et al.*, 2014; STECKELINGS UM, ROMPE F, KASCHINA E, NAMSOLLECK P, GRZESIAK A, FUNKE-KAISER H, *et al.*, 2010).

1.2.7.3 Receptor MAS

O receptor MAS é capaz de interagir com a Ang 1-7 ou outros peptídeos de angiotensina (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006), sendo caracterizado por apresentar efeitos semelhantes aos do receptor AT2, porém contrários aos efeitos associados ao receptor AT1. Tem sido demonstrado com relação aos receptores MAS, assim como os receptores AT2, efeitos anti-inflamatório, antifibrose, antiapoptose e regeneração neuronal (NAMSOLLECK *et al.*, 2014). É caracterizado como um receptor acoplado à proteína G, e originalmente foi descrito como um fator envolvido na tumorigênese (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

1.2.7.4 Elastase-2

A elastase, uma protease serina, é um componente dos grânulos primários do PMN, a qual tem demonstrado causar destruição tissular, estando presente com o aumento da atividade nas áreas de inflamação gengival. A liberação de grânulos secundários pelos PMNs ocorre durante a migração da célula, sendo este processo independente da liberação dos grânulos primários, que se acredita estar correlacionada com a ativação dos PMNs. Foram constatadas diferenças nas quantidades relativas de elastase (componentes dos grânulos primários) e lactoferrina (componente dos grânulos secundários) em áreas com categorias diferentes da doença. Uma proporção maior de lactoferrina em relação à elastase foi encontrada nas áreas com periodontite (ALVES, 2007). Consiste na principal enzima formadora de angiotensina II no perfusato do leito arterial mesentérico de rato, capaz de clivar a Ang I em Ang II (PAULA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2002a; SANTOS *et al.*, 2002b; SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

1.3 Outros alvos que atuam no processo inflamatório

1.3.1 Ciclooxygenase 2 (COX-2)

A COX-2 é uma enzima responsável pela formação da prostaglandina E2 a partir do ácido araquidônico, regula a angiogênese, é expressa constitutivamente no corno dorsal do cordão espinhal e é mais expressa durante o processo inflamatório. Além disso, aumenta a permeabilidade vascular e promove uma quimioatração de macrófagos. Evidências sugerem que a expressão da COX-2 pode facilitar a transmissão de impulsos nociceptivos (RAMER; BRUNE, 2001).

A COX-2 tem um papel fisiológico nas funções renais. A COX-2 constitutiva foi encontrada 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).

1.3.2 TGF β

Capaz de induzir a transcrição de diversos genes que recrutam a diferenciação celular, quimiotaxia, proliferação e ativação de várias células imunológicas (MASSAGUÉ, 2012). TGF β participa na diferenciação dos linfócitos T em Th17 que possui importante função imunológica por conferir proteção contra patógenos. Além disso, parece promover efeitos inibitórios em linfócitos B. Por fim, nos macrófagos promove estímulo nos monócitos (pré-macrófago) e inibe macrófago ativado. Em monócitos promove ainda função quimioatraente, pois há aumento da expressão de citocinas inflamatórias (KUBICZKOVA, 2012).

1.3.3 Fator Nuclear Kappa B (NF κ B)

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

1.3.4 Metaloproteinases da matriz (MMP)

As metaloproteinases da matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) exercem ações pró e anti-inflamatórias, que estão associadas com rigidez arterial e hipertensão essencial (ZHOU, *et al.* 2007).

1.3.5 Proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1/CCL2)

Consiste em uma proteína capaz de atrair monócito, recrutadora de células T (memória) e células dendríticas para os locais de inflamação e infecção. Pode ser encontrada nos sítios de erupção dentária e degradação óssea. Possui também um papel na diferenciação de osteoclastos (KIM, 2005).

Esse gene é um dos vários genes de citocinas agrupados no braço q do cromossomo 17. As quimiocinas são uma superfamília de proteínas secretadas envolvidas em processos imunorregulatórios e inflamatórios. A superfamília é dividida em quatro subfamílias com base na disposição dos resíduos de cisteína N-

terminais do péptido maduro. Esta quimiocina é um membro da subfamília CC que é caracterizada por dois resíduos de cisteína adjacentes. Esta citocina apresenta atividade quimiotática para monócitos e basófilos, mas não para neutrófilos ou eosinófilos. Foi implicado na patogênese de doenças caracterizadas por infiltrados monocíticos, como psoríase, artrite reumatoide e aterosclerose. Esta proteína liga-se aos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR4.

1.3.6 Proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α /CCL3)

Entre as quimiocinas, CCL2, CCL3 e CCL5 têm um papel importante na osteoclastogênese e seus níveis são aumentados nos tecidos periodontais após a aplicação de uma força ortodôntica. Como o efeito destas quimiocinas é mediado pela ligação aos seus receptores, nesta tese objetivou-se investigar o papel das quimiocinas e receptores CCL3/CCR1/CCR5 e CCL2/CCR2 no recrutamento e ativação dos osteoclastos.

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

O membro CCL3 da família da proteína inflamatória para macrófago-1 (MIP-1) é decodificado por genes localizados no cromossomo 11 (MENTEN; WUYTS; VAN DAMME, 2002 apud SIPERT, 2007). Células diretamente envolvidas na resposta imune como macrófagos, linfócitos T e B, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos e células NK (Natural Killer) são capazes de produzir grandes quantidades de MIP-1. A produção de MIP-1 pode ser induzida por diversos agentes pró-inflamatórios, LPS, substância P, infecções virais, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α/β . Outras citocinas como IL-4 ou

IL-10 podem levar a uma diminuição da produção de MIP-1 (MAURER; STEBUT, 2004; SIPERT, 2007).

1.3.7 IFN γ , α e β

Produzido por leucócitos e fibroblastos, importante na interferência da replicação de fungos, vírus e bactérias, além de estimular a defesa de outras células. IFN α é produzido por leucócitos nas infecções virais, IFN β é produzido por fibroblastos, reduz a apresentação de antígenos por linfócito T (MANKOWITZ, 2007). IFN γ é um importante ativador de macrófagos, é naturalmente produzido por células NK (SCHOENBORN, 2007), promove a atividade das células NK e a migração de leucócitos.

1.4 Interleucinas na Doença Periodontal

Citocinas são proteínas solúveis, secretadas por células, que agem como mensageiras capazes de emitir sinais para outras células. Elas realizam diversas ações, dentre as quais incluem a iniciação e manutenção das respostas imune e inflamatória e a regulação do crescimento e diferenciação das células. Interleucinas são membros importantes do grupo das citocinas e encontram-se envolvidas, principalmente, na comunicação entre os leucócitos e outras células que participam dos processos imune e inflamatório, como as epiteliais, endoteliais e os fibroblastos. Estas moléculas são liberadas em pequenas quantidades e possuem ações variadas sobre as células que carregam o receptor específico para esta citocina. As citocinas são numerosas, muitas realizam funções que se sobrepõem e são encadeadas, formando uma rede ativa que controla a resposta do hospedeiro. O controle da liberação e da ação da citocina é complexo e envolve inibidores e receptores. Muitas citocinas são capazes de agir sobre a célula que as produziu, auto-estimulando sua própria produção e a produção de outras citocinas (ALVES, *et al.* 2007).

Vários mediadores inflamatórios como as interleucinas 1, 6 e 8, TNF- α , prostaglandinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidos na doença periodontal (FENTOGLU *et al.*, 2011). Segundo Sugawara *et al.* (2002) para a

compreensão da periodontite pode-se avaliar fibroblastos gengivais que expressam naturalmente grandes quantidades de mediadores inflamatórios tais como TNF e IL-6. Noh *et al.* (2014) relatam 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 doença periodontal, algumas como as interleucinas, IL-1 e IL-6, quando inibidas diminuem o processo inflamatório, além de diminuir a perda de tecido conjuntivo e a perda óssea (BAKER *et al.*, 1999; DELIMA *et al.*, 2002).

1.4.1 Interleucina 1 α (IL-1 α)

Produzida por macrófagos ativados, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais tendo então, importante função no processo inflamatório. Quando ligada ao seu receptor, ativa TNF α . A interleucina 10 (IL-10) tem ação inibitória sobre a IL-1 α (MOORE, 1993).

1.4.2 Interleucina 17 (IL-17)

Possui ação pró-inflamatória é produzida essencialmente por células T helper. Uma vez produzida promove quimiotaxia de monócitos e neutrófilos e age de forma semelhante ao TNF α e IL-1 (CHIRICOZZI, 2011). Há trabalhos que relatam que em fluido gengival peri-implantar há aumento de IL-17, IL-6 e IL-33 em comparação com o controle (SEVERINO, 2016).

1.4.3 Interleucina 18 (IL-18)

É uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e outras células. Possui ação de estimular células NK e células T, além de mediar a produção de IFN γ . Em análise de gengivite e periodontite de população indiana, IL-17 e IL-18 mostraram-se significativamente aumentados (CHITRAPRIYA, 2015).

1.4.4 Interleucina 21 (IL-21)

A IL-21 é uma potente citocina regulatória das células imunes (NK e células T), relacionada com periodontite crônica em pacientes colombianos (ISUZ-GUZMAN, 2015).

1.4.5 Interleucina 8 (IL-8)

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória bem conhecida que age como um quimioatrativo de neutrófilos e um ativador de células T. Em um estudo realizado tendo como modelo experimental humor vítreo de pacientes com retinopatia, a hipóxia induz a síntese de IL-8 por células endoteliais e gliais (KWON; JEE, 2018).

1.4.6 Receptor de IL-8

O receptor de IL-8 é um membro da superfamília da proteína G que contém sete domínios transmembrana (STRADER, *et al.* 1991),

1.4.7 Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica que exerce imunoregulação. Possui ação imunossupressora envolvida na iniciação e progressão do câncer, há relatos que a baixa expressão de IL-10 suprimiu a fagocitose de macrófagos, contribuindo assim para a disseminação de células cancerosas (MANNINO *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2018). Em um estudo que o gene IL10 de camundongo foi transferido para células de melanoma humano, a IL-10 inibiu crescimento de células cancerosas, bem como diminuiu a metástase e angiogênese (WALOS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2018).

1.4.8 Interleucina 13 (IL-13)

Possui efeito anti-inflamatório, promove a maturação, ativação e migração de eosinófilos. Em um estudo relacionando agentes moleculares com doenças

cutâneas, foi possível constatar a IL-13 aumenta nas lesões cutâneas e no sangue de pacientes com dermatite atópica (KAUFMAN; ALEXIS, 2018).

1.4.9 Interleucina 1 β (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 . A IL-1 β induz a liberação de mediadores secundários, do mesmo modo que um número de citocinas inflamatórias, metabólitos do ácido araquidônico e óxido nítrico (MONTÓN *et al.*, 1998).

1.4.10 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, que regula as respostas imunes e inflamatórias. Embora a IL-6 tem sido relatada como sendo um regulador principal de proteínas de fase aguda da inflamação (MACKIEWICZ, 1997; KWAN *et al.*, 2004), outras citocinas, tais como IL-1 e TNF- α também participam da indução de um largo subconjunto de proteínas durante o processo inflamatório (MACKIEWICZ, 1997). 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 uma participação destas citocinas em lesões inflamatórias, especialmente a periodontite (SIPE, 1995; MACKIEWICZ, 1997; TAGA; KISHIMOTO, 1997; KWAN *et al.*, 2004; BARKSBY *et al.*, 2007).

1.4.11 Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina, que atua na necrose hemorrágica do tecido e possui efeito antitumoral. É considerada uma das principais citocinas envolvidas na progressão da inflamação na doença periodontal, auxilia na destruição do tecido e na perda óssea decorrente da doença (BOSTRÖM; LINDER; BERGSTRÖM, 1998). É produzida por monócitos e macrófagos em resposta a componentes bacterianos orais, tais como lipopolissacarídeos (LPS) (BROOK, 2006; KURIYAMA *et al.*, 2006). Quando os níveis de TNF- α aumentam 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).

Além disso, TNF- α tem um importante papel na regulação da osteoclastogênese (CHEN *et al.*, 2014). Em níveis elevados representa maior risco de doenças cardiovasculares, levando, na inflamação, à remodelação vascular (PACURARI *et al.*, 2014).

1.4.12 TNF-R1

Receptor de TNF envolvido nos processos de apoptose e processos inflamatórios (GAUR, 2003).

1.4.13 Receptores Toll-Like (TLRs)

Dentre os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) os mais estudados são os receptores Toll-Like (TLRs). Já é sabido que fibroblastos gengivais humanos (HGF) expressam receptores do tipo Toll (TLR) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, além de expressarem a proteína de diferenciação mieloide (MD-2), a molécula adaptadora do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), receptores da família NLR, e também que fibroblastos do ligamento periodontal (HPLF) expressam TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2 (TANG *et al.*, 2011).

TLRs são receptores-sentinela e sua estimulação culmina com a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF-KB) e fatores reguladores e

interferon (IRFs), que promovem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outras proteínas que promovem a defesa do hospedeiro (MIGGIN; O'NEILL, 2006). TLR4 é capaz de reconhecer o lipídeo A, uma parte da molécula dos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. TLR2 pode reconhecer vários componentes microbianos, incluindo lipoproteínas, peptidoglicanos, ácido lipoteiólico, fímbria e também alguns LPS.

Recentemente, Nair *et al.* (2015) observaram que TLR4 e HMGB1, um ligante endógeno desse receptor, encontram-se elevados em células epiteliais do túbulo renal de rato após o tratamento com Ang II e que a supressão dessas moléculas, atenuam a inflamação dessas células induzidas por este peptídeo. Estes autores também constataram que o uso de Losartan, atenuou a inflamação mediada por TLR4, reduzindo os níveis de RNAm de TLR4, HMGB1, TNF- α e IL-1 β por PCR e também de suas respectivas proteínas por Western Blot.

1.4.14 Catalase

A catalase decompõe especificamente o peróxido de hidrogênio em água e O₂ (FARBER; KYLE; COLEMAN, 1990). A importância dessa função consiste no fato do peróxido de hidrogênio ser uma substância tóxica para as células. A catalase produz água e oxigênio, duas substâncias que não trazem prejuízos ao organismo.

Ao realizar a decomposição, a catalase neutraliza a ação tóxica do peróxido de hidrogênio e equilibra a sua produção no organismo.

A função da catalase é importante para a atividade dos rins e fígado. Nesses órgãos existem numerosos peroxissomos responsáveis pela desintoxicação do organismo. No fígado, os peroxissomos e a ação da catalase auxiliam a produção de sais biliares e a neutralização de substâncias tóxicas. A catalase é uma enzima produzida por quase todos os organismos vivos (BORGES, 2003).

1.4.15 Aldeído desidrogenase (ALDH)

A primeira etapa de oxidação do etanol em acetaldeído ocorre principalmente no fígado por meio da enzima ADH, existente no citosol do sistema microsomal oxidante do etanol (SMOE), localizado no retículo endoplasmático liso e por meio de

catalases existentes nos peroxissomas. Na segunda etapa, a conversão do acetaldeído em acetato e água, é feita principalmente pela ALDH presente no citosol e na matriz mitocondrial do hepatócito (BRENNAN *et al.*, 2004).

O gene ALDH localiza-se no braço longo do cromossomo 12 (12q24.2). Os ALDHs são expressos em maior quantidade nos tecidos do que as isoenzimas ADHs. As enzimas ALDH desempenham uma função importante no metabolismo de muitas moléculas, incluindo certas gorduras (colesterol e outros ácidos graxos) e aminoácidos também. Além disso, estas enzimas desempenham um importante papel na desintoxicação de certas substâncias, tais como álcool, poluentes e toxinas que se formam no interior das células (VASILIOU & NEBERT, 2005). Os genes ALDH estão subdivididos em 3 classes distintas (I a III). A classificação é baseada nas suas propriedades cinéticas e similaridades nas sequências (GREENFIELD & PIETRUSZKO, 1977).

1.5 Mediadores da remodelação óssea

Marcadores ósseos são ferramentas úteis para a compreensão do mecanismo de ação de agentes terapêuticos no osso, em ensaios clínicos. Em um ambiente clínico, eles são úteis para monitorizar a resposta ao tratamento e identificar possíveis causas de osteoporose secundária. No presente estudo, a ação dos mediadores da remodelação óssea foi verificada localmente, mas para fins de contextualização, eles serão brevemente descritos abaixo.

1.5.1 Osteoprotegerina (OPG)

OPG é um antagonista dos 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, 1999; SUDA, 1999). 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. OPG protege o esqueleto da reabsorção óssea excessiva (UDAGAWA, 1999; SUDA, 1999).

1.5.2 Osteocalcina (OCN)

A osteocalcina (OCN) é uma proteína sintetizada por osteoblastos e osteoclastos, cuja importância vai além da manutenção da homeostase óssea, esta se revela como a principal proteína não colágena produzida por essas células. Seu papel é regular a organização da matriz extracelular através da interação com a HÁ, matriz proteica e receptores de superfície (LOMBARDI *et al.*, 2015). A formação, o desenvolvimento e a manutenção do tecido ósseo são processos complexos altamente regulados (NIJWEIDE *et al.*, 1986). Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (DUCY *et al.*, 2000). Entre as proteínas envolvidas nesse processo, podemos destacar a osteocalcina (OCN), que é a proteína não-colagenosa mais abundante do osso que estimula a mineralização óssea (BOSKEY *et al.*, 1998).

1.5.3 Proteína gama-carboxiglutamato óssea (BGLAP)

Este gene codifica uma proteína óssea altamente abundante secretada por osteoblastos que regulam a remodelação óssea e o metabolismo energético. A proteína codificada contém um domínio Gla (gama carboxiglutamato), que funciona na ligação ao cálcio e hidroxiapatita, o componente mineral do osso. Os níveis séricos de osteocalcina podem estar negativamente correlacionados com a síndrome metabólica. As doenças associadas ao BGLAP incluem osteíte fibrosa e osteoporose Induzida por glicocorticoides (GAO, *et al.* 2016).

1.5.4 Fosfatase Alcalina (ALP)

Na superfície dos osteoblastos há receptores para ALP que quando ativados aumentam a atividade osteoblástica, com isso, possui função de marcador para

formação óssea, há relatos de aumento de ALP na periodontite (MASAKAZU NAKAMURA, 1983).

As fosfatases alcalinas são glicoproteínas ligadas à membrana que hidrolisam vários ésteres de monofosfato a um pH ótimo (WEISS *et al.*, 1986). A fosfatase alcalina hepática / óssea / renal, também conhecida como fosfatase alcalina não específica de tecido, atua fisiologicamente como fosfoetanolamina ancorada em lípidos (PEA) e ectofosfatase de fosfato de piridoxal-5 (PLP) (FEDDE E WHYTE, 1990). A ALP é expressa em níveis relativamente altos em osteoblastos e em menor grau nos fibroblastos, leucócitos e células de vários outros tecidos, incluindo fígado, rim, mama e cérebro. Pouco é conhecido sobre a função fisiológica dos ALPs na maioria dos tecidos, exceto que a isoenzima óssea tem sido ter um papel na mineralização esquelética normal (ROBINSON, 1923).

A fosfatase alcalina tem-se mostrado como um enzima indispensável para a mineralização da matriz secretada, fornece íons fosfato que geram a precipitação de minerais e hidrolisa o pirofosfato orgânico, um éster fosfato capaz de inibir a mineralização (WOLTGENS, *et al.*, 1995).

A fosfatase alcalina óssea é uma enzima associada à maturação da matriz e é responsável por cerca de metade da fosfatase alcalina total na circulação. A fosfatase alcalina total é um marcador adequado para a avaliação de doenças ósseas metabólicas associadas a grandes alterações na remodelação óssea, tais como a doença óssea de Paget. No entanto, a isoenzima da fosfatase alcalina óssea é mais específica e pode detectar alterações mais sutis da remodelação óssea (HOCHBERG, *et al.*, 2011).

1.5.5 Enzima reguladora de fosfato homólogo a endopeptidases (PHEX)

Enzima encontrada na mineralização óssea. A osteopontina (OPN) que inibe a mineralização do osso é substrato para a PHEX (BARROS, 2013). A ausência ou a deficiência de PHEX pode contribuir para a osteomalácia (BARROS, 2013).

1.5.6 RUNX2

Runx2 é um gene mestre da diferenciação de osteoblastos, como demonstrado pelo fato de que camundongos nulos Runx2 são desprovidos de osteoblastos (KOMORI, *et al.* 1997; DUCY *et al.*, 1997). Runx2 demonstrou aumentar a expressão de genes relacionados a osteoblastos como CollA1, ALP, BSP, BGLAP e OCN.

1.5.7 Receptor Ativador de NF-KB (RANK)

RANK é uma proteína de membrana do tipo I que se expressa na superfície de osteoclastos e em células dendríticas facilitando a sinalização imunológica, associado 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 RANKL liga-se ao RANK, induz diferenciação das células precursoras de osteoclastos (LACEY *et al.*, 1998) e a reabsorção óssea periodontal.

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

RANKL é expresso na membrana de células do estroma da medula óssea (osteoblastos imaturos), sua principal função é estimular a diferenciação dos osteoclastos e inibir a apoptose dos mesmos. Pode ser libertado 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. A razão da expressão de RANKL e OPG tem um papel importante no controle dos graus de reabsorção ou densidade óssea uma vez que a OPG bloqueia a interação entre RANK e RANKL. O RANKL é considerado um estimulador poderoso da reabsorção óssea ao ligar-se ao RANK, tendo um papel oposto quando se liga 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 Mediadores da Angiogênese

1.6.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

VEGF é uma macromolécula de importância na inflamação por atuar na angiogênese e tem sido implicada na progressão da periodontite (FERRARA; GERBER; LECOURTER, 2003). É uma das substâncias mais potentes para induzir o crescimento de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (FERRARA, 1999; FERRARA, 2005). 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. A expressão do VEGF desregulada contribui para a etiologia de várias doenças que são caracterizadas por angiogênese anormal (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Quando aumenta VEGF ocorre um aumento da permeabilidade vascular.

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

Tanto o VEGF quanto seus receptores (VEGF-R1 e VEGF-R2) são peças-chave na angiogênese e também estão envolvidos em certos progressos patológicos, tais como a periodontite e a perda óssea proporcionada por estas. A angiogênese é crítica para a progressão da doença periodontal e a reabsorção óssea é uma característica da periodontite. No entanto, a sua localização (VEGF e VEGF-R), suas vias de sinalização em periodontite apical humana ainda não foram totalmente elucidadas (VIRTEJ *et al.*, 2013).

O VEGFR-1 e o VEGFR-2 são tirosina quinases receptoras intimamente relacionadas e possuem ligantes comuns e específicos. O VEGFR-1 é um RTK com deficiência de quinase, enquanto o VEGFR-2 é uma quinase altamente ativa. Apesar de seus potenciais diferenciais de ativação de quinase, tanto o VEGFR-1 quanto o VEGFR-2 são necessários para o desenvolvimento normal e angiogênese. O VEGFR-1 regula a angiogênese por mecanismos que envolvem aprisionamento de

ligante, homo e heterodimerização do receptor. O VEGFR-2 estimula a variedade de vias de sinalização e amplas respostas biológicas *in vitro*. Os mecanismos que governam a ativação do VEGFR-2, sua capacidade de recrutar proteínas sinalizadoras e de sofrer uma regulação negativa são altamente regulados pelo seu terminal carboxila (RAHIMI, 2006).

1.7 Evidências de um Sistema Renina-Angiotensina local em tecidos bucais

Diversos estudos têm demonstrado a existência de um SRA local, agindo não apenas como um sistema endócrino, mas exercendo funções parácrinas e autócrinas (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

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

Lima *et al.*, (2011) demonstrou em seu estudo que há indícios da enzima Elastase-2 no tecido gengival de ratos.

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).

Com isso, acredita-se que as mudanças que venham a ocorrer no SRA tecidual 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).

Santos *et al.*, (2015) comprovaram que a inibição da renina (alisquireno) e um antagonista de receptor AT1 (losartan) bloqueiam significativamente a perda óssea alveolar em ratos com DP. Além disso, comprovaram que o SRA não está apenas presente localmente, mas é funcional localmente tanto no tecido periodontal humano como em ratos. Além disso, o bloqueio de AT1R e renina pode prevenir significativamente a perda óssea experimentalmente induzida em ratos.

1.8 Drogas que afetam o SRA

As drogas que atuam no SRA são utilizadas com o intuito de controlar a pressão arterial a fim de evitar problemas como a hipertensão arterial e a falência cardíaca. Dentre as drogas que atuam no SRA mediando este controle da pressão arterial, há drogas que atuam inibindo a ECA, antagonizando os receptores de Ang II ou inibindo a renina.

Losartan é um antagonista do receptor de Ang II e é considerado o primeiro antagonista do receptor de Ang II sem propriedades agonistas, tendo efeito efetivo na redução da pressão arterial e útil na diminuição da progressão da nefropatia devida ao diabetes (SICA *et al.*, 2005). Após administração via oral, este fármaco é rapidamente absorvido, chegando a atingir sua concentração máxima de 1 a 2 horas após ingestão. É administrado como uma pró-droga, o que quer dizer que sofre ativação após conversão em seu metabólito E3174. Sabe-se que antagonistas dos receptores AT1, como Losartan e também inibidores da ECA, ao bloquearem o SRA, além da diminuição da pressão arterial, reduzem o estresse oxidativo principalmente por prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (CAVANAGH *et al.*, 2010; CAPETTINI *et al.*, 2012).

Há amplas evidências sugerindo que a supressão dos componentes do SRA proporcionam benefícios em usos crônicos, ou seja, a longo prazo, via redução da pressão intraglomerular, diminuição da proteinúria, e também inibe a inflamação intersticial e os efeitos fibróticos (EFRATI *et al.*, 2012).

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

O bloqueio dos receptores AT1 por antagonismo inibe a contração da musculatura lisa vascular causada pela angiotensina II assim como previne e reverte todos os seus demais efeitos conhecidos. Como consequência, ocorre vasodilatação, excreção de sódio e diminuição da atividade noradrenérgica. O antagonismo do receptor AT1 reduz os efeitos de ativação desse receptor como, por exemplo, proliferação celular, crescimento tecidual e aumento da secreção de aldosterona. (MAGALHÃES, 2006; MELCHIORS, 2008). Uma vez que estes antagonistas somente bloqueiam os receptores AT1, não interferem com as respostas fisiológicas resultantes da estimulação crônica dos receptores tipo II (e

outros) que poderiam resultar em aumento de renina ou liberação de angiotensina (MUSCARÁ; RIBEIRO, 2001).

Desse modo, se faz de extrema importância o estudo dos medicamentos que interferem no SRA, ao passo que, estes têm se mostrado importantes para o tratamento da hipertensão, problemas cardíacos e outras patologias, pois há diversos benefícios clínicos relacionados a esses medicamentos que podem influenciar o processo inflamatório como o gerado pela doença periodontal.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho foi elucidar os mecanismos moleculares dos efeitos anti-inflamatórios do losartan no modelo de doença periodontal induzida experimentalmente em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e caracterização dos grupos experimentais

Foram utilizados 195 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, machos, com massa inicial entre 200 e 250 g (aproximadamente 60 dias). Esta espécie foi escolhida devido à facilidade de manuseio e o ciclo de vida relativamente curto, características estas que auxiliam no desenvolvimento de estudos com este modelo experimental. Ratos com aproximadamente 60 dias já possuem características fisiológicas de um indivíduo na fase adulta, o que era necessário já que pretendia-se estudar os efeitos do losartan em um modelo de doença periodontal previamente estabelecido. Para essa análise seria importante que estes animais possuísem o ponto de contato entre os molares bem estabelecido, o que ocorre na fase adulta.

Os grupos do estudo foram: **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H₂O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia), via gavagem, por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. Segue abaixo a descrição de cada um dos grupos do presente trabalho (Figuras 2 a 4).

Figura 2. Grupos 1 a 4- Pré-tratamento por 30 dias em todos os animais destes grupos (15 por grupo), no 31º dia foi realizada a indução da doença periodontal, pós-tratamento por 1, 3, 7 ou 14 dias com losartan (50 mg/kg/dia) e então todos os membros dos grupos foram eutanasiados e suas hemimandíbulas foram separadas para as seguintes técnicas.

Figura 3. Grupos 5 a 8 - Indução da doença periodontal em todos os animais destes grupos (15 por grupo), seguido de tratamento por 1, 3, 7 ou 14 dias com losartan (50 mg/kg/dia) e então todos os membros dos grupos foram eutanasiados e suas hemimandíbulas foram separadas para as seguintes técnicas.

Figura 4. Grupos 9 a 12 - Indução da doença periodontal em todos os animais destes grupos (15 por grupo), seguido de tratamento por 1, 3, 7 ou 14 dias com água e então todos os membros dos grupos foram eutanasiados e suas hemimandíbulas foram separadas para as seguintes técnicas.

Grupo 13: Grupo Controle (15 animais). Não submetido à indução da doença periodontal.

3.2 Indução experimental de doença periodontal (DP) por meio da colocação de ligadura

Para que ocorresse a manipulação dos animais desse trabalho, foi seguida a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da FOB/USP (Processo nº 020/2016 – Ofício de Aprovação em Anexo).

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de xilazina (Dopalen® - 0,4 mL/kg e Anasedan® - 0,02 mL/kg, via intramuscular (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Os animais vieram do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto Credenciado da Rede USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto), divididos em treze grupos com 15 animais por grupo.

A ligadura consistiu em fio de seda preta 3-0 (Ethicon) estéril e foi colocada na região cervical do primeiro molar inferior direito, tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival, portanto em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial (GYÖRFI *et al.*, 1994; LOHINAI *et al.*, 1998) (Figura 5).

Os ratos permaneceram com o fio por 1, 3, 7 e 14 dias e foram tratados com água ou Losartan (50mg/kg/dia). Houve animais que além de tomarem a medicação durante o período da DP, fizeram tratamento prévio a indução da DP por 30 dias.

Figura 5. A e B Sequência da colocação da ligadura na região cervical do primeiro molar inferior. C) O nó foi mantido na região mesial e D) o fio inserido em todas as faces do dente.

Os ratos de todos os grupos foram mantidos no biotério central da FOB/USP e alimentados com ração normal e água *ad libitum*.

As doses das drogas foram ajustadas de acordo com a pesagem diária dos animais, a fim de assegurar a dosagem correta, de acordo com o peso, para cada grupo experimental.

3.3 Obtenção de espécimes para os diferentes experimentos

Para o acompanhamento da progressão da DP, os animais dos treze grupos sofreram eutanásia com dose excessiva de anestésico, durante os tempos citados, procedendo-se à obtenção de espécimes para os diferentes experimentos.

Imediatamente após a morte dos animais, a mandíbula foi removida e separada em duas hemimandíbulas. Os materiais destinados à análise da perda óssea alveolar tiveram os tecidos gengivais circundando os primeiros molares inferiores deslocados, acondicionados em solução estabilizante (RNAlater, Thermo Fisher Scientific, USA, catálogo #7021) em tubos de microcentrífuga e congelados na temperatura de -80°C , para realização posterior de experimentos envolvendo as técnicas de: análise de perda óssea alveolar, análise tomográfica (MicroCT) e análise microscópica (H&E). A mandíbula foi limpa com peróxido de hidrogênio 10 volumes, na sequência coradas com azul de metileno 1%, fotografadas e a área da perda óssea, área compreendida entre a junção amelo-cementária e as cristas ósseas alveolares mesial e distal, analisada por meio do software ImageJ (versão 1.48, USA).

A gengiva previamente acondicionada na solução estabilizante foi utilizada para a extração do RNA total com o uso do MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA, #A27828) e do pipetador automatizado (Nimbus, Hamilton, USA). Na sequência o RNA total foi transcrito para cDNA como o uso do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA, #4368813). O cDNA foi amplificado para diversos alvos com ensaios previamente fabricados e validados pela empresa Thermo Fisher Scientific.

3.4 Perda Óssea Alveolar

O procedimento de análise de área de perda óssea foi baseado em dados mensurados pelo software, ImageJ versão 1.48 (Figura 6), USA o qual calcula a área de perda do tecido ósseo de forma bidimensional. Para isso foi necessário corar as hemimandíbulas com azul de metileno e fotografá-las, para que posteriormente fossem analisadas. Os analisadores (três) trabalharam nas análises de modo que

fosse reduzido ao máximo o erro entre estes através da média das áreas obtidas. Para isso foi removida a hemimandíbula do lado que foi induzida a doença periodontal dos animais com a doença e dos animais do grupo controle, esses dados foram tabulados e foi estabelecida a média de tecido ósseo entre os analisadores.

Figura 6. Representação da medida da perda óssea em mandíbula de rato (Software ImageJ).

3.4.1 Análise Tomográfica

Após a eutanásia, a mandíbula foi removida e separada em duas hemimandíbulas, estas foram higienizadas e o tecido gengival foi removido para uso em outras técnicas. Já sem o tecido gengival elas foram devidamente higienizadas com utilizando-se de água oxigenada 10 volumes e armazenadas para a verificação de perda de tecido ósseo via análise tomográfica, no equipamento Skyscan 1176 High resolution in vivo Micro CT system, que se trata de um equipamento com registro multiusuário pela FAPESP, o qual foi utilizando mediante agendamento prévio com a equipe do Laboratório da UNESP de Araraquara. As imagens foram reconstruídas com o software NRecon (v1.6, Bruker microCT), alinhadas tridimensionalmente com o software DataViewer (v1.5.1.2, Bruker microCT), analisadas com o software CT Analyser (v1.13, Bruker microCT), e então foram geradas as imagens tridimensionais representativas de cada grupo foram feitas por meio do software CTvox (v3.0, Bruker microCT).

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad software, San Diego, CA). Foram determinadas as estatísticas descritivas para cada variável em questão. Foi utilizado o teste t de Student e o nível de significância estatística considerado para o estudo foi de 5%.

3.4.2 Análise realizada no CTAan

O software CT Analyser (CTAn) é um software de análise utilizado após a obtenção das imagens no tomógrafo, este software foi utilizado para obtenção de uma região de interesse (ROI) que foi padronizada a partir de pontos anatômicos determinados (limite superior: teto da furca e limite inferior: 40 fatias a partir do teto). Foi levado em consideração o espaço existente entre as quatro raízes do 1° molar inferior direito. O volume de interesse (VOI) na área em questão foi delimitado automaticamente pelo software de análise, considerando as bordas do osso alveolar na região de interesse. Dentre os parâmetros considerados para a análise tomográfica estão: o volume ósseo, a porcentagem de osso no ROI (BV/TV), número (Tb.N), espessura (Tb.Th) e separação (Tb.Sp) de trabéculas (BOUXSEIN, BOYD *et al.* 2010; BRITO, 2018).

3.5 Extração do RNA da gengiva

A gengiva que fora previamente acondicionada na solução estabilizante foi utilizada para a extração do RNA total com o uso do MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA, #A27828), para a realização dessa análise também foi utilizado o pipetador automatizado (Nimbus, Hamilton, USA).

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.

3.6 Extração do RNA do osso

Diferente de trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, foi de interesse do presente trabalho realizar a extração do RNA do osso para que fosse possível compreender os mecanismos que ocorrem no osso e no tecido gengival simultaneamente.

A extração de RNA total foi realizada com reagente Trizol LS (Invitrogen™), com protocolo adaptado a partir do recomendado pelo fabricante. As amostras de hemimandíbulas foram pulverizadas em nitrogênio líquido, posteriormente foi adicionado ao pó 3 mL do reagente Trizol LS, para homogeneização com o tecido. O homogenato foi transferido para um tubo de 2 mL e centrifugado para clarificação da amostra de partículas de osso não homogeneizadas (14000 RCF, 20 minutos; 4 °C). O volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, ao qual foi adicionado 300 µL de clorofórmio, seguido de vigorosa homogeneização em agitador vórtex (2800 rpm; 20 segundos) e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (7500 RCF; 5 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi coletada (400 µL) em um tubo limpo. Aos tubos, foi adicionado mais 1 mL de Trizol LS e 300 µL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas (12000 RCF; 15 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi novamente coletada (400 µL) em um tubo limpo.

A partir deste momento visando a obtenção de um material puro, foi feito o uso do kit PureLink RNA Mini Kit da Life Technologies, seguindo o passo da purificação de RNA. Foi adicionado um volume de etanol a 70% a cada volume de homogeneizado celular, então foi levado ao vórtex por alguns segundos para misturar completamente e para dispersar qualquer precipitado visível que possa se formar após a adição de etanol.

Foi transferido 700 microlitros da amostra (incluindo o precipitado restante) para o cartucho de rotação (com o tubo de coleta). O tubo foi transferido para a centrífuga a 12.000 x g durante 15 segundos à temperatura ambiente. Em seguida, foi reiniciado o fluxo e reinsira o cartucho de giro no mesmo tubo de coleta.

Em seguida foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem I ao cartucho de rotação e centrifugado a 12.000 x g durante 15 segundos à temperatura ambiente, após a centrifugação foram descartados o fluxo e o tubo de coleta. E então foi colocado o cartucho de rotação em um novo tubo de coleta e adicionado 500 µL de tampão de lavagem II com etanol ao cartucho de rotação e centrifugado por 12.000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, centrifugado o cartucho de rotação com 12.000 x g por 1-2 minutos para secar a membrana com RNA ligado. O tubo de coleta foi descartado e o cartucho foi inserido em um tubo de recuperação.

Foi adicionado 30-100 µL de água livre de RNAase ao centro do cartucho de rotação, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1 minuto. O cartucho de rotação foi centrifugado durante 2 minutos a 12.000 x g à temperatura ambiente para eluir o RNA da membrana para o tubo de recuperação. O RNA então foi armazenado à temperatura de – 80°C.

3.7 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, o qual foi usado 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.

3.8 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real (gengiva e osso)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, utilizando o *High Capacity Kit RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação comparativa da expressão dos diferentes alvos foi realizada por reações em cadeia de polimerase em tempo real (*qRT-PCR*) aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific). Para as reações, foi utilizado o sistema TaqMan (TaqMan™ Gene Expression Assays, Applied Biosystems™), com sonda conjugada a fluoróforo FAM® e extintor MGB (*FAM fluorophore reporter / non fluorescent quencher MGB*), seguindo as instruções do fabricante, para os alvos descritos na Tabela 1.

Para eleição da diluição do cDNA e melhor eficiência de reação, foram realizadas diluições seriadas de um *pool* de cDNA das amostras (1:2, 1:4; 1:8; 1:16, e 1:32). Os ensaios foram então conduzidos as amostras nas diluições de 1:8 ou 1:4 com reagentes *Taqman® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems™) e ensaio inventariado, seguindo as etapas de reação como determinado pelo fabricante (Passo 1: 2 minutos a 50 °C; Passo 2: 10 minutos a 95 °C; e Passo 3: 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minutos e 60 °C). Uma reação negativa (água) foi feita para cada um dos ensaios, como controle negativo.

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

Alvo	Número de Catálogo
RPL13	Rn00821258_g1
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-1β	Rn00580432_m1
IL-6	Rn01410330_m1
TNFα	Rn01525859_g1
OPG	Rn00563499_m1
OCN	Rn00566386_g1
RUNX2	Rn01512298_m1
INTERFERON-γ	Rn00594078_m1
TGF-β	Rn01418715_m1
RANK	Rn01426423_m1
RANKL	Rn00589289_m1
VEGF	Rn01511601_m1
VEGF-R1 (Flt)	Rn00570815_m1
VEGF-R2 (kdr)	Rn00564986_m1
IL-18	Rn01422083_m1
IL-10	Rn00563409_m1
IL-21	Rn01755623_m1
TNFR1	Rn01492348_m1
IL-1α	Rn00566700_m1
IL-4	Rn01456866_m1
IFNγ	Rn00594078_m1
PHEX	Rn00448130_m1
Fosfatase alcalina	Rn01516028_m1
MCP-1	Rn00580555_m1
MIP-1α	Rn01464736_g1
TLR-2	Rn02133647_s1
TLR-4	Rn00569848_m1

3.9 Análise Histológica (HE)

A análise histológica foi realizada a partir de lâminas que foram confeccionadas pelo Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP e coradas com hematoxilina-eosina. Sessenta e cinco hemimandíbulas, sendo 5 por grupo, foram fixadas, posteriormente desidratadas, incluídas em parafina e cortadas no micrótomo, em cortes com espessura de 4 micrômetros. Em seguida, os cortes foram tratados com xilol e então corados com os corantes hematoxila e eosina (preparados no laboratório de histologia da FOB/USP). Após a fixação dos cortes em lâmina permanente, as lâminas então foram analisadas tendo como base um escore pré-estabelecido de acordo com alguns parâmetros como: análise das condições do epitélio juncional, presença ou ausência de infiltrado inflamatório, preservação ou não de cemento e de crista óssea alveolar (Figura 7).

A análise histológica das hemimandíbulas foi realizada na região mesial, visto que é neste local que os eventos inflamatórios são mais evidentes, o que facilitou a análise das peças.

Escore 1 – 7a

Escore 1. Infiltrado Inflamatório Ausente, Epitélio Juncional Normal, Cimento preservado ou com áreas eventuais de reabsorção cervical, Crista óssea alveolar preservada.

Escore 2 – 7b

Escore 2. Infiltrado Inflamatório leve, Epitélio Juncional Normal, Cimento parcialmente destruído, Crista óssea alveolar com reabsorção mínima.

Escore 3 – 7c

Escore 3. Infiltrado Inflamatório moderado, Epitélio Juncional Apical, Cimento parcialmente destruído, Crista óssea alveolar com reabsorção moderada.

Escore 4 –

Escore 4. Infiltrado Inflamatório intenso, Epitélio Juncional Apical, Cimento gravemente destruído, Crista óssea alveolar com reabsorção intensa, ocasionalmente com sequestro ósseo.

Figura 7. Escore Histológico

3.10 Forma de análise dos resultados

Análise estatística entre grupos e variáveis

O software estatístico GraphPad Prism 6, criado por GraphPad Software, Inc (Califórnia, Estados Unidos) foi utilizado para a análise dos dados e criação de gráficos da análise de RT-PCR, MicroCT e Histológica a partir dos dados obtidos. Após a coleta, os dados foram analisados por meio de gráficos e tabelas, sendo utilizado Kruskal-wallis com medidas repetidas, seguida de um pós-teste de Dunns para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio. Foi adotado nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PERDA ÓSSEA

Os animais acometidos pela DP e tratados com água ou com losartan apresentaram maior perda de osso comparado aos animais controles após 14 dias de acompanhamento (Figura 8). Nos períodos de 1, 3 e 7 dias essa diferença não foi detectada. Este resultado surgiu a partir da análise da hemimandíbula com o Software ImageJ® que é capaz de fazer uma análise bidimensional da hemimandíbula em questão.

Figura 8. Representação gráfica da perda óssea observada nas mandíbulas dos ratos após a DP, análise realizada com o software ImageJ. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle.

A hipótese era de que o pré-tratamento pudesse conferir maior proteção aos animais submetidos à DP, porém com relação à perda óssea, com esta metodologia aplicada, não foi possível detectar diminuição na progressão da perda óssea entre os grupos, apenas o aumento da perda óssea nos animais induzidos à DP no período de 14 dias. Vale destacar que também realizamos a análise tomográfica, o que possibilitou uma análise tridimensional das hemimandíbulas, e que permitiu maior exploração dos resultados com dados adicionais de quantidade e tamanho das trabéculas ósseas e volume ósseo das mandíbulas e estes resultados serão apresentados ainda neste capítulo.

Além das análises macroscópicas, análises moleculares destas mandíbulas também foram feitas (tais análises serão expostas a seguir). Assim, pensamos ser possível encontrarmos diferenças moleculares entre os grupos analisados tais como características celulares e do infiltrado inflamatório.

Expressão gênica no tecido gengival

As expressões de RNAm dos receptores AT1a e AT1b no tecido gengival aumentaram de forma significativa 1 dia após a indução da DP nos ratos submetidos ao tratamento com água comparados aos animais do grupo controle, retornando aos valores basais a partir do 3º dia (Figura 9). Por outro lado, os receptores AT2 e MAS não foram modulados pela DP, o tratamento com Losartan provocou um aumento da expressão destes receptores (Figura 9). Estes achados, em conjunto com outros que ainda serão apresentados, ajudarão a explicar o bloqueio da perda óssea em animais com DP tratados com Losartan.

Figura 9. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival dos receptores AT1a, AT1b, AT2 e MAS. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Além dos interessantes e inéditos resultados apresentados acima, é possível observar na figura 10 que a expressão da ECA foi maior após 3 dias de DP nos animais submetidos ao tratamento com água comparada ao grupo controle e aos demais períodos analisados. O tratamento com losartan não modificou esta resposta. Já a expressão de ECA-2 não foi modulada pela DP, mas o tratamento com losartan foi capaz de modular esta expressão nos períodos de 7 e 14 dias de

tratamento em animais com DP (Figura 10). A expressão de angiotensinogênio foi modulada somente em animais com DP tratados com losartan tendo uma diferença estatisticamente significativa se comparada ao grupo que não foi submetido ao tratamento com losartan (Figura 10).

Figura 10. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival do Angiotensinogênio, ECA e ECA2. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H₂O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e, vs período correspondente no grupo DP + H₂O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Com relação à expressão dos alvos que participam do processo de remodelação óssea, foi possível observar que a DP favorece o aumento da expressão do receptor RANK e de seu ligante RANKL (Figura 11), resultado este esperado tendo em vista a perda de osso observada. O tratamento com Losartan não promoveu redução da expressão de RNAm para esses alvos, contudo é possível notar que as expressões gênicas de marcadores de formação e diferenciação óssea, tais como osteoprotegerina (OPG), fosfatase alcalina (ALP),

PHEX e RUNX2 estão aumentadas em ratos tratados com Losartan quando comparadas ao grupo controle (Figura 12).

Figura 11. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de RANK, RANKL e OPG. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Figura 12. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de ALPL, ALP, PHEX e RUNX2. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e # vs período correspondente no grupo DP + H2O.

Com relação à expressão gênica de OCN, ocorreu um aumento na expressão no grupo submetido ao tratamento com água, tendo como pico máximo o período de 7 dias de doença periodontal e após uma redução na expressão aos 14 dias de doença periodontal, o mesmo pico pôde ser observado no caso da expressão gênica de BGLAP, e um aumento significativo na expressão de BGLAP no grupo submetido ao pós-tratamento com losartan nos períodos de 1 e 7 dias de doença periodontal (Figura 13).

Figura 13. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de OCN e BGLAP. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e, vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

A expressão de MIP-1 α (CCL3) não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados, não tratados e controle (Figura 14).

Figura 14. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de MIP-1α. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

A enzima cicloxigenase 2 (COX-2) teve sua expressão aumentada após 1 dia de DP e retornou aos valores basais após 3 dias. Este evento não pôde ser encontrado nos animais submetidos ao tratamento com losartan, demonstrando mais uma vez efeito anti-inflamatório deste antagonista (Figura 15).

A expressão de TGFβ, assim como de CCL2 também aumentaram após 1 dia de DP, entretanto o tratamento com losartan não atenuou esta resposta (Figura 15). O mesmo também pode ser observado para TNFα e seu receptor, IL-1α e IL-1β (Figura 16).

Figura 15. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de COX-2, TGFβ, CCL2 e CCL3. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Figura 16. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de TNF α , Receptor de TNF α , IL-1 α e IL-1 β . **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

No tecido gengival dos ratos também foi possível observar a expressão de IL-17, IL-18 e IL-21, as quais também possuem características pró-inflamatórias. No presente trabalho, a expressão de IL-17 não foi modulada pela DP tampouco pelo tratamento com losartan (Figura 17). IL-18 apresentou expressão elevada após 1 dia de DP (grupo submetido ao tratamento com água e grupo pré-tratado com losartan) voltando aos valores basais no sétimo dia nos animais submetidos ao pré-

tratamento com losartan, nos animais não submetidos ao pré-tratamento, no 3º dia de DP ocorreu um aumento na expressão de IL-18. Nos animais submetidos ao pós-tratamento com losartan o aumento da expressão foi ao terceiro dia de DP (Figura 17). Por fim, a IL-21 não foi modulada pela DP, já o tratamento com losartan promoveu aumento de sua expressão (Figura 17).

Figura 17. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de IL-17, IL-18 e IL-21. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Os resultados deste estudo demonstram que somente o IFN α teve sua expressão aumentada após 1 dia de DP, o que não foi observado nos animais pré-tratados com losartan (Figura 18). Foi observada menor expressão de INF β nos ratos com 1 dia de DP tratados com Losartan comparados aos tratados com água. O IFN γ não foi modulado nem pela DP, nem pelo tratamento com losartan (Figura 18).

Figura 18. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de IFN α , IFN β e IFN γ . **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H₂O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H₂O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Os resultados deste trabalho mostraram que ocorre o aumento da expressão de IL-6 e IL-13 com 1 dia de DP sendo os valores basais restabelecidos ao terceiro dia, e em animais submetidos ao tratamento com Losartan ocorreu a prevenção deste aumento para ambas as interleucinas (Figura 19). A expressão de IL-10 não foi modulada pela DP e nem pelo tratamento com Losartan (Figura 19).

Figura 19. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de IL-6, IL-10 e IL-13. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Nos animais submetidos ao tratamento com losartan ocorreu um aumento na expressão de MMPs (2 e 9), principalmente no período de 3 dias de doença periodontal se comparado ao grupo controle, o mesmo ocorreu para o grupo não tratado, retornando a níveis menores de expressão após 7 dias de doença periodontal (Figura 20).

Figura 20. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de MMP2 e MMP9. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Ocorreu um aumento na expressão do receptor toll-like 2 no período de 3 dias de doença periodontal se comparado ao grupo controle, retornando aos seus níveis basais de expressão com 7 dias de doença periodontal, com relação ao receptor toll-like 4 não ocorreram mudanças de expressão estatisticamente significativas (Figura 21).

Figura 21. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de TLR2 e TLR4. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

A expressão gênica para catalase e elastase-2 permaneceu em níveis elevados em todos os grupos, o tratamento com losartan não modulou a expressão de ambas nos tempos analisados no presente trabalho (Figura 22).

Figura 22. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de Catalase e ELA-2. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Com relação à expressão gênica de ALDH, não ocorreu um aumento estatisticamente significativo na expressão entre os grupos tratados e o controle, apenas foi possível observar que ocorreu uma diferença entre o grupo não tratado com o grupo submetido a pós-tratamento de 1 dia com losartan (Figura 23).

Figura 23. Representação gráfica da expressão gênica no tecido gengival de ALDH. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Expressão gênica no tecido ósseo

As expressões de RNAm dos receptores AT1a e AT1b no tecido ósseo aumentaram de forma significativa 3 dias após a indução da DP nos ratos tratados com losartan comparados aos animais tratados com água e também ocorreu um aumento significativo na expressão de AT1a e AT1b em animais tratados com água em comparação com o grupo controle (Figura 24). Por outro lado, os receptores AT2 e MAS não foram modulados pela DP, porém o tratamento com Losartan provocou um aumento da expressão destes receptores (Figura 24).

Figura 24. Representação gráfica da expressão gênica no osso dos receptores AT1a, AT1b, AT2 e MAS. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Foi possível observar uma diminuição na expressão de angiotensinogênio e ECA nos animais pré-tratados com losartan por 1 dia em comparação aos animais com doença periodontal não tratados com losartan, estes animais submetidos à doença periodontal por um dia em comparação ao grupo controle também apresentaram uma alta expressão de angiotensinogênio. Com relação à ECA2, com exceção dos animais pré-tratados e eutanasiados 14 dias após a indução, todos os outros animais pré-tratados ou não apresentaram uma diminuição na expressão de ECA2. A expressão de ECA2 não foi modulada pela DP, mas sim pelo tratamento com losartan que promoveu a diminuição de sua expressão em todos os períodos de tratamento, com exceção dos animais submetidos à pré-tratamento e doença periodontal por 14 dias, vale também resaltar que em relação à ECA2 houve uma maior expressão no tecido mole em comparação ao tecido ósseo (Figura 25).

Figura 25. Representação gráfica da expressão gênica no osso do Angiotensinogênio e das Enzimas Conversoras de Angiotensina 1 e 2. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

Com relação à expressão dos alvos que participam do processo de remodelação óssea, é possível observar que a DP favorece a diminuição da expressão do receptor RANK, porém favorece o aumento de seu ligante (Figura 26), o tratamento com losartan não foi o determinante para que ocorresse essa diminuição na expressão de RANK ao passo que esta diminuição ocorreu em grupos tratados com losartan e também no grupo que recebeu água apenas. Já com relação ao RANKL ocorreu um aumento na expressão dos animais que receberam água no período de 1 dia. A expressão de OPG não apresentou diferenças estatisticamente significativas. O aumento imediato de RANKL possivelmente ocorreu como uma resposta dos organismos a uma possível remodelação óssea após a indução da doença periodontal, chegando após 3 dias aos seus níveis normais.

Figura 26. Representação gráfica da expressão gênica no osso de BGLAP, RANK, RANKL, OPG e OCN. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significativas no mesmo grupo.

No osso, diferente do que se pôde constatar no tecido mole, ocorreu uma diminuição da expressão gênica de marcadores de formação e diferenciação óssea como a Fosfatase Alcalina (ALP), PHEX e RUNX2 em comparação com o grupo controle, isso ocorreu nos grupos tratados com losartan e nos submetidos ao consumo de água apenas (Figura 27).

Figura 27. Representação gráfica da expressão gênica no osso de ALP, PHEX, RUNX2 e ALPL. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

No presente estudo a COX-2 teve sua expressão aumentada no osso após 7 dias de DP retornando à valores basais após 14 dias, o que não ocorreu em animais submetidos ao tratamento com losartan, evidenciando mais uma vez seu efeito anti-inflamatório (Figura 28). O mesmo ocorreu com relação à CCL2 que teve sua expressão aumentada drasticamente após um dia de indução, tendo seu valor máximo aos 7 dias de DP e retornando aos seus valores basais de expressão com 14 dias.

Figura 28. Representação gráfica da expressão gênica no osso de COX-2, CCL2 e CCL3. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

A expressão gênica de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ mostrou-se aumentada nos períodos de 7 dias de doenças periodontal nos animais não tratados com losartan em comparação ao grupo controle (Figura 29), este fato também pôde ser observado nas análises de expressão gênica destes mesmos alvos no tecido mole, porém este resultado ocorreu já no período de 1 dia após a indução da doença periodontal (Figura 29).

Figura 29. Representação gráfica da expressão gênica no osso de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H₂O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H₂O e letras diferentes indicam diferenças significativas no mesmo grupo.

A expressão de VEGF e seu receptor 1 mostrou-se bastante elevada em grupos que não foram submetidos ao tratamento com losartan, no grupo submetido ao pré-tratamento a expressão de RNAm para este alvo manteve-se próxima da expressão do grupo controle, o mesmo ocorreu para seus receptores (Figura 30).

Figura 30. Representação gráfica da expressão gênica no osso de VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

A expressão de RNAm para IL-6 apresentou diferenças significativas entre os grupos avaliados, o grupo não submetido ao tratamento com losartan teve um aumento na expressão, o grupo submetido ao pré-tratamento com losartan e pós-tratado por 7 dias teve uma diminuição significativa na expressão de RNAm para IL-6. Esse dado nos mostra que a doença periodontal progrediu nos animais não submetidos ao tratamento com losartan o que pode justificar a progressão da doença periodontal (Figura 31).

Figura 31. Representação gráfica da expressão gênica no osso de IL-6, IL-10 e Receptor de IL-6. **Controle:** animais sem DP e tratados com água; **DP+H2O:** animais submetidos à indução da DP e tratados com água; **DP+LOS:** animais submetidos à indução da DP e tratados com Losartan (50mg/kg/dia) e **PréLOS+DP:** animais pré-tratados com Losartan (50mg/kg/dia) por 30 dias e submetidos a DP com a continuidade do tratamento. Exceto o grupo controle, todos os outros grupos tiveram os períodos de 1, 3, 7 e 14 dias de avaliação. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O e letras diferentes indicam diferenças significantes no mesmo grupo.

4.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES TOMOGRÁFICAS (MICROCT)

Quanto ao volume ósseo na região analisada, foi possível notar que ocorreu a preservação do tecido ósseo nos animais submetidos ao pré-tratamento com o losartan (Figura 32), sendo que nos animais submetidos à indução e pós-tratamento, ou nos grupos que os animais não tiveram acesso ao fármaco em estudo, o volume ósseo permaneceu em seus níveis basais próximos ao volume ósseo do grupo controle.

Figura 32. Representação gráfica da análise de microCT do volume do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. # vs período correspondente no grupo DP + H2O.

Figura 33. Representação gráfica da análise de microCT do diâmetro das trabéculas do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.

Corroborando com os dados obtidos de volume ósseo, também foi possível observar que o diâmetro das trabéculas existentes no ROI foi maior no grupo que não recebeu tratamento com losartan (Figura 33), tendo acesso apenas à água, e isso vem mais uma vez de encontro com a hipótese que o tratamento com losartan representa um importante bloqueio na progressão da doença periodontal.

Figura 34. Representação gráfica da análise de microCT da distância entre as trabéculas do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.

A distância entre as trabéculas foi menor no grupo que não recebeu nenhum tratamento com losartan se comparado ao grupo controle e no grupo que recebeu pré-tratamento com losartan a distância das trabéculas foi maior (Figura 34), demonstrando mais uma vez que o losartan apresenta um efeito protetor na preservação óssea em animais submetidos à doença periodontal, ao passo que, quanto maior a distância existente entre as trabéculas, mais osso terá na região inter-radicular.

Figura 35. Representação gráfica da análise de microCT do número de trabéculas do osso alveolar de animais Wistar com a doença periodontal DP+H2O, DP+LOS e PréLOS+DP, comparados ao grupo controle e entre os grupos nos períodos correspondentes. * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H2O.

O número de trabéculas na região inter-radicular teve um aumento estatisticamente significativo no grupo que foi submetido à indução da doença periodontal e permaneceu com o fio de ligadura ao redor do primeiro molar durante 14 dias, além do que os animais submetidos ao pré-tratamento com losartan e pós-tratados por 14 dias tiveram uma quantidade menor de trabéculas se comparado ao grupo não tratado no período correspondente (Figura 35).

4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA

O gráfico representa escores relacionados com a progressão da inflamação no tecido periodontal. Animais dos grupos tratados com água (DP + H₂O) apresentaram um escore elevado o que indica um grave processo inflamatório. A partir da análise estatística pôde-se observar que os animais tratados com losartan tanto pré quanto pós-indução da doença periodontal apresentaram uma melhor preservação do tecido periodontal, principalmente aqueles submetidos ao pré-tratamento com losartan (Figura 36).

Figura 36. Escore histológico representativo dos grupos propostos neste estudo. O escore representa a soma dos parâmetros de Infiltrado Inflamatório, posição de epitélio juncional, grau de reabsorção do cimento e crista óssea alveolar. Os escores estão descritos detalhadamente na figura 16 (a, b, c, d). * vs controle, # vs período correspondente no grupo DP + H₂O.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos na literatura relatam o uso experimental de drogas anti-hipertensivas que afetam o SRA, por exemplo, foi comprovado que o tratamento com enalapril (inibidor da ECA) interfere na progressão da doença periodontal (SANTOS *et al.*, 2015), no mesmo estudo o tratamento com losartan (antagonista de AT1) ou alisquireno (inibidor de renina) foi capaz de diminuir a perda óssea alveolar na doença periodontal, porém uma questão que cabe aqui levantar, é que neste estudo os tempos avaliados foram diferentes dos escolhidos para o presente trabalho, além disso, não foram realizadas análises como a de MicroCT, com isso, a partir dos efeitos positivos observados com relação ao bloqueio da DP em trabalhos anteriores, o intuito neste trabalho foi entender um pouco mais estes mecanismos mensurando RNAm de outras citocinas, quimiocinas e receptores que possam estar relacionados com o processo inflamatório. As drogas utilizadas em trabalhos prévios, como no trabalho de Santos *et al.* (2015), atuam no SRA, mas cada uma possui o seu mecanismo de ação, o que pode justificar a eficácia do losartan e alisquireno na diminuição da perda óssea (SANTOS *et al.*, 2015).

Outra questão que vale aqui ressaltar, é que ainda no trabalho de Santos *et al.*, (2015) foram feitas as análises de expressão de RNAm a partir do sétimo dia de DP, o que não revelou resultados conclusivos. A partir destes resultados decidimos avaliar a progressão da DP a partir de 1 dia, embora não seja possível detectar alterações macroscópicas como a perda óssea por exemplo. Por outro lado, avaliar a expressão de RNAm no início da doença nos permitiu compreender a cinética, o que ajuda a elucidar os eventos macroscópicos, microscópicos e moleculares observados na progressão da DP. Foi de extrema importância ter escolhido períodos mais curtos pós-indução de DP, pois pudemos constatar diversas alterações microscópicas ao analisar as hemimandíbulas nos períodos de 1 e 3 dias.

No trabalho de Nûnez *et al.* (2018) foi utilizado um modelo experimental no qual foram utilizados ratos para verificar a ação do losartan sob a musculatura cardíaca em um modelo experimental de isquemia, e este fármaco mostrou-se eficaz, ao passo que gerou uma melhora na situação clínica dos animais envolvidos, demonstrando a função protetora dos receptores AT2, ao passo que quando a

angiotensina liga-se a este receptor, desencadeia efeitos anti-inflamatórios, antifibróticos, antiapoptóticos e promove a regeneração neuronal, o que contrabalanceia os processos patológicos e permite a recuperação de doenças (NAMSOLLECK P *et al.*, 2014). De acordo com as análises de RT-PCR pudemos verificar no presente trabalho que as expressões de RNAm dos receptores AT1a e AT1b no tecido gengival aumentaram de forma significativa 1 dia após a indução da DP nos ratos tratados com água comparados aos animais controles, retornando aos valores basais a partir do 3º dia, o que nos mostra uma possível resposta inicial à injúria gerada pelo fio de sutura ao redor do 1º molar destes animais.

Com relação aos receptores AT2 e MAS, neste estudo não foi possível observar a ocorrência da modulação da expressão gênica pela DP, porém o tratamento com losartan ocasionou um aumento da expressão destes receptores. Estes dados estão de acordo com a hipótese, ou seja, a Ang-II ligada ao receptor AT1 promove ações pró-inflamatórias enquanto o antagonismo deste receptor favorece o aumento da expressão de receptores (AT2 e MAS), que quando ativados por seus agonistas, modulam respostas anti-inflamatórias, no trabalho de Watanabe *et al.* (2018), o bloqueio do receptor AT1 aboliu a infiltração de células imunes e regulação positiva do SRA renal, revogando a morfologia renal, dado este que vem de encontro com os achados do presente trabalho, já que o losartan em ambos demonstrou efeito anti-inflamatório.

No trabalho de Jara *et al.* (2018) a prevenção do aumento da concentração de angiotensina (Ang II) aboliu eventos inflamatórios e fibróticos, indicando que a Ang II via receptor AT1 é essencial para a iniciação patológica, provando mais uma vez a ação do fármaco em estudo. Esta diminuta interação entre Ang II e receptores AT1 após o tratamento com losartan se deve ao antagonismo irreversível promovido pela droga (LI *et al.*, 2008; RAJIKUMAR *et al.*, 2013).

No trabalho de Hagiwara *et al.* (1998), foi demonstrado que a Ang II ligada aos receptores AT1, causa a inibição da expressão de RNAm para osteocalcina. Também foi relatado que RANKL promove importante função no processo de perda óssea na doença periodontal (CHEN, *et al.* 2014). A partir da análise de RT-PCR pudemos também observar que ocorreu uma maior ativação de osteoclastos, e esta, está associada ao aumento da expressão de RANKL pelos osteoblastos, ligante este que quando se acopla ao receptor RANK na superfície dos osteoclastos promove o aumento da reabsorção óssea. Os osteoclastos têm papel fundamental no

metabolismo ósseo, com atuação no processo de formação óssea. Na gengiva ocorreu um aumento na expressão de RNAm para osteoprotegerina (OPG) que é um antagonista dos 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, 1999; SUDA, 1999).

Níveis de OPG aumentados justificam a diminuição da perda óssea (CHEN *et al.*, 2014; T. NAGASAWA *et al.*, 2000), na análise de RT-PCR realizada no tecido gengival, ocorreu um aumento na expressão de OPG nos grupos submetidos ao tratamento com losartan, com ou sem pré em comparação com o grupo controle e o grupo com DP que não fora tratado com losartan. A quantidade de OPG no tecido, foi suficiente para diminuir a progressão da perda óssea, dado esse que podemos observar a partir da análise tomográfica (MicroCT).

No trabalho de Araújo *et al.* (2013) após a administração de olmesartan, ocorreu a redução do processo inflamatório e da perda óssea em ratos, por diminuir os níveis de expressão de COX-2, MMP-2, MMP-9, RANKL e RANK e aumentar OPG, além disso, no mesmo trabalho, também foi possível observar aumento nos níveis dessa proteína indicando a participação da IL-1 β na progressão da DP, já no presente trabalho ocorreu o aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 principalmente nos grupos não tratados com losartan, nos grupos submetidos ao tratamento a droga seguiu o aumento na expressão nos períodos a partir de 7 dias de pós-tratamento, com 3 dias ocorreram os picos de expressão de RNAm para MMPs. Com relação à expressão de RNAm para COX-2 os níveis de expressão nos animais tratados seja com ou sem pré-tratamento permaneceram basais, tendo um pico de aumento de expressão nos animais não submetidos ao tratamento com losartan e induzidos à doença periodontal no período de 1 dia, mostrando assim que há uma rápida resposta quanto à produção de RNAm para a posterior produção de COX-2 no processo inflamatório. Com relação à RANK, RANKL e OPG, ocorreu um aumento na expressão de RANK nos grupos tratados se comparado ao grupo controle, enquanto que RANKL teve um pico na expressão aos 3 dias de doença periodontal nos grupos submetidos ou não ao pré-tratamento com losartan, retornando aos seus níveis basais aos 7 dias de doença periodontal, indicando uma possível entrada de OPG, ao passo que o balanço entre RANKL e OPG é determinante na regulação da atividade osteoclástica para que ocorra a reabsorção

óssea (UDAGAWA, 1999; SUDA, 1999), então num primeiro momento ocorreu o aumento de RANKL, e posterior aumento de OPG que teve um aumento na expressão após 3 dias nos animais tratados com losartan com ou sem pré-tratamento em relação ao grupo controle, o que nos remete à uma possível ação de OPG atuando para a manutenção da integridade óssea nos animais tratados com losartan. Também foi possível observar um aumento na expressão de BGLAP na gengiva dos grupos não tratados com DP por 7 dias, como tentativa de remodelação óssea, ao passo que, esta é uma importante proteína óssea, secretada por osteoblastos que regulam a remodelação óssea e o metabolismo energético, a expressão de BGLAP no tecido ósseo teve uma redução estatisticamente significativa nos grupos submetidos ao tratamento com losartan.

Na periodontite humana foi possível observar maiores níveis de COX-2 comparados aos do grupo controle sadio (LAZAR, *et al.* 2015). No presente estudo, a COX-2 teve sua expressão aumentada após 1 dia de DP e retornou aos valores basais após 3 dias. Este evento não pôde ser encontrado nos animais submetidos ao tratamento com losartan, demonstrando mais um efeito anti-inflamatório deste antagonista.

A expressão de TGF β , assim como de CCL2 também aumentou após 1 dia de DP, entretanto o tratamento com losartan não atenuou esta resposta. O mesmo também pode ser observado para TNF α e seu receptor, IL-1 α e IL-1 β . Todas estas moléculas podem estar contribuindo para o estabelecimento da DP, pois possuem funções diversas tais como quimiotaxia de células imunes assim como atuam em processos proliferativos, de diferenciação de linfócitos e até mesmo mediação de eventos apoptóticos (STADLER *et al.* 2016).

A produção de MIP-1 pode ser induzida por diversos agentes pró-inflamatórios, LPS, substância P, infecções virais, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α/β . Outras citocinas como IL-4 ou IL-10 podem levar a uma diminuição da produção de MIP-1 (MAURER; STEBUT, 2004; SIPERT, 2007). Os níveis de expressão de MIP-1 permaneceram basais no presente trabalho, IL-10 apesar de ter tido um aumento na expressão, não foi considerado estatisticamente significativo, foi observado um aumento na expressão de TNF- α , principalmente nos animais não tratados com DP por um dia e nos não submetidos ao pré-tratamento com DP por 3 dias, o mesmo pôde ser observado em relação à expressão de IL-1 α/β , não tendo tido um aumento na expressão dos animais submetidos ao pré-tratamento, possivelmente, assim

como observado com relação aos receptores toll, já havia ocorrido a síntese proteica, por tratar-se de uma análise de expressão de RNAm e não tendo sido quantificados os níveis de proteínas até o momento, pôde-se supor que a proteína relacionada a tais receptores já havia sido formada, por isso os resultados que foram obtidos.

Os receptores do tipo toll (TLRs) são receptores-sentinela e sua estimulação leva à ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e fatores reguladores de interferon (IRFs), que promovem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outras proteínas responsáveis pela defesa do hospedeiro (MIGGIN; O' NEILL, 2006; GABRIELE, *et al.* 2017), o receptor TLR-2 teve um aumento em sua expressão nos animais tratados no período de 3 dias de indução de doença periodontal, retornando aos seus níveis basais aos 7 dias de doença periodontal, o mesmo não ocorreu nos animais não submetidos ao tratamento, com relação ao receptor TLR-4 os níveis de expressão gênica permaneceram elevados em todos os grupos tratados ou não, não tendo diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle. O silenciamento do receptor TLR4 bem como o tratamento por outro bloqueador do receptor AT1, irbersartan, reduziram estes parâmetros sugerindo uma comunicação entre as vias de sinalização de Angiotensina II e TLR4, com a participação do receptor AT1 (LV *et al.*, 2015; GABRIELE, *et al.* 2017), podemos sugerir que a resposta da expressão gênica desse receptor ocorre imediatamente após o estímulo proporcionado pela indução da doença periodontal, com isso, possivelmente já havia ocorrido a síntese proteica, por tratar-se de uma análise de expressão de RNAm e não tendo sido quantificados os níveis de proteínas, pôde-se supor que a proteína relacionada a tais receptores já havia sido formada.

No trabalho de Nakamura e Slots (1983) foram realizados experimentos em humanos com periodontite, estes pesquisadores relataram que ocorreu o aumento de fosfatase alcalina (ALP) nos pacientes com periodontite. No osso analisado no presente trabalho, diferente do que se pôde constatar no tecido mole, ocorreu uma diminuição da expressão gênica de marcadores de formação e diferenciação óssea como a ALP, PHEX e RUNX2 em comparação com o grupo controle, já na análise de RT-PCR do tecido mole, as expressões gênicas destes mediadores estão aumentadas em ratos tratados com losartan, estes dados também ajudam a

compreender o bloqueio da perda óssea vista nos ratos tratados com o antagonista dos receptores AT1.

Ainda no tecido gengival dos ratos também foi possível observar a expressão de IL-17, IL-18 e IL-21, as quais também possuem características pró-inflamatórias. A IL-17 promove quimiotaxia de monócitos e neutrófilos agindo de forma semelhante ao TNF α (CHIRICOZZI, *et al.* 2011) e pode ser encontrada em alta concentração no fluido gengival de região peri-implantar (SEVERINO *et al.*, 2016). A IL-18 é primordialmente produzida por macrófagos e estimula células T e NK, função esta também desenvolvida pela IL-21. Na gengivite e periodontite em humanos foi possível observar aumento da expressão de IL-17 e IL-18 (CHITRAPRIYA, *et al.* 2015), já a IL-21 foi encontrada com elevada expressão em pacientes com periodontite crônica (ISAZA-GUZMAN, *et al.* 2015). Neste trabalho IL-21 não foi modulada pela DP, já o tratamento com losartan promoveu aumento de sua expressão, o que não era esperado, já que tal interleucina possui efeito pró-inflamatório, o que pode explicar tal fato é o tempo de análise elegido neste trabalho, no qual provavelmente já não havia a expressão de RNAm para tal interleucina. Segundo Noh *et al.* (2013) pacientes com doença periodontal severa, que apresentaram grande expressão de IL-6, IL-8 e TNF- α , apresentaram também perda óssea acentuada, o que corrobora com a característica pró-inflamatória desta, sendo plausível que esta encontre-se aumentada no desenvolvimento da DP, dados que corroboram com os obtidos neste trabalho. Além disso, Sawada *et al.* (2012), demonstraram que possa existir um sinergismo entre IL-1 β e IL-6, durante o processo inflamatório, uma vez que estas citocinas encontram-se aumentadas em células advindas da gengival de indivíduos com periodontite.

No trabalho de Queiroz-Júnior, *et al.* (2015) foi utilizado um modelo experimental de artrite e a infecção por *A. actinomycetemcomitans* e estes desencadearam perda óssea alveolar significativa em camundongos e aumentaram os níveis de osteoclastos nos tecidos periodontais, e o tratamento com losartan conseguiu minimizar as consequências da DP, corroborando com os achados do presente trabalho. Ambas as condições de artrite e infecção com *A. actinomycetemcomitans* foram associadas à liberação do ligante 1 do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), INF- γ , IL-17 e aumento da razão RANKL / osteoprotegerina em tecidos periodontais, mas tal expressão diminuiu após o tratamento com losartan, com exceção do TNF- α . A abordagem terapêutica foi tão

benéfica quanto a preventiva. *In vitro*, o losartan preveniu a diferenciação e atividade dos osteoclastos induzidos por LPS (QUEIROZ-JÚNIOR, *et al.* 2015), a partir da análise de RT-PCR foi possível observar que a expressão gênica de TNF- α e de IL-1 apresentou um aumento e este se deu praticamente concomitantemente com o aumento na expressão de CCL2 e CCL3, corroborando com os achados literários.

A expressão de VEGF e seu receptor 1 mostrou-se bastante elevada em grupos que não foram submetidos ao tratamento com losartan, o que era esperado ao passo que este é um dos moduladores que atuam no processo inflamatório (OLIVEIRA *et al.*, 2008), no grupo submetido ao pré-tratamento a expressão de RNAm para este alvo manteve-se próxima da expressão do grupo controle, o mesmo ocorreu para seus receptores, nos animais não pré-tratados ocorreu um aumento na expressão deste alvo.

No trabalho de Lima *et al.* (2000) no qual foi utilizada a clorpromazina (derivado da fenotiazina) que possui propriedades anti-inflamatórias através da inibição da síntese de TNF- α e consequentemente da reabsorção óssea, foi demonstrado que a clorpromazina reduziu a perda óssea na periodontite experimental, provavelmente via bloqueio de TNF- α . Este mediador inflamatório mostrou-se altamente expresso em animais com a DP induzida logo no 1º dia pós-indução, retornando aos valores basais a partir do 3º dia, nos animais submetidos ao pré-tratamento com losartan, a expressão gênica de TNF- α permaneceu em níveis basais, mostrando que ocorre a mediação deste fármaco no processo inflamatório.

Além disso, os dados sugerem que pacientes que fazem o uso de losartan podem ter menos inflamação nos tecidos periodontais mesmo quando acometidos pela DP.

Em suma, os resultados dessa pesquisa mostraram que o losartan foi capaz de diminuir a progressão da perda óssea na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos, o que já era esperado, mas um achado interessante que vale ressaltar é que o losartan é capaz de atenuar a síntese de diversos mediadores moleculares inflamatórios já nos primeiros 3 dias pós-indução da doença periodontal.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados obtidos podemos concluir que:

O losartan possui efeitos anti-inflamatórios, visto que o fármaco foi capaz de diminuir a perda óssea em animais tratados, principalmente nos animais submetidos ao pré-tratamento com este fármaco, indicando a relação entre o pré-tratamento e a preservação do tecido ósseo.

O losartan foi capaz de atuar no aumento da expressão de enzimas, citocinas, quimiocinas e receptores, tais como: AT2, MAS, AT1a, AT1b, AGT, OPG, ALP, PHEX, RUNX2, BGLAP, IL-18, IL-21, MMPs, e promoveu a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-10 e $\text{INF}\beta$, em linhas gerais foram obtidos resultados similares na análise molecular de osso e de gengiva indicando seu papel anti-inflamatório. Já nos períodos iniciais de 1 e 3 dias, foi possível observar uma modulação na expressão dos alvos estudados neste trabalho.

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.

Akashi AP. Efeitos do ramipril sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. 2016. Tese (Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2016. doi:10.11606/T.25.2016.tde-17052016-162345. Acesso em: 2018-07-04.

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.

Alique M, Sanchez-Lopez E, Rayego-Mateos S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via angiotensin receptor type 1/nuclear factor-kappaB activation, causes a synergistic effect on interleukin-1-beta-induced inflammatory responses in cultured mesangial cells. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015 Mar;16(1):23-32.

Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos Patogênicos da Doença Periodontal Associada ao Diabetes Melito. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51/7

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.

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

Azevedo FP, Morandini ACF, Sipert CR, Dionísio TJ, Santos, CF, Damante CA, Rezende MLR, Sant'ana ACP, Gregghi SLA. Palatal mucosa derived fibroblasts present an adaptive behavior regarding cytokine secretion when grafted onto the gingival margin. *BMC Oral Health*. 2014; 14-21.

- 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.
- Borges Jr, I. Avaliação do estresse oxidativo em humanos com doença periodontal Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 76 p., 2003.
- Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducey P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bone of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998;23:187-196.
- 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.
- Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen and R. Muller (2010). "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography." *J Bone Miner Res* 25(7): 1468-1486.
- Bridget P. Kaufman¹ & Andrew F. Alexis¹. Biologics and Small Molecule Agents in Allergic and Immunologic Skin Diseases. *Current Allergy and Asthma Reports* (2018) 18: 55
- Brito, Victor Gustavo Balera. Papel dos mastócitos sobre o metabolismo ósseo local e sistêmico de ratos normotensos e hipertensos com doença periodontal. Dissertação (Dissertação em Ciências Fisiológicas) – UNESP.Araçatuba, 139 .2018.
- 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.
-

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

Cavanagh EMV, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. *Am J Hypertens*. 2010; 23(12):1318-25.

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.

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

Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int*. 2014;2014:731039.

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

Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nogales KE, Tian S, Cardinale I, *et al*. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):677-87.

Chitrapriya MN, Rao SR, Lavu V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*. 2015 Jan-Feb;19(1):14-7.

Clements JA. Tissue kallikrein-kinin system. In *Handbook of Physiology*, section 7, Chap. 9, the Endocrine System, vol. III, Endocrine Regulation of Water and Electrolyte Balance, ed. Fray JCS & Goodman HM, pp. 22-276. Oxford University Press, N. York, Oxford. 2000

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.

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

De nicola AF, Grillo C, González S. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of salt appetite control by mineralocorticoid action in brain. *Braz J Med Biol Res.*, v.25, p.1153-1162, 1992.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-1504.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 747–754, 1997.

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

Faber J.L, Kyle ME, Colemann J B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Laboratory Investigations*, v. 62, p. 670-678, 1990.

Fedde KN, Whyte MP. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5-prime-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 767-775, 1990.

Gabriele LG, Morandini AC, Dionisio TJ, Santos CF . Angiotensin II Type 1 Receptor Knockdown Impairs Interleukin-1 β -Induced Cytokines in Human Periodontal Fibroblasts. *Journal of Periodontology* (1970), v. 88, p. e1-e11, 2017.

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, Jiang Y, Valente AJ (1999). The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. *Front Biosci* 4:D571-580.

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. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol* 1998 Mar;156(3):543-50.

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

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.

Hochberg MC. Rheumatology. 5 ed. ELSEVIER . 2014.

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.

Isaza-Guzman DM, Cardona-Velez N, Gaviria-Correa DE, Martinez-Pabon MC, Castano-Granada MC, Tobon-Arroyave SI. Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2015 Jan;60(1):91-9.

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.

Jia L, Li Y, Xiao C, Du J. Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17:221-31.

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

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

Kinane, D. F., P. G. Stathopoulou and P. N. Papapanou (2017). "Periodontal diseases." *Nat Rev Dis Primers* 3: 17038.

Komori T, Yagi H, Nomura S *et al.*. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 755–764, 1997.

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

Kwon J-w, Jee D (2018) Aqueous humor cytokine levels in patients with diabetic macular edema refractory to anti-VEGF treatment. PLoS ONE 13(9): e0203408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203408> Editor: Alfred S Lewin, Uni

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.

Lazar L, Loghin A, Bud ES, Cerghizan D, Horvath E, Nagy EE. Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56(4):1441-6.

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.

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

Levi YLAS, Novais GS, Dias RB, *et al*. Effects of the prebiotic mannan oligosaccharide on the experimental periodontitis in rats. *J Clin Periodontol*. 2018;45:1078–1089.

Li Y, Yamada H, Kita Y, Suzuki M, Endo Y, Horita S, Yamazaki O, Shimizu T, Seki G, Fujita T. Arachidonic acid metabolites inhibit the stimulatory effect of angiotensin II in renal proximal tubules. *Hypertens Res*. 2008 Dec;31(12):2155-64.

Lima V, Bezerra MM, Alencar VBM, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 123±129.

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

Lodha S, Dani D, Mehta R *et al*. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med* 2002; 8: 830–840.

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.

Lombardi G, Perego S, Luzi L, Banfi G. A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. *Endocrine*. 2015; 48(2):394-404.

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

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

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.

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

Magalhães LBNC. Anti-hipertensivos. In: SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 7ed. Cap 68.

Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, *et al*. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* 2015; 367: 103–107.

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

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.

Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(10):1882-6.

Melchior AC. Hipertensão arterial: análise dos fatores relacionados como controle pressórico e a qualidade de vida. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, 2008.

Meng Y, Yu CH, Li W, Li T, Luo W, Huang S, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF-kappaB pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Apr;50(4):723-36.

Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(6):455-81.

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

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

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

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

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

Muscará MN, Ribeiro W. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. *Rev Bras Hipertens v. 8 n.1*, 2001.

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

- Nair AR, Ebenezer PJ, Saini Y, Francis J. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2015 Jul 15;335(2):238-47.
- Nakamura M, Slots J. Salivary enzymes. Origin and relationship to periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1983 Nov;18(6):559-69.
- Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep*. 2014 Feb;16(2):416.
- 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.
- Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 1986;66: 855-886.
- 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. *Exp Ther Med*. 2013 Sep;6(3):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.
- 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.
- 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, Dionisio TJ, Cestari TM, Taga R, Amaral SL, Santos CF. Cox-2 inhibition decreases VEGF expression and the alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2008; 79: 1062-1069.

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.

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 na angiotensin IV analog. *Regul Pept*. 1998; 74(2-3): 97-103.

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.

Pihlstrom B L., Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005 366(9499): 1809-1820.

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

prenatal programming by low-protein diet: beneficial effect of the post-weaning losartan treatment. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* page 1 of 6.

Queiroz-Junior CM, Silveira KD, de Oliveira CR, Moura AP, Madeira MF, Soriani FM, Ferreira AJ, Fukada SY, Teixeira MM, Souza DG, da Silva TA. Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):814-23.

Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci*. 2006 Jan 1;11:818-29.

Rang HP *et al*. Rang & Dale Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Rice KK, Richter CP. Increased sodium chloride and water intake of normal rats treated with desoxycorticosterone acetate. *Endocrinology*. V.33, p3106-115, 1943.

Robison, R. *Biochem. J.* 17, 286-293. 1923.

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

Sa L, Jing-Wei L, Li-Ping S, Yue-Hua G, Qian X, Jing-Jing J, Yuan Y. Association of IL10 gene promoter polymorphisms with risks of gastric cancer and atrophic gastritis. *Journal of International Medical Research*. September 11, 2018.

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, *et al.* Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134601.

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 COM, Oliveira EB. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB Elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002a; 80(1):42-7.

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

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.

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.

Severino VO, Beghini M, de Araujo MF, de Melo MLR, Miguel CB, Rodrigues WF, et al. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-33 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2016 Dec;72:194-9.

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

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

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

Sipert CR. Produção de MIP-1 α e SDF-1 por fibroblastos de polpa dental humana em cultura frente ao desafio com *Enterococcus faecalis* inativado por calor. 2007. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007. doi:10.11606/D.25.2007.tde-15102008-164844. Acesso em: 2018-09-30.

Skidgel RA, Erdös EG, Histamina, bradicinina e seus antagonistas in Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. Ver. Almir Lourenço da Fonseca. 11ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

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

Souza GP. Efeitos do captopril sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. 2014. Dissertação (Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2014. doi:10.11606/D.25.2014.tde-14042015-101126. Acesso em: 2018-10-02.

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.

Stadler AF, Angst PD, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016 Sep;43(9):727-45.

Strader CD, Gaffney T, Sugg EE, Candelore MR, Keys R, Patchett AA, Dixon RA. Allele-specific activation of genetically engineered receptors. *J Biol Chem*. 1991 Jan 5;266(1):5-8.

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.

Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, *et al.* Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR3, NOD1 and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct;56(10):1064-72.

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.

Tornel J, Madrid MI, Garcia-Salomon M, Wirth KJ & Fenoy FJ. Role of kinins in the control of renal papillary blood flow, pressure natriuresis, and arterial pressure. *Circ Res* 86:589-595. 2000

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

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.

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 CH. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003 Feb;82(2): 82-90.

Walos S, Szary J and Szala S. Inhibition of tumor growth by interleukin 10 gene transfer in B16(F10) melanoma cells. *Acta Biochim Pol* 1999; 46: 967–970.

Watanabe IKM, Jara ZP, Volpini RA, Franco MdC, Jung FF, Casarini DE. (2018) Up-regulation of renal renin–angiotensin system and inflammatory mechanisms in the

Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 7182-7186, 1986.

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

Woltgens JH, Lyaruu DM, Bronckers AL, Bervoets TJ, Van Duin M. Biomineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1): 203-12

Wright JW, Stubley L, Pederson ES, Kramár EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor ubtype 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.

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

Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Rivera A, Brown EM, *et al.* (2005). Functional expression of β -chemokine receptors in osteoblasts: Role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 146:2324-2335.

Yogi A, Callera GE, Mecawi AS, Batalhao ME, Carnio EC., Antunes-Rodrigues J, Queiroz RH, Touyz RM, Tirapelli CR. Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: A role of angiotensin type 1 receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, p.1-9, 2012.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P (2004). CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 19:2065-2077.

Zanchetti A., Stella A, Leonetti G, Morganti A, Terzoli L. Control of renin release: a review of experimental evidence and clinical implications. *Am J Cardiol.*, v.37, p.675-691, 1976.

Zhou S, Feely J, Spiers JP, Mahmud A: Matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007; 21(11):861-67.