

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR INDUZIDA PELA DOENÇA PERIODONTAL EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: PAPEL DO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E MICRORNAS**

ARAÇATUBA

2023

VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR INDUZIDA PELA DOENÇA PERIODONTAL EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: PAPEL DO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E MICRORNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Tit. Sandra Helena Penha de Oliveira

ARAÇATUBA

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B862m Brito, Victor Gustavo Balera.
Mecanismos envolvidos na perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal em ratos espontaneamente hipertensos : papel do sistema renina-angiotensina e microRNAs / Victor Gustavo Balera Brito. – Araçatuba, 2023
190 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Doenças periodontais 2. Hipertensão 3. Sistema renina-angiotensina 4. Inflamação 5. MicroRNAs I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

ERRATA

BRITO, V. G. B. Mecanismos envolvidos na perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal em ratos espontaneamente hipertensos: Papel do sistema renina-angiotensina e microRNAs. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2023.

| Folha | Linha | Onde se lê | Leia-se |
|-------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 | 4 | À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado, da bolsa de estágio pesquisa no exterior e do auxílio pesquisa, que financiaram a realização deste trabalho. | À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (2018/23676-3), da bolsa de estágio pesquisa no exterior (2021/09597-6) e do auxílio pesquisa (2015/03965-2), que financiaram a realização deste trabalho. |

DADOS CURRICULARES

VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO

Nascimento: 15 de fevereiro de 1993; Birigüi/SP.

Filiação: Carlos dos Santos Brito

Cássia Rosane Balera Brito

2011/2015: Graduação em Farmácia, Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba (UniSalesiano).

2016/2018: Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado Acadêmico, pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Foa/Unesp).

2018/2023: Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Doutorado Acadêmico, pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Foa/Unesp).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Cássia** e **Carlos** e avós **Dona Cida** e **Seu Daniel**.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Sandra Helena Penha de Oliveira. Seus ensinamentos e exemplos foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e científico, além de pessoal. Sua determinação e comprometimento sempre me inspirarão, e serei eternamente grato pela generosidade em me dar uma oportunidade, 11 anos atrás! Tenho muito orgulho de ter seu nome em meu currículo! Obrigado por tudo, Professora Sandra!

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) e à Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) pela oportunidade de realizar este trabalho. Ao Departamento de Ciências Básicas (DCB) desta Instituição, especialmente aos professores Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Antonio Hernandes Chaves Neto, Cristina Antoniali, Doris Matsushita, João Carlos Callera e Rita Cássia Menegati Dornelles, por suas valiosas contribuições enquanto estive no DCB.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF) e à Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), em particular à Professora Rita Cássia Menegati Dornelles (FOA/UNESP), coordenadora geral do PPGMCF, ao Professor Márcio Flávio Dutra Moraes (UFMG), presidente da SBFis, e à Professora Patrícia Riken Macedo Rocco (UFRJ), ex-presidente da SBFis, pelo esforço em expandir o PPGMCF. Estendo meus agradecimentos aos Coordenadores Locais do PPGMCF e aos demais Conselheiros das Instituições Nucleadoras, que compõem o Conselho Geral do PPGMCF, no qual servi como Representante Discente Geral. Também expressei meu apreço aos Representantes Discentes Locais com quem trabalhei durante meu mandato.

Ao Conselho Local do PPGMCF (FOA/UNESP), no qual tive o prazer de atuar como Representante Local por três mandatos, à sua coordenadora, Profa. Sandra H. P. Oliveira, à ex-coordenadora Profa. Cristina Antoniali e aos demais membros, pelo trabalho e esforços dedicados ao desenvolvimento e reconhecimento deste Programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado, da bolsa de estágio pesquisa no exterior e do auxílio pesquisa, que financiaram a realização deste trabalho.

Aos servidores da Seção Técnica de Pós-Graduação desta Instituição, Cristiane Regina Lui, Valéria de Queiroz Marcondes Zagato, Matos e Lilian Sayuri Mada, pela eficiência no trabalho e pela cordialidade com todos nós.

A todos os colaboradores da FOA/UNESP, cujos trabalhos são essenciais. Em especial, gostaria de mencionar a senhora Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, secretária do Departamento de Ciências Básicas; o senhor João Batista Alves Correa, responsável pelo Biotério Central; os servidores da Seção de Conservação e Manutenção; e a Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão.

Aos professores Cristina Antoniali, Márcio Mateus Beloti e Rita Cássia Menegati Dornelles pela disponibilidade, atenção e valiosas contribuições durante meu Exame Geral de Qualificação.

Aos amigos discentes e egressos do PPGMCF pela amizade e companheirismo, em especial aos amigos do Bloco 31, pela convivência agradável e divertida que tornaram os dias mais agradáveis.

Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia, gostaria de expressar minha gratidão por toda a ajuda, boa vontade e bom humor constantes. Em especial, gostaria de mencionar Sabrina Frasnelli, Ayna Barreto, Bianca Ribeiro, Mariana Souza e Maria Carolina Linjardi, que tiveram um papel fundamental na realização deste trabalho.

Aos meus professores de graduação do Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Araçatuba (UniSalesiano), Roseli Cavestre, Vilma Colli, Fausto de Souza, Milena Tonon, Maria de Fátima Sato, Valéria Rocha, André Rowe, Paulo Geraldo, Joice Cozza, Simone Terçariol, Andrea Garcia, José Zequetto, Natália Negreiros,

Aparecida Tocchio, Gislene Marcelino, Rossana A. C. Rosa, Sueli da Silva, Jeferson Machado, Luiz Gustavo Lima, Rosemeire Pastor e Giselle Sailer, gostaria de agradecer por todos os ensinamentos durante minha formação. Em especial, agradeço às professoras Eliane P. Cervelatti e Ana Carolina Frade pela generosidade e amizade.

Aos meus queridos amigos Fernando Barthman, Priscila Fardin, Murilo Graton, Amanda Gomes, Fernanda Demarqui e Jessica Troiano, expresso minha gratidão pela fraternidade e pelos inúmeros bons momentos que compartilhamos juntos!

A minha família, agradeço por sempre estarem presentes! Obrigado por todo o carinho e suporte em todos os momentos!

To the Department of Orthopedic Surgery at Washington University in St. Louis, School of Medicine, and The Musculoskeletal Research Center. I am especially grateful to Prof. Audrey McAlinden for offering me a wonderful opportunity, providing invaluable mentorship, and for her generosity and kindness throughout my journey. I would also like to extend my appreciation to the members of the McAlinden Lab, Austin Bell-Hensley, Hongjun Zheng, and Jin Liu, for their warm welcome, constant assistance, and friendship!

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

" Quando se começa a caminhar, o caminho aparece "

- atribuído a Rumi.

RESUMO

BRITO, V. G. B. **Mecanismos envolvidos na perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal em ratos espontaneamente hipertensos: Papel do sistema renina-angiotensina e microRNAs.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma desordem inflamatória prevalente que afeta os tecidos de suporte e proteção dos dentes. Devido sua alta prevalência, é frequentemente associada a comorbidades, como hipertensão, que pode contribuir para sua progressão. O rato espontaneamente hipertenso (SHR) é um modelo que apresenta características semelhantes à hipertensão essencial humana, bem como comprometimento ósseo intrínseco e maior perda óssea alveolar associada à DP. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar dois mecanismos, o sistema renina-angiotensina (SRA) e a expressão de microRNAs (miRNAs), para melhor compreender o aumento da perda óssea alveolar induzida pela DP nesse modelo. Para isso, utilizamos ratos machos Wistar e SHR com 10 semanas de idade e a DP foi induzida por meio de ligadura bilateral inserida nos primeiros molares inferiores e mantida por 15 dias. Para avaliar a participação do SRA, os animais foram tratados com telmisartan (10 mg/Kg/dia) e foram realizadas análises da arquitetura óssea (microCT), expressão dos componentes do SRA, marcadores de formação, remodelamento e reabsorção óssea, bem como a produção de mediadores inflamatórios na mandíbula (RT-qPCR, ELISA e IHC-P). Para investigar a expressão diferencial de miRNAs associado a DP, foi utilizado ensaio de microarranjo e posteriormente análises bioinformáticas para identificar potenciais vias reguladas. Os resultados mostraram que o rato SHR apresentou maior perda óssea alveolar, em comparação ao Wistar (normotenso), o que foi parcialmente prevenido pelo tratamento com telmisartan. Observamos uma redução nos marcadores de osteoclastos (remodelamento e reabsorção), o que foi associada à menor produção de mediadores inflamatórios, inibição do receptor de angiotensina II tipo 1 (Agt1) e maior expressão do receptor tipo 2 (Agt2r). Entretanto, observamos que a modulação dos componentes do SRA foi similar entre ratos Wistar e SHR, não explicando as diferenças observadas entre os modelos. De forma interessante, a análise de microarranjo revelou um perfil distinto de miRNAs relacionados à resposta imune e

metabolismo ósseo nos SHR, bem como miRNAs diferencialmente modulados entre os modelos, previamente não associados à homeostase ou desordens periodontais. Resumidamente, mostramos que os componentes do SRA contribuem significativamente para a perda óssea alveolar, mas não explicam completamente a progressão aumentada observada nos SHR. No entanto, a modulação diferencial de miRNAs nos animais hipertensos sugerem seu envolvimento nessas diferenças, além de destacar potenciais alvos terapêuticos para DP, e outras desordens ósseas, que podem ser de interesse para orientar futuras pesquisas. Nesse sentido, a partir dos miRNAs diferencialmente expressos na DP, elegemos um miRNA de interesse, o miR-127-3p, que apresenta sequência conservada entre múltiplas espécies (incluindo ratos, camundongos e humanos), cuja função na osteogênese não havia sido completamente elucidada. Demonstramos então um efeito inibitório do miR-127-3p na diferenciação osteogênica de células osteoprogenitoras humanas (células mesenquimais estromais da medula óssea), por meio da superexpressão *in vitro* por meio de um mimico de miRNA. Estudos adicionais são necessários para confirmar um efeito *in vivo*, mas nossos resultados contribuem para a compreensão da função do miR-127-3p na biologia óssea. **Financiamentos:** CAPES (código 001), FAPESP (2015/03965-2, 2018/23676-3 e 2021/09597-6).

Palavras-chave: Doença periodontal; hipertensão; sistema renina-angiotensina; inflamação; microRNAs.

ABSTRACT

BRITO, V. G. B. **Mechanisms associated to the periodontal disease-induced alveolar bone loss in spontaneously hypertensive rats: Role of the renin-angiotensin system and microRNAs.** Thesis (Doctorate) - São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is a prevalent inflammatory disorder affecting the teeth' supporting and protective tissues. Due to its high prevalence, it is often associated with other comorbidities such as hypertension, which can contribute to its progression. The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a model that exhibits similarities to essential hypertension in humans, as well as intrinsic bone impairment and increased alveolar bone loss associated with PD. Therefore, the aim of this study was to investigate two mechanisms, the renin-angiotensin system (RAS) and microRNA (miRNA) expression, to better understand the increased alveolar bone loss induced by PD in this model. Male Wistar and SHR rats at 10 weeks of age were used, and PD was induced by bilateral ligature placement on the lower first molars and maintained for 15 days. To evaluate the involvement of the RAS, the animals were treated with telmisartan (10 mg/kg/day), and we analyzed the alveolar bone architecture (micro-CT), RAS component expression (RT-qPCR and IHC-P), bone formation, remodeling, and resorption markers expression (RT-qPCR), and the production of inflammatory mediators in the mandible (ELISA). A microarray assay was used to investigate the differential expression of miRNAs associated with PD, followed by bioinformatics analysis to identify potential regulated pathways. The results showed that the SHR rat exhibited greater alveolar bone loss than the normotensive Wistar rat, partially prevented by telmisartan treatment. We observed a reduction in osteoclast markers, associated with decreased production of inflammatory mediators, inhibition of the angiotensin II type 1 receptor (Agtr1), and increased expression of the type 2 receptor (Agt2r) in the telmisartan-treated animals. However, we found that the modulation of RAS components was similar between Wistar and SHR rats, which did not explain the observed differences between the models. Interestingly, microarray analysis revealed a distinct profile of miRNAs related to immune response and bone metabolism in SHR rats, as well as differentially modulated miRNAs between the models that were not previously associated with periodontal homeostasis or disorders. In summary, we

demonstrated that RAS components significantly contribute to alveolar bone loss but do not fully explain the increased progression observed in SHR rats. However, the differential modulation of miRNAs in hypertensive animals suggests their involvement in these differences, highlighting potential therapeutic targets for PD and other bone disorders as well, which may be of interest for guiding future research. In this context, from the differentially expressed miRNAs in PD, we selected a miRNA of interest, miR-127-3p, which presents a conserved sequences among multiple species (including rats, mice, and humans) and which role in osteogenesis has not been fully elucidated. We demonstrated an inhibitory effect of miR-127-3p on the osteogenic differentiation of human osteoprogenitor cells (bone marrow-derived mesenchymal stromal cells) through in vitro overexpression using a miRNA mimic. Further studies are needed to confirm an *in vivo* effect, but our results contribute to understanding the function of miR-127-3p in bone biology. **Funding:** CAPES (code 001), FAPESP (2015/03965-2, 2018/23676-3, and 2021/09597-6).

Key words: Periodontal disease; hypertension; renin-angiotensin system; inflammation; microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 1. Componentes anatômicos básico | 38 |
| Figura 2. Principais características da doença periodontal | 40 |
| Figura 3. Componentes do sistema renina-angiotensina | 47 |
| Figura 4. Biogênese e mecanismo de ação dos microRNAs | 53 |
| Figura 5. Principais fases e marcadores da diferenciação osteogênica | 60 |

CAPÍTULO 1

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 1- 1. Pressão arterial sistólica e marcadores sistêmicos de remodelação óssea de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 80 |
| Figura 1- 2. Microtomografia de mandíbula (região do primeiro molar inferior) de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 82 |
| Figura 1- 3. Expressão dos componentes do SRA em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 85 |
| Figura 1- 4. Expressão dos componentes do SRA em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 85 |
| Figura 1- 5. Produção de mediadores inflamatórios em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 87 |
| Figura 1- 6. Expressão gênica de marcadores de formação óssea em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 89 |
| Figura 1- 7. Expressão gênica de marcadores de remodelamento e reabsorção em mandíbulas de Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan | 91 |
| Figura 1- 8. Principais resultados | 99 |

CAPÍTULO 2

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 2- 1. Pressão arterial sistólica e perda óssea alveolar induzida por DP em ratos SHR e Wistar | 109 |
| Figura 2- 2. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de SHR Controle versus Wistar Controle | 112 |
| Figura 2- 3. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de Wistar com DP versus Wistar Controle | 114 |
| Figura 2- 4. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de SHR com DP versus SHR Controle | 118 |
| Figura 2- 5. Diagrama de Venn para DEmiRs na DP | 120 |
| Figura 2- 6. MiRNAs regulados diferencialmente em SHR com PD versus SHR Controle comparado a Wistar com PD versus Wistar Controle | 122 |

CAPÍTULO 3

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 3- 1. Expressão do miR-127-3p e miR-127-5p in vitro | 143 |
| Figura 3- 2. Silenciamento do miR-127-3p durante a osteogênese de hCTM | 145 |
| Figura 3- 3. Superexpressão do miR-127-3p durante a osteogênese de hCTM ... | 147 |
| Figura 3-4. Marcação F-actina em hCTM com superexpressão do miR-127-3p ... | 149 |
| Figura 3- 5. Expressão gênica de marcadores osteogênicos e BCL6 durante osteogênese de hCTM | 151 |

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- 1. Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados76

Tabela 1- 2. Relação dos anticorpos e sistema de detecção utilizados para os ensaios de imunohistoquímica78

CAPÍTULO 2

Tabela 2- 1. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de SHR Controle versus Wistar Controle112

Tabela 2- 2. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de Wistar com DP versus Wistar Controle115

Tabela 2- 3. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de SHR com DP versus SHR Controle.....119

Tabela 2- 4. MiRNAs regulados diferencialmente em SHR com DP versus SHR Controle comparado a Wistar com DP versus Wistar Controle123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| μA | - Microampere |
| μL | - Microlitro |
| μL | - Microlitro |
| μm | - Micrometro |
| 3' | - Extremidade <i>downstream</i> de moléculas de DNA ou RNA |
| 5' | - Extremidade <i>upstream</i> de moléculas de DNA ou RNA |
| Ace | - Enzima conversora de angiotensina |
| Ace2 | - Enzima conversora de angiotensina 2 |
| Actb | - Beta actin |
| Ago | - Argonauta |
| Agt | - Angiotensinogenio |
| Agt1r | - Receptor de angiotensina II tipo 1 |
| Agt2r | - Receptor de angiotensina II tipo 2 |
| Alp | - Bone alkaline phosphatase |
| Ang1-7 | - Angiotensina 1-7 |
| ANOVA | - Analysis of variance, análise de variância |
| ASB | - Albumina sérica bovina |
| AT1R | - Receptor de angiotensina II tipo 1 |
| AT2R | - Receptor de angiotensina II tipo 2 |
| BCL6 | - B-cell lymphoma 6 transcription repressor, Repressor de transcrição de células B de linfoma 6 |
| bFGF | - Basic fibroblast growth fator; Fator de crescimento fibroblástico básico |
| bFGF | - Basic fibroblast growth factor; Fator de crescimento fibroblástico básico |
| Bmp2 | - Bone morphogenetic protein 2 |
| Bsp/lbsp | - Bone sialoprotein; Integrin-binding sialoprotein |
| BV/TV | - Bone volume/Total volume, Volume ósseo/Volume total |
| Catnb | - B-catenin / Cadherin associated protein beta 1 |
| CCL20 | - Chemokine (C-C motif) ligand 20; ligante quimiocina (motivo C-C) 20 |
| cDNA | - Complementary deoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CINC-2 | - Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2, quimiotático de neutrófilo induzido por citocina-2 |
| CN | - Grupo experimenta Controle Negativo |
| Co.Po | - Porosidade cortical |
| Co.Th | - Espessura cortical |
| Col1a1 | - Collagen type I alpha 1 |
| Ct | - Cycle threshold, Ciclo limiar |

| | |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Ctsk | - Cathepsin K |
| CXCL2 | - Chemokine (C-X-C motif) ligand 2; ligante quimiocina (motivo C-X-C) 2 |
| DEPC | - Diethyl pyrocarbonate, Pirocarbonato de dietila |
| DNA | - Deoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico |
| DNase | - Desoxirribonuclease |
| DP | - Doença periodontal |
| GO | - Gene ontology; Ontologia genética |
| hsa | - Referente a espécie Homo sapiens |
| I.U. | - International unit; unidade internacional |
| I.U./mL | - Unidades internacionais por mililitro |
| IL-10 | - Interleukin-10, interleucina-10 |
| IL-6 | - Interleukin-6, interleucina-6 |
| Itgav | - Integrin, alpha V |
| Itgb5 | - Integrin, beta 5 |
| KEGG | - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto |
| Kg | - Quilograma |
| kVp | - Pico de quilovoltagem |
| Masr | - Receptor Mas; Mas-related G protein-coupled receptor |
| mg | - Miligrama |
| microCT | - Micro-computed tomography, micro tomografia computadorizada |
| MIP-3α | - Macrophage inflammatory protein-3 alpha, Proteína inflamatória de macrófago-3 alfa |
| miR | - Microrna |
| miR | - Microrna |
| miRNA | - Microrna |
| miRNA | - Microrna |
| mL | - Mililitro |
| mm | - Milímetro |
| mM | - Milimolar |
| Mmp2 | - Matrix metalloproteinase 2 |
| Mmp9 | - Matrix metalloproteinase 9 |
| mmu | - Referente a espécie <i>Mus musculus</i> |
| ms | - Milissegundo |
| ng | - Nanograma |
| ng/ml | - Nanograma por mililitro |
| NT | - Grupo experimental Não Transfectado |
| Ocn/Bglap | - Osteocalcin/Bone gamma-carboxyglutamate protein |
| Opg | - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b |
| Opn/Spp1 | - Osteopontina/Secreted phosphoprotein 1 |
| Oscar | - Osteoclast associated immunoglobulin-like receptor |

| | |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Osx/Sp7 | - Osterix/Sp7 transcription factor |
| p | - Probabilidade |
| PBS | - Phosphate-buffered saline, Tampão fosfato salino |
| Ppia | - <i>Peptidylprolyl isomerase A</i> , Peptidilprolil isomerase A |
| pré-miRNA | - Microrna precursor |
| pri-miRNA | - Microrna primário |
| Rank | - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a |
| Rankl | - Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 |
| RCF | - Relative centrifugal force, Força centrífuga relativa |
| Ren | - Renina |
| RISC | - RNA-induced silencing complex |
| RNA | - Ribonucleic acid, Ácido ribonucleico |
| RNase | - Ribonuclease |
| rno | - Referente a espécie <i>Rattus norvegicus</i> |
| ROI | - Region of interest, Região de interesse |
| RQ | - Relative quantitation, Quantificação relativa |
| RT-qPCR | - Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa |
| Runx2 | - Runt-related transcription factor 2; Fator de transcrição relacionado à Runt-2 |
| SBF | - Soro fetal bovino |
| SC | - Grupo experimental SHR controle |
| SDP/SPD | - Grupo experimental SHR com doença periodontal |
| SEM | - Standard error of the mean, Erro padrão da média |
| SFB | - Soro fetal bovino |
| SHR | - Spontaneously hypertensive rat, Rato espontaneamente hipertenso |
| STEMM | - Grupo experimental SHR com doença periodontal, tratado com telmisartan |
| Tb.N | - Trabecular number, Número de trabéculas |
| Tb.Sp | - Trabecular separation, Separação trabecular |
| Tb.Th | - Trabecular thickness, Espessura trabecular |
| TNF-α | - Tumor necrosis factor alpha, Fator de necrose tumoral |
| Trap/Acp5 | - Tartrate-resistant acid phosphatase/Acid phosphatase 5; Fosfatase ácida resistente ao tartarato/Fosfatase ácida 5 |
| UTR | - Região no codificante (do inglês, untranslated region) |
| VOI | - Volume of interest, Volume de interesse |
| Vtn | - Vitronectin, Vitronectina |
| WC | - Grupo experimental Wistar controle |
| WDP | - Grupo experimental Wistar com doença periodontal |
| WTELM | - Grupo experimental Wistar com doença periodontal, tratado com telmisartan |

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| α | - Alfa |
| * | - Asterisco |
| β | - Beta |
| $^{\circ}$ | - Grau |
| $^{\circ}\text{C}$ | - Graus Celsius |
| $>$ | - Maior que |
| \geq | - Maior ou igual a |
| + | - Mais |
| \pm | - Mais ou menos |
| $\text{\textcircled{R}}$ | - Marca registrada |
| $<$ | - Menor que |
| \leq | - Menor ou igual a |
| - | - Menos |
| : | - Para (razão matemática) |
| % | - Porcentagem / Por cento |
| TM | - Trademark; Marca comercial |
| Δ | - Delta; variação |
| $\Delta\Delta$ | - Delta delta; variação da variação |

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais | 187 |
| Anexo 2 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais | 188 |
| Anexo 3 - Resultado da prova de defesa pública de tese de doutorado | 189 |
| Anexo 4 - Ata de defesa pública de tese de doutorado | 190 |

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Doença periodontal: aspectos gerais | 37 |
| Hipertensão arterial e sua relação com a doença periodontal | 42 |
| O sistema renina-angiotensina e sua relação com a doença periodontal | 46 |
| MicroRNAs e sua relação com a doença periodontal..... | 50 |
| O tecido ósseo, osteogênese e a relação com micrornas | 57 |
| PROPOSIÇÃO | 63 |

OBJETIVOS

| | |
|-----------------------------|----|
| Objetivo geral | 66 |
| Objetivos específicos | 66 |

- CAPÍTULO 1 -

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Papel dos telmisartan sobre o metabolismo ósseo na mandíbulas de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos com doença periodontal | 68 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------|----|
| RESUMO | 68 |
|--------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO | 69 |
|--------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
|-----------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.1. Animais e aspectos éticos | 71 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| 2.2. Tratamento com telmisartan | 72 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|------------------------------------------|----|
| 2.3. Indução da doença periodontal | 72 |
|------------------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 2.4. Medida não invasiva da pressão arterial sistólica..... | 73 |
|-------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5. Dosagem plasmática de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)..... | 73 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| 2.6. Microtomografia computadorizada (microCT)..... | 74 |
|-----------------------------------------------------|----|

| | |
|------------------------------------------------|----|
| 2.7. Dosagem de mediadores inflamatórios | 74 |
|------------------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| 2.8. Análise de expressão gênica..... | 75 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| 2.9. Imunohistoquímica em cortes parafinizados..... | 77 |
|-----------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| 2.10. Análise estatística..... | 79 |
|--------------------------------|----|

| | |
|---------------------|----|
| 3. RESULTADOS | 79 |
|---------------------|----|

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Telmisartan (TELM) reverte o fenótipo hipertensivo reduzindo a pressão arterial..... | 79 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. SHR apresenta atividade aumentada de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) no plasma..... | 80 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.3. TELM reduz a perda óssea alveolar induzida por DP | 81 |
|--------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. TELM reduziu a expressão de Agt1r e aumentou a expressão de Agt2r no osso alveolar | 83 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5. TELM reduziu a produção de mediadores inflamatórios na mandíbula de ratos com DP | 86 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6. TELM aumentou a expressão de Runx2 e Alp na mandíbula de SHRs com DP | 88 |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7. O eixo Opg/Rankl/Rank foi modulado de maneira diferente pelo TELM em Wistar e SHR..... | 90 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.8. TELM reduz a expressão de marcadores de reabsorção óssea na mandíbula de ratos com DP | 90 |
| 4. DISCUSSÃO | 92 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 98 |
| | |
| - CAPÍTULO 2 - | |
| Perfil de expressão de micrornas na mandíbula de ratos espontaneamente hipertensos com doença periodontal | |
| | 101 |
| RESUMO | 101 |
| 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... | 102 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 104 |
| 2.1. Animais e grupos experimentais..... | 104 |
| 2.1. Indução da doença periodontal | 104 |
| 2.3. Medida não invasiva da pressão arterial | 105 |
| 2.4. Coleta das amostras e avaliação da perda óssea alveolar..... | 105 |
| 2.5. Extração do RNA total | 105 |
| 2.6. Microarranjo de microRNA | 106 |
| 2.7. Análise de dados de microarranjo | 106 |
| 2.8. Predição <i>in silico</i> de alvos de miRNA e análise de enriquecimento de vias | 107 |
| 3. RESULTADOS | 108 |
| 3.1. Animais hipertensos tem maior perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal (DP) | 108 |
| 3.2. SHR apresentam diferenças intrínsecas na expressão de miRNAs na mandíbula..... | 110 |
| 3.3. Predição <i>in silico</i> sugerem vias de sinalização celular e resposta imune .. | 113 |
| modulados por miRNAs em mandíbula de ratos Wistar com DP | 113 |
| 3.4. SHR apresenta um perfil distinto de miRNAs associado a DP | 116 |
| 3.5. MiRNAs são diferencialmente regulados no SHR com DP em relação aos grupos normotensos..... | 121 |
| 4. DISCUSSÃO | 124 |
| 5. CONCLUSÃO | 132 |
| | |
| - CAPÍTULO 3 - | |
| Efeito do hsa-miR-127-3p na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana..... | |
| | 134 |
| RESUMO | 134 |
| 1. INTRODUÇÃO e objetivos | 135 |
| 2. Material e métodos | 137 |
| 2.1. Cultura primária de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hCTM)..... | 137 |
| 2.2. Indução da diferenciação osteogênica | 137 |
| 2.3. Silenciamento e superexpressão do hsa-miR-127-3p | 137 |
| 2.4. Análise da expressão do hsa-miR-127-3p..... | 138 |
| 2.5. Análise de proliferação celular..... | 138 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.6. Análise da viabilidade celular | 139 |
| 2.7. Análise do citoesqueleto de actina | 139 |
| 2.8. Análise da expressão gênica de marcadores osteogênicos | 140 |
| 2.9. Análise da expressão proteica BCL6 por western blot | 141 |
| 2.10. Análise estatística | 141 |
| 3. RESULTADOS | 142 |
| 3.1. A expressão do miR-127-3p não é modulada durante a diferenciação osteogênica | 142 |
| 3.2. Silenciamento do miR-127-3p não afetou a osteogênese em hCTM | 144 |
| 3.3. Superexpressão do miR-127-3p inibe a mineralização de hCTM..... | 146 |
| 3.4. Efeito do hsa-miR-127-3p na proliferação celular..... | 146 |
| 3.5. Superexpressão do miR-127-3p não afeta a organização do citoesqueleto em hCTM..... | 148 |
| 3.6. Superexpressão do miR-127-3p altera a expressão de marcadores osteogênicos | 150 |
| 3.7. BCL6 não está envolvida nos efeitos do miR-127-3p na osteogênese de hCTM..... | 150 |
| 4. DISCUSSÃO | 152 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 154 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 155 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 159 |
| ANEXOS | 186 |
| Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais | 187 |
| Anexo 2 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais | 188 |
| Anexo 3 - Resultado da prova de defesa pública de tese de doutorado | 189 |
| Anexo 4 - Ata de defesa pública de tese de doutorado..... | 190 |

INTRODUÇÃO GERAL

DOENÇA PERIODONTAL: ASPECTOS GERAIS

O periodonto compreende os tecidos adjacentes aos elementos dentários, que exercem a função primária de suporte e proteção dos dentes (Kinane et al., 2017; Pihlstrom et al., 2005). O periodonto apresenta uma organização anatômica e funcional complexa, mas que pode ser dividida nas seguintes estruturas, representadas na Figura 1:

a) Gengiva: Tecido conjuntivo mole que recobre o osso alveolar e a raiz dos dentes na região cervical (junção cimento-esmalte) e pode ser anatomicamente dividida em gengiva marginal e gengiva aderida. Sua função primária é proteger os tecidos internos do periodonto de danos mecânicos e desafios microbiológicos, sendo revestida por epitélios especializados, incluindo o epitélio juncional (aderido ao dente), sulcular (voltado ao dente, mas sem contato íntimo) e gengival (ou oral, voltado à cavidade bucal) (Cho & Garant, 2000);

b) Ligamento periodontal: Tecido conjuntivo intimamente ligado ao cimento radicular, ancorando os dentes ao processo alveolar. Tem importante participação na transmissão das forças oclusais e na adaptabilidade e regeneração do periodonto (Newman et al., 2006);

c) Cimento: Tecido conectivo mineralizado e não vascularizado que cobre a superfície radicular dos dentes, formando uma interface entre a dentina e o ligamento periodontal (Cho & Garant, 2000);

d) Osso alveolar: Processo alveolar dos ossos da mandíbula e maxila que abriga as raízes dos dentes e recebe as pressões oclusais. Trata-se, assim, de uma estrutura ativa com grande capacidade de remodelamento, composto por osso trabecular e uma lâmina de osso compacto (Cho & Garant, 2000; Huja et al., 2006).

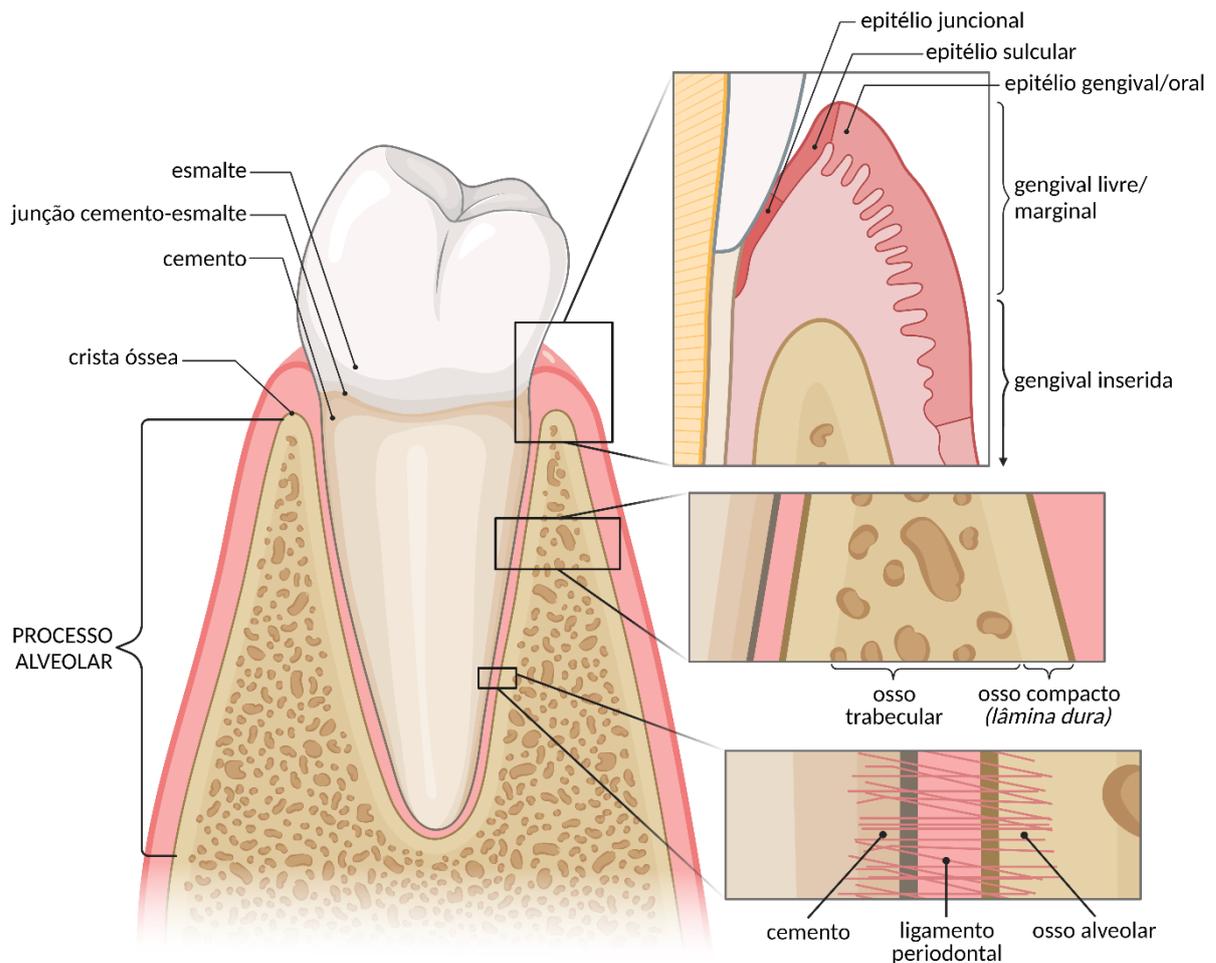


Figura 1. Componentes anatômicos básico. Criado com BioRender.com (Brito, 2023)

A doença periodontal abrange diversas condições inflamatórias que afetam o periodonto. A forma mais comum é causada pelo acúmulo de placa bacteriana ao redor dos dentes devido à higiene oral inadequada (Pihlstrom et al., 2005). No entanto, outras causas também podem ser identificadas, como distúrbios genéticos com manifestações periodontais (Alaluusua et al., 1997; Bailleul-Forestier et al., 2008; Kapferer-Seebacher et al., 2016; Rai et al., 2010; Wiebe et al., 2008), síndromes metabólicas, como diabetes (Preshaw et al., 2012) e osteoporose (Wang & McCauley, 2016), hábitos prejudiciais, como tabagismo e consumo excessivo de álcool (Bergstrom, 2004; Tezal et al., 2001), deficiências imunológicas hereditárias ou

adquiridas (Al-Hezaimi et al., 2012), além de outros fatores menos prevalentes, como deficiências nutricionais, traumas e neoplasias (Newman et al., 2014).

A doença periodontal é altamente prevalente em todo o mundo, estimando-se que afete entre 0,8 e 1,4 bilhões de pessoas, representando um desafio para a saúde pública, especialmente em regiões com populações socioeconomicamente vulneráveis (Chen et al., 2021a). É a principal causa de perda de dentes, resultando em dificuldades na mastigação, comprometimento da fala e impactos negativos na autoestima e qualidade de vida dos indivíduos afetados (Batchelor, 2014; Bonfim Mde et al., 2013).

A patogênese da doença periodontal, ilustrada na Figura 2, envolve o acúmulo de placa bacteriana nos dentes, desencadeando uma resposta inflamatória autolimitada na gengiva (gengivite). Nessa fase, a higiene adequada interrompe o estímulo inflamatório, levando à resolução espontânea do processo (Hasan & Palmer, 2014; Lindhe et al., 2015). Entretanto, se a presença da placa bacteriana persistir, ocorre a cronificação do processo, calcificação da placa bacteriana (cálculo dentário) e formação de bolsas periodontais, caracterizadas pelo aprofundamento do sulco gengival e colonização por microrganismos de estruturas mais internas (Newman et al., 2014; Pihlstrom et al., 2005). A resposta inflamatória, inicialmente protetora, torna-se cada vez mais intensa e a principal responsável pela deterioração dos tecidos periodontais (Cekici et al., 2014).

Nessa fase, a doença periodontal apresenta uma progressão mais acelerada e pode ter consequências irreversíveis para a saúde periodontal, tornando necessário o cuidado odontológico especializado. Sem tratamento, a deterioração dos tecidos pode levar à perda de inserção, resultando na perda do dente, que é uma das consequências mais graves da doença periodontal (Berglundh et al., 2002; Donos et

al., 2012; Schou et al., 2006). Com o tratamento periodontal adequado, é possível eliminar a infecção e promover a restauração parcial dos tecidos, mas a regeneração completa das estruturas periodontais geralmente não ocorre. Além disso, dependendo da gravidade da doença, pode ser necessária uma abordagem de reabilitação protética (Plessas, 2014; Teughels et al., 2014).

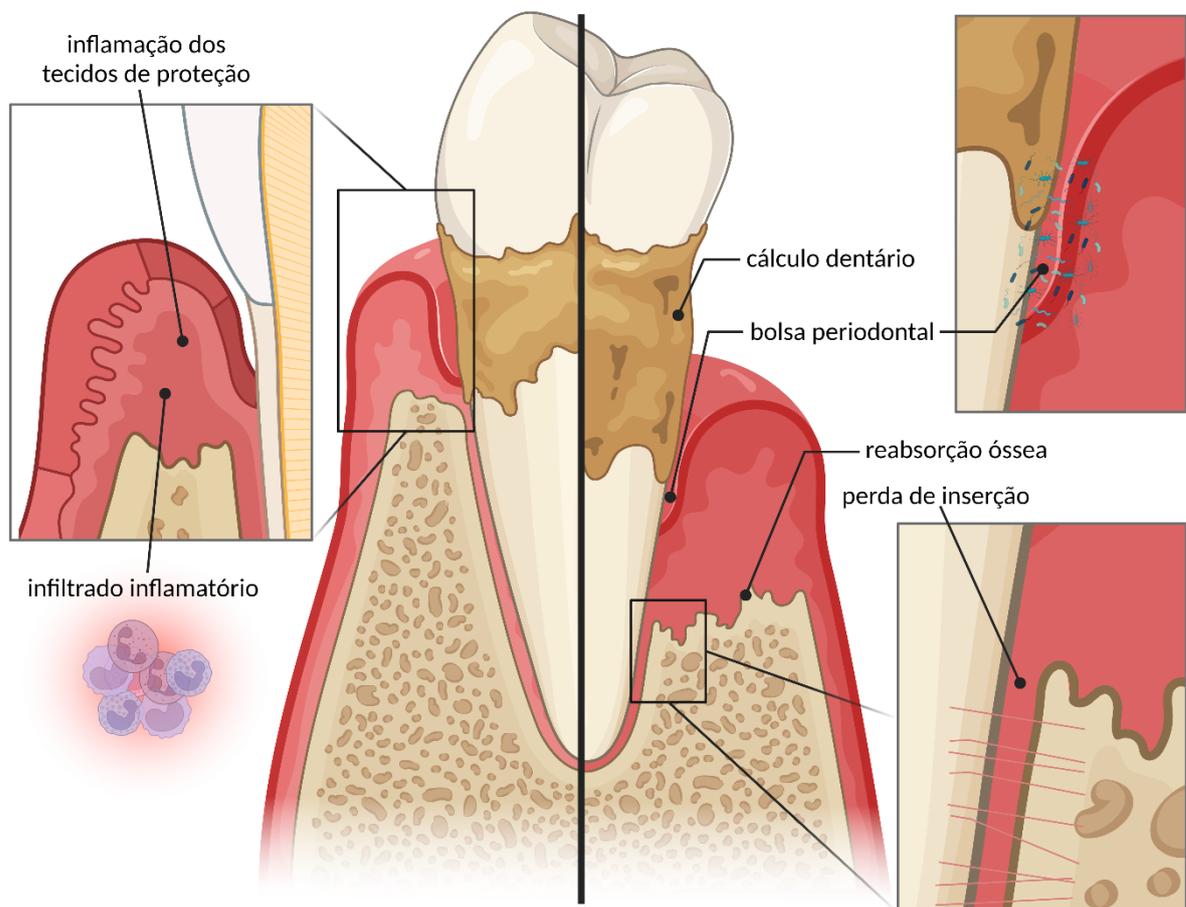


Figura 2. Principais características da doença periodontal. Criado com BioRender.com (Brito, 2023)

Devido à sua alta prevalência, a doença periodontal frequentemente está associada a outras doenças pré-existentes, o que tem um impacto significativo em sua progressão. Embora o fator microbiológico seja determinante para o

desenvolvimento da doença periodontal, sua progressão depende da interação dinâmica entre o patógeno e o hospedeiro (Cekici et al., 2014; Kulkarni & Kinane, 2014). Portanto, comorbidades como hipertensão, diabetes e osteoporose têm um impacto significativo na gravidade das consequências locais da doença periodontal. A relação causal entre essas doenças ainda não é totalmente compreendida, mas cada vez mais estudos sugerem que o aumento sistêmico da carga inflamatória seja o mediador comum entre a doença periodontal e as desordens sistêmicas (Caillon & Schiffrin, 2016; Hajishengallis & Chavakis, 2021).

Além disso, a doença periodontal tem um impacto na saúde sistêmica e é considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares, metabólicas e complicações gestacionais (Hajishengallis & Chavakis, 2021). Sabe-se que a doença periodontal leva a um quadro de inflamação sistêmica de baixo grau, associado a complicações extraorais, e alguns mecanismos foram propostos para explicar esta resposta, como bacteremias transitórias devido ao acesso de patógenos periodontais à circulação sistêmica por meio de úlceras no epitélio gengival (Ohki et al., 2012; Paraskevas et al., 2008).

A doença periodontal não é apenas uma condição localizada na cavidade oral, mas também tem implicações sistêmicas significativas. Sua interação complexa com comorbidades e seu papel como fator de risco para doenças cardiovasculares, metabólicas e complicações gestacionais destacam a importância de abordagens interdisciplinares no cuidado e prevenção da doença periodontal. Desta forma, o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão da doença periodontal, especialmente associada a comorbidades, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de tratamento e prevenção mais eficazes, visando à promoção da saúde global do indivíduo.

HIPERTENSÃO ARTERIAL E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL

A hipertensão arterial sistêmica é caracterizada pelo aumento persistente da pressão arterial e, geralmente, não apresenta sintomas perceptíveis aos pacientes. Isso leva a diagnósticos tardios e complicações resultantes da falta de tratamento, sendo o principal fator de risco associado à morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares. A hipertensão pode ter diferentes causas, mas, de maneira geral, pode ser classificada como hipertensão secundária, quando possui uma causa definida, como alterações endócrinas ou renais, ou como hipertensão primária (ou essencial), quando é idiopática e multifatorial, sem uma causa bem definida (Oparil et al., 2018).

A hipertensão essencial corresponde a aproximadamente 90% dos diagnósticos e, apesar de ser idiopática, pode estar associada a fatores genéticos, devido à sua alta herdabilidade, e, principalmente, a hábitos de vida prejudiciais, como sedentarismo, dieta desequilibrada e tabagismo (Carretero & Oparil, 2000; Harrison et al., 2021). Estima-se que 30% da população seja hipertensa, tornando-se assim um importante problema de saúde pública e, por vezes, considerada uma "epidemia" global (Mills et al., 2020).

A probabilidade de coexistência da hipertensão e da doença periodontal é bastante alta, principalmente por compartilharem fatores de risco (Lockhart et al., 2012). Além disso, evidências têm mostrado uma relação causal entre essas duas patologias, sendo a inflamação sistêmica crônica o principal mediador comum (Boos & Lip, 2006; Dixon et al., 2020).

O estabelecimento da hipertensão arterial apresenta um componente inflamatório importante, e já houve progressos na compreensão do papel da

imunidade inata e adaptativa na patogênese de doenças cardiovasculares (Dixon et al., 2020; Harrison et al., 2011). Por exemplo, o quadro hipertensivo já foi associado ao aumento de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e disfunções endoteliais (Brito et al., 2013; Mirhafez et al., 2014; Rothman et al., 2020). De maneira geral, o aumento da carga inflamatória sistêmica causado pela hipertensão é sugerido como um fator de risco para uma maior susceptibilidade e progressão aumentada da doença periodontal.

Além disso, a hipertensão é considerada um fator de risco para as desordens de perda óssea (Ye et al., 2017), e já foram propostos mecanismos para explicar essa relação, como o metabolismo anormal de cálcio, aumento do paratormônio, alterações nos níveis séricos de vitamina D e K e alterações na produção de óxido nítrico (Ilic et al., 2013). O manejo clínico da perda óssea geralmente inclui agentes farmacológicos antirreabsortivos ou anabólicos (Rodan & Martin, 2000), mas estudos têm mostrado um efeito benéfico de drogas anti-hipertensivas, o que evidencia ainda mais a relação entre a hipertensão e a homeostasia óssea, sugerindo alternativas complementares às abordagens terapêuticas clássicas (Puttnam et al., 2017).

Apesar de haver muitas evidências disponíveis, não há um consenso clínico sobre o efeito da hipertensão na perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal. Estudos de coorte são mais claros ao mostrar uma relação da doença periodontal com comorbidades como diabetes (Roy et al., 2019; Stohr et al., 2021) e osteoporose (Hong et al., 2021; Lee, 2022), enquanto em relação à hipertensão, muitas vezes os resultados são inconclusivos. É importante considerar que, por se tratar de duas doenças com alta prevalência, há um viés epidemiológico relevante, havendo certa dificuldade em identificar indivíduos na população que apresentem apenas uma das duas doenças e apenas as duas doenças associadas. Outras

comorbidades e fatores dificultam a estratificação dos estudos, o que pode resultar em resultados inconclusivos.

Diante disso, os modelos animais são uma alternativa interessante para a investigação experimental. No contexto da hipertensão, o rato espontaneamente hipertenso (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rat*) é um modelo amplamente utilizado no estudo de doenças cardiovasculares e se destaca por mimetizar muitos aspectos da hipertensão essencial humana. Os SHR são uma linhagem isogâmica (*inbred*) desenvolvida a partir do cruzamento exogâmico (*outbred*) de ratos Wistar Kyoto que apresentavam espontaneamente uma elevação acentuada da pressão arterial (Okamoto & Aoki, 1963). Os SHR são normotensos ao nascimento (90-100 mmHg) e apresentam aumento espontâneo da pressão arterial a partir da sexta semana de vida, podendo alcançar valores próximos a 200 mmHg aos 12 meses de idade (Yamori, 1994).

Além da hipertensão, estudos anteriores, incluindo alguns realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que os SHR apresentam alterações no metabolismo ósseo associadas ao genótipo e fenótipo hipertensivo. Essas alterações incluem menor crescimento e densidade mineral óssea, bem como um aumento no *turnover ósseo* (Inoue et al., 1995; Izawa et al., 1985; Tiyatkulkovit et al., 2019). Observou-se também um atraso na osteogênese *in vitro* de precursores mesenquimais em SHR (Chaves Neto et al., 2018; Landim de Barros et al., 2016) e um prejuízo no reparo ósseo (Bastos et al., 2010; Manrique et al., 2012). Além disso, a resposta inflamatória na doença periodontal é aumentada em SHR em comparação com ratos normotensos (Bonato et al., 2012),

Com base nisso, o SHR é um modelo interessante para investigar os mecanismos associados à progressão da doença periodontal no contexto da

hipertensão. Como mencionado, vários mecanismos estão envolvidos na patogênese da hipertensão e podem também estar relacionados à progressão da doença periodontal. Nesta tese, abordaremos especificamente a participação do sistema renina-angiotensina, um dos principais mecanismos fisiopatológicos na hipertensão, e os microRNAs, um mecanismo epigenéticos com importante papel na regulação transcricional, discutidos nos tópicos subsequentes desta introdução.

O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSIA E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL

O sistema renina-angiotensina (SRA), esquematizada na Figura 3, é um sistema peptídico de natureza endócrina, com importante papel na regulação das funções cardiovasculares e renais, como a pressão arterial e o equilíbrio hidroeletrólítico (Laghlam et al., 2021). De maneira resumida, o sistema é composto pelo angiotensinogênio (Agt), que é o principal substrato do SRA e é produzido principalmente no fígado. O Agt é clivado na circulação pela enzima renina (Ren) (produzida majoritariamente pelas células justaglomerulares renais), formando a angiotensina I (AngI) (Hackenthal et al., 1990). A AngI é então convertida em angiotensina II (AngII) pela enzima conversora de angiotensina (Eca ou Ace), que está presente principalmente nas células endoteliais vasculares do tecido pulmonar (Soubrier et al., 1993).

A AngII é considerada o principal peptídeo ativo do SRA e suas ações são mediadas pelos receptores de angiotensina II do tipo 1 e 2 (Agt1r ou AT1R e Agt2r ou AT2R) (de Gasparo et al., 2000). Ambos, receptores transmembrana acoplados a proteína G, mas interessante notar que o AT1R tem efeitos vasoconstritores, pró-inflamatórios e pró-oxidantes, enquanto o AT2R tem efeitos vasodilatadores e anti-inflamatórios, e tem sido demonstrado como um contrarregulador endógeno do AT1R (AbdAlla et al., 2001).

Além do eixo AngII-AT1R/AT2R, existe um outro eixo chamado de não canônico, que envolve a produção de outros peptídeos ativos. Um desses peptídeos é a angiotensina 1-7 (Ang1-7), produzida a partir da clivagem da AngII pela Eca2. A

Ang1-7 também pode ser produzida a partir da AngI pela Eca2, através da formação de angiotensina 1-9 (Ang1-9) e subsequente conversão em Ang1-7 pela Eca.

As ações da Ang1-7 são mediadas pelo receptor Mas (MasR), e possui efeitos biológicos similares aos do AT2R, incluindo vasodilatação, ação anti-inflamatória e antioxidante (Jackson et al., 1988). Em resumo, o eixo não canônico Eca2-Ang1-7-MasR atua como um mecanismo de contra regulação dos efeitos da via AngII-AT1R. Ele limita o acúmulo de AngII e exerce efeitos biológicos opostos, neutralizando, pelo menos em parte, as ações do AT1R (F. Jiang et al., 2014).

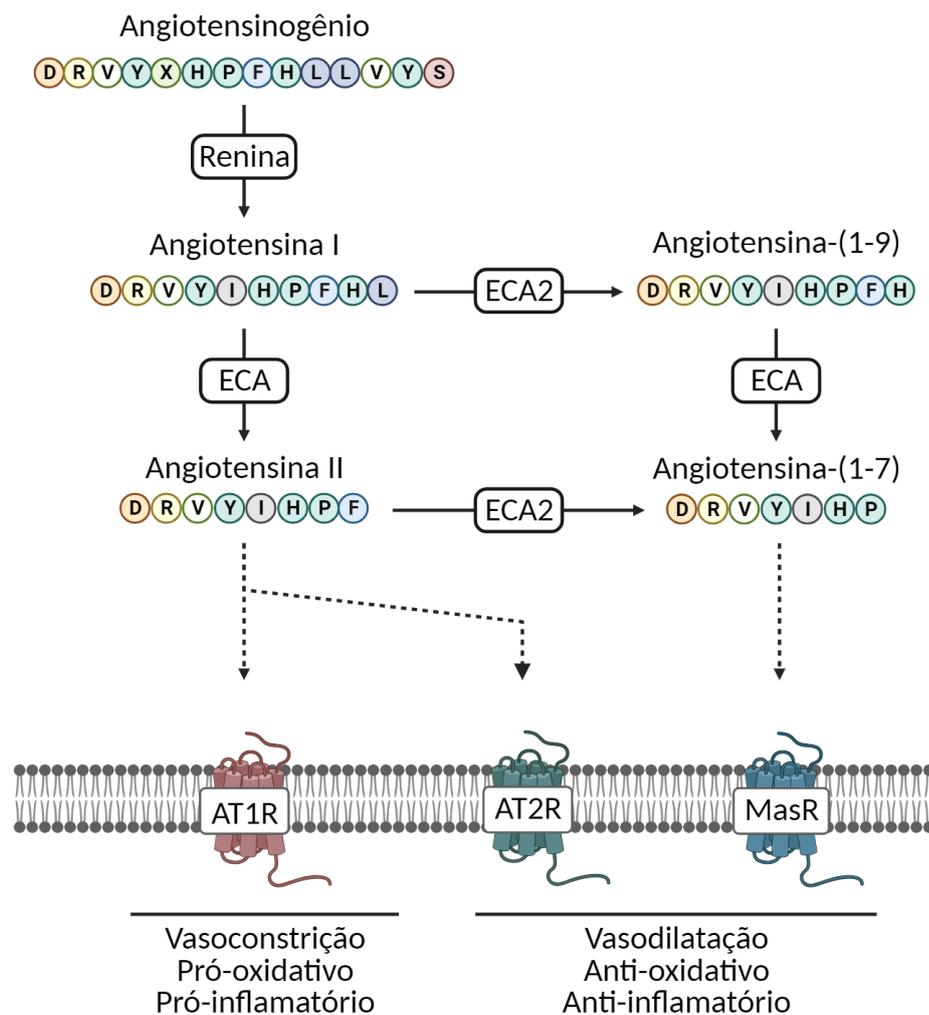


Figura 3. Componentes do sistema renina-angiotensina. Adaptado de BioRender Template Brain Renin Angiotensin System (Walls A, 2023).

Além do sistema renina-angiotensina endócrino, classicamente descrito, foi observado que os componentes do SRA também estão presentes em diferentes tecidos, o que levou à caracterização dos chamados sistemas renina-angiotensina locais, ou tecido-específicos. Esses sistemas podem atuar parcialmente ou totalmente independentemente dos componentes circulantes do SRA (Paul et al., 2006), ampliando assim a compreensão do SRA como não apenas um sistema endócrino, mas também como um sistema parácrino e autócrino.

A expressão dos componentes do SRA em tecidos específicos tem sido amplamente documentada (Campbell, 2014), e desempenham papéis importantes em diversas funções fisiológicas e patológicas, incluindo a resposta inflamatória, proliferação e diferenciação celular, metabolismo, resposta a lesões e estresse, e reparo tecidual (Almutlaq et al., 2021; Husain et al., 2015; Saravi et al., 2021; Shahveisi et al., 2014).

No contexto da biologia periodontal, estudos têm descrito a presença de sistemas renina-angiotensina locais nos tecidos periodontais em diferentes modelos experimentais (Ohuchi et al., 2004; Santos et al., 2015; Souza et al., 2007). Além disso, a inibição da via AngII-AT1R já foi associada à inibição do processo inflamatório periodontal (Dionisio et al., 2020; Gabriele et al., 2017; Li et al., 2019; Oliveira et al., 2019). Essas evidências sugerem o envolvimento dos sistemas renina-angiotensina locais na regulação da inflamação e da resposta imune na doença periodontal. No entanto, a regulação desses sistemas no tecido ósseo alveolar ainda é pouco estudada e requer mais investigações.

De fato, estudos clínicos e experimentais têm evidenciado um papel importante do sistema renina-angiotensina na biologia óssea (Mo et al., 2020; Zhao et al., 2019), no entanto, alguns resultados são conflitantes. Por exemplo, estudos mostraram que

a inibição de renina e a enzima conversora de angiotensina (Eca), pode reduzir a perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal (Oliveira et al., 2019) e prejuízos ósseos decorrentes da ovariectomia em camundongos (Zhang et al., 2016). Além disso, a inibição da Eca foi associada a uma maior densidade mineral óssea em homens e mulheres em estudos de coorte (Garcia-Testal et al., 2006; Rianon et al., 2017) e foi capaz de prevenir parcialmente a osteoporose em ratas hipertensas ovariectomizadas (Shimizu et al., 2009).

Em relação ao bloqueio do receptor de angiotensina, trabalhos já encontraram associação entre o bloqueio de AT1 e menor incidência de fraturas em idosos (Kwok et al., 2017), enquanto outro estudo não observou diferenças significativas (Butt et al., 2014). Além disso, o eixo Eca2/Ang1-7/Masr tem sido associado aos efeitos preventivos da inibição da Eca em ratas osteoporóticas (Abuhashish et al., 2017). No entanto, um estudo mostrou que o tratamento com os antagonistas de AT1R telmisartan e losartana não teve efeito nos marcadores de turnover ósseo em pacientes hipertensos (Aydogan et al., 2019), enquanto outro estudo mostrou que o telmisartan reduziu a densidade mineral óssea em ratos hipertensos (Birocale et al., 2016).

É importante ressaltar que as diferenças nas populações estudadas, nos modelos experimentais e nas metodologias utilizadas podem contribuir para esses resultados conflitantes, e desta forma, a investigação e a melhor compreensão do SRA local na doença periodontal, especialmente na perda óssea alveolar no contexto da hipertensão, podem fornecer insights sobre novas estratégias terapêuticas direcionadas aos tecidos periodontais.

MICRORNAS E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNA não codificantes, compostos por aproximadamente 22 nucleotídeos, que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica. Descobertos em nematoides (*Caenorhabditis elegans*) em 1993 (Lee et al., 1993), e, desde então, têm sido identificados em diversos organismos como um mecanismo epigenético de regulação pós-transcricional, envolvido em várias funções celulares (Bartel, 2004; Dexheimer & Cochella, 2020).

A biogênese dos miRNAs é um processo complexo e finamente regulado. Resumidamente, na via canônica, os genes de miRNA, geralmente encontrados em regiões intergênicas, são transcritos pela RNA polimerase II, dando origem aos microRNAs primários (pri-miRNAs) (Lee et al., 2004). Os pri-miRNAs são transcritos longos, com aproximadamente 200 nucleotídeos, apresentando 5' cap e cauda poli-A, e adotam uma estrutura em forma de grampo (*hairpin*) (Bartel, 2004; Lee et al., 2002).

Ainda no núcleo, os pri-miRNAs são processados pelo complexo microprocessador que inclui a enzima Drosha, uma ribonuclease III de classe 2, e seu cofator DGCRB8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), uma proteína de ligação a RNA (*RNA-binding protein*). Os pri-miRNAs são clivados nas regiões terminais 3' e 5', gerando um hairpin menor chamado de miRNA precursor (pré-miRNA), com aproximadamente 70 a 100 nucleotídeos (Han et al., 2004; Lee et al., 2003) (Figura 4A).

Os pré-miRNAs são então transportados para o citoplasma por proteínas como a Exportina-5, que reconhece e transporta os pré-miRNAs através dos poros nucleares (Kim, 2004; Lund et al., 2004). No citoplasma, os pré-miRNAs são

processados pela enzima Dicer, uma ribonuclease que cliva os pré-miRNAs em uma molécula de RNA de fita dupla (dúplex de microRNA), com cerca de 20-25 nucleotídeos (Lee et al., 2003). As dúplex de microRNA contém as fitas dos miRNAs maduros 3p e 5p, denominados a partir de sua orientação no pré-miRNA, e uma de suas características distintas é não serem perfeitamente paralelas ou complementadas, apresentando pequenos loops (Figura 4A) (Bartel, 2004).

Além disso, também existe a biogênese de miRNAs por vias alternativas, ou não canônicas (Miyoshi et al., 2010). Por exemplo, os miRNAs originados de íntrons de genes codificadores, conhecidos como mirtrons. Nesses casos, os pré-miRNAs são gerados durante o processo de *splicing* e não requerem o processamento pelo complexo microprocessador, mas seguem a via canônica após a exportação do núcleo (Okamura et al., 2007).

A principal ação dos miRNAs é o silenciamento de RNAs mensageiros (mRNA) específicos, que é mediada por um complexo ribonucleoprotéico, denominado RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*) (Hammond et al., 2001). O miRNA duplex é incorporado ao RISC, e uma das fitas (3p ou 5p) é ancorada seletivamente à proteína Argonauta (Ago), tornando-se a fita funcional, enquanto a outra fita, conhecida como fita passageira, é ejetada do RISC e eventualmente degradada (Figura 4A) (Medley et al., 2021). Embora ambas as fitas possam ser selecionadas, geralmente apenas uma delas predomina como a fita funcional, mas em alguns casos, ambas as fitas são funcionais (Bartel, 2009). Acredita-se que as fitas de miRNA maduras que contenham uracila na região 5' e/ou aquelas com menor estabilidade termodinâmica tenham maior probabilidade de serem selecionadas, embora muitos casos não sigam esses padrões, e os mecanismos que governam a seleção da fita

funcional ainda não foram completamente elucidados (Medley et al., 2021; Meijer et al., 2014).

Dentro do RISC, os miRNAs interagem com os mRNAs-alvo por meio de pareamento de bases complementares (Figura 4B) (Dexheimer & Cochella, 2020). A sequência *seed* dos miRNAs, geralmente composta pelos nucleotídeos 2 a 8 na extremidade 5', é o principal elemento de reconhecimento dos mRNAs-alvo, de modo que miRNAs que compartilham a mesma sequência *seed* são agrupados em famílias. Nos casos em que há o pareamento perfeito da sequência *seed* com a região 3' não codificante (3'UTR, do inglês *untranslated region*) do mRNA-alvo, ocorre a degradação desse mRNA. Por outro lado, em casos de pareamento parcial da sequência *seed*, a interação entre o miRNA e o mRNA pode ser estabilizada pelo pareamento complementar na região 3' do miRNA, resultando na inibição da tradução da proteína do mRNA-alvo (Bartel, 2004) (Figura 4C).

Curiosamente, há evidências da ação direta dos miRNAs na regulação positiva da tradução de mRNAs, embora seja um mecanismo ainda pouco estudado (Ramchandran & Chaluvally-Raghavan, 2017). Esse fenômeno foi observado apenas *in vitro* durante a interrupção do ciclo celular, no estado G0, e não foi observado em estados proliferativos (Bukhari et al., 2016; Truesdell et al., 2012; Vasudevan et al., 2007).

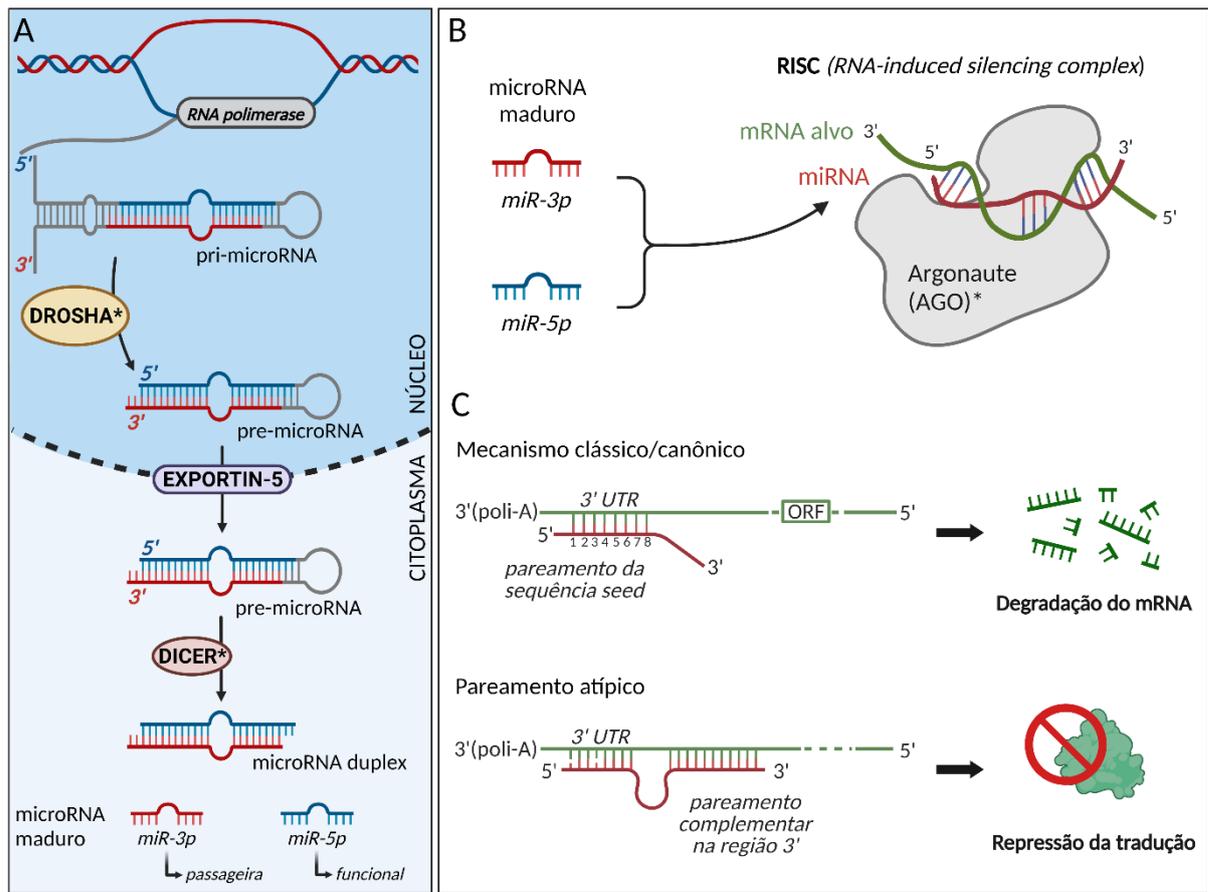


Figura 4. Biogênese e mecanismo de ação dos microRNAs. (A) Biogênese dos microRNAs, (*) complexos proteicos representados pelo componente principal; (B) Complexo RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*); (C) Mecanismos de ação dos microRNAs. Criado com BioRender.com (Brito, 2023)

A maioria dos processos biológicos é regulada de alguma forma por microRNAs. Embora apenas cerca de 2% do genoma humano consista em genes miRNA, estima-se que mais de 60% dos genes codificadores sejam regulados por miRNAs em nível pós-transcricional (Friedman et al., 2009). Devido ao seu pequeno tamanho, os miRNAs têm o potencial de modular a expressão de centenas ou até milhares de genes simultaneamente. No entanto, é importante destacar que a função biológica dos miRNAs é específica para tecidos ou células.

As interações entre miRNAs e mRNAs ocorrem quando o miRNA está suficientemente expresso simultaneamente com seus mRNAs-alvos (Bartel, 2009).

Essas interações resultam em alterações sutis na expressão gênica e/ou proteica e, às vezes, atuam de forma redundante nos circuitos de regulação gênica, mediando o chamado "efeito tampão" sobre o ruído transcricional. Isso contribui para a robustez das redes regulatórias de expressão gênica, reduzindo a flutuação na transcrição genética e, conseqüentemente, na tradução proteica (Ebert & Sharp, 2012; Strovas et al., 2014).

A regulação de processos biológicos por miRNAs geralmente envolve uma rede de diferentes miRNAs que podem modular de forma redundante a mesma via biológica, produzindo coletivamente um efeito biológico robusto. Isso ocorre especialmente quando os alvos são elementos centrais de uma via biológica, produzindo coletivamente efeitos generalizados, como na sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, diferenciação celular e morfogênese (Alvarez-Garcia & Miska, 2005; Ambros, 2004). A sofisticação e sutileza da regulação genética mediada por miRNAs são talvez seus aspectos mais interessantes. Os avanços nas técnicas para avaliação de sua expressão, assim como para a modulação de sua expressão *in vivo* e *in vitro* tem tornado os miRNAs potencialmente úteis no estudo de doenças complexas, inclusive como ferramentas terapêuticas e diagnósticas.

No entanto, investigar a função de miRNAs específicos pode ser desafiador, uma vez que seus efeitos dependem dos mRNA-alvos. Identificar e validar essas interações requer o uso de técnicas como avaliação do transcriptoma, imunoprecipitação e ensaios de luciferase. Nesse contexto, avanços nas análises computacionais (*in silico*) têm se mostrado cada vez mais úteis para direcionar essas investigações (Riolo et al., 2020). Quanto à modulação da expressão dos miRNAs, técnicas baseadas em vetores virais e o uso de moléculas de RNA sintéticas que mimetizam ou antagonizam miRNAs endógenos têm se mostrado abordagens

experimentais muito úteis. Entretanto, a aplicação clínica dos miRNAs requer uma compreensão mais aprofundada de suas funções no transcriptoma e proteoma de diferentes tipos de células e tecidos, bem como de seus possíveis efeitos adversos (*off-target*) (Hanna et al., 2019; McAlinden & Im, 2018).

Vários miRNAs já foram associados à regulação de processos inflamatórios e reparo tecidual (Jiang et al., 2022; Sonkoly & Pivarcsi, 2009), incluindo na doença periodontal (Irwandi & Vacharaksa, 2016; Mico-Martinez et al., 2021). Por exemplo, o miR-146a é um dos miRNAs mais estudados no contexto da inflamação periodontal, e sua regulação positiva no tecido gengival e na circulação tem sido associada à gravidade da doença periodontal, sendo considerado um importante biomarcador (Ghotloo et al., 2019; Motedayyen et al., 2015; Xie et al., 2011). Além disso, miRNAs da família miR-200 foram associados a efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a produção de citocinas e a formação de osteoclastos (Akkouch, Eliason, et al., 2019; Akkouch, Zhu, et al., 2019; Krongbarammee et al., 2021).

No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos na área da biologia periodontal tem se concentrado na investigação dos tecidos moles do periodonto, como a gengiva e o ligamento periodontal, além de matrizes biológicas, como saliva e fluido crevicular, mas a pesquisa sobre a modulação de miRNAs relacionada às alterações no osso alveolar ainda é limitada. O perfil de expressão de miRNAs já foi avaliado na mandíbula de camundongos com osteoporose induzida por ovariectomia (Hao et al., 2016) e na maxila de ratos com lesão periapical (Gao & Zheng, 2013). No entanto, em relação ao osso alveolar especificamente, no contexto da doença periodontal, os estudos ainda são escassos.

Nas áreas da biologia óssea e ortopedia, os miRNAs tem sido extensivamente estudada na homeostase e em desordens do tecido ósseo (Hensley & McAlinden,

2021; Liu et al., 2019). Além disso, a função de vários miRNAs já foram funcionalmente caracterizada em osteoblastos (Arfat et al., 2015) e osteoclastos (Lozano et al., 2019; Weivoda et al., 2021). Há uma necessidade melhor compreender o papel de miRNAs na regulação do osso alveolar no contexto da doença periodontal, como proposto no capítulo 2 desta tese. Esse estudo pode fornecer insights sobre os mecanismos moleculares envolvidos na progressão da doença, e potencialmente evidenciar miRNAs relevantes que direcionem abordagens terapêuticas mais eficazes para o tratamento da doença periodontal e outras condições relacionadas ao tecido ósseo.

O TECIDO ÓSSEO, OSTEOGÊNESE E A RELAÇÃO COM MICRORNAS

O tecido ósseo é uma forma rígida de tecido conjuntivo que desempenha diversas funções essenciais no organismo humano. Além de fornecer suporte e proteção aos tecidos moles, o tecido ósseo também possui funções metabólicas, endócrinas e hematopoiéticas, tornando-se um componente fundamental para a homeostase e a saúde geral do corpo (Burr & Allen, 2019).

O desenvolvimento do esqueleto tem início no primeiro trimestre intrauterino e continua ao longo dos anos pós-natais, ocorrendo por meio de dois processos distintos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa resulta na formação de ossos chatos e de formato irregular, como os ossos do crânio, incluindo a mandíbula e a maxila, a escápula e a clavícula. Esse processo acontece dentro de membranas de tecido conjuntivo, através da aglomeração de células-tronco mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos, formando um centro primário de ossificação. Por outro lado, a ossificação endocondral é responsável pela formação da maioria dos ossos e ocorre a partir de um molde de cartilagem, que é gradualmente substituído por tecido ósseo mineralizado, por meio da diferenciação osteogênica dos condrócitos.

Macroscopicamente, os ossos maduros podem ser divididos em osso cortical (ou compacto), que é essencial para suportar cargas devido à sua maior densidade, e osso trabecular (ou esponjoso), que é mais poroso e possui uma microarquitetura específica, desempenhando um papel importante na redistribuição das tensões exercidas sobre o osso para a região cortical. A regulação da composição mineral e organização da matriz orgânica do tecido é essencial para a manutenção das propriedades e funções dos ossos. A matriz inorgânica, composta principalmente por

hidroxiapatita contendo cálcio e fosfato, representa cerca de 65% do peso seco dos ossos. Além disso, outros componentes, como carbonatos, citratos, sódio, fluoretos e estrôncio, estão presentes em proporções menores (Fleisch, 2000). A matriz orgânica, por sua vez, constitui aproximadamente 25% do peso dos ossos e é composta principalmente por proteínas colágenas (cerca de 90%) e proteínas não colágenas, como osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea e osteocalcina (Burr & Akkus, 2014). A matriz orgânica serve de arcabouço para a deposição mineral e é fundamental para a microarquitetura do tecido ósseo, conferindo força, rigidez e regulando a taxa de deposição mineral.

A homeostase dinâmica do tecido ósseo é mantida através das atividades coordenadas de osteoblastos e osteoclastos. Os osteoclastos têm origem na diferenciação e fusão de macrófagos na medula óssea e são responsáveis pela reabsorção óssea através da liberação de enzimas e ácidos que degradam a matriz mineralizada (Veis & O'Brien, 2023). Eles desempenham um papel fundamental no remodelamento ósseo, um processo contínuo, que permite a substituição do tecido velho ou danificado por um tecido novo, essencial para a manutenção da integridade do esqueleto adulto (Siddiqui & Partridge, 2016; L. Wang et al., 2022). Os osteoblastos, por sua vez, têm origem nos precursores mesenquimais do estroma da medula óssea e são responsáveis pela formação óssea, incluindo a produção e a mineralização da matriz extracelular (Long, 2011).

A osteogênese é um processo finamente controlado por diversos fatores que regulam os diferentes estágios da diferenciação. A diferenciação na linhagem osteogênica se inicia com o comprometimento fenotípico de células osteoprogenitoras, e depende de dois fatores de transcrição mestres, o fator de transcrição relacionado a runt-2 (Runx2, alternativamente, Cbfa1) (Komori et al.,

1997), e osterix (Osx, alternativamente, Sp7) (Nakashima et al., 2002). Ambos são essenciais tanto nos estágios iniciais quanto na manutenção do fenótipo osteoblástico (Long, 2011)., e regulam a expressão de outros genes associados às funções dos osteoblastos como colágeno tipo I, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, e osteocalcina, brevemente descritos a seguir:

a) *Colágeno tipo I (Cal1a1)*: Amplamente produzido pelos osteoblastos e o principal constituinte da matriz extracelular que confere rigidez, estabilidade e resiliência ao tecido devido a sua configuração estrutural e organização (Brodsky & Persikov, 2005);

b) *Fosfatase alcalina (Fal ou Alp)*: Enzima ancorada na membrana dos osteoblastos com um importante papel na disponibilização de íons fosfato para o processo de deposição mineral (Pizauro et al., 1995; Simao et al., 2007);

c) *Osteopontina (Opn)*: Proteína não-colágena abundante com papel na adesão das células ósseas (Butler et al., 1996), além regulam sua ativação e motilidade (Denhardt et al., 2001; Reinholt et al., 1990; Ross et al., 1993);

d) *Sialoproteína óssea (Bsp)*: Proteína expressa no início da mineralização e com alta afinidade as fibras de colágeno, contribuindo para a nucleação inicial dos cristais de hidroxiapatita (Fujisawa et al., 1995; Ganss et al., 1999);

e) *Osteocalcina (Ocn)*: Uma das principais proteínas não colágenas da matriz óssea e considerada um marcador da maturação dos osteoblastos, por ser expressa no estágio tardio da diferenciação; Tem alta afinidade aos cristais de hidroxiapatita, sendo componente chave da mineralização, regulando o crescimento dos cristal (Boskey et al., 1998).

O progresso da diferenciação é marcado pela relação inversa com proliferação destas células e pelo padrão temporal da expressão destas proteínas específicas, que

podem ser usadas como marcadores das fases do desenvolvimento e função dos osteoblastos, como esquematizados na Figura 5.

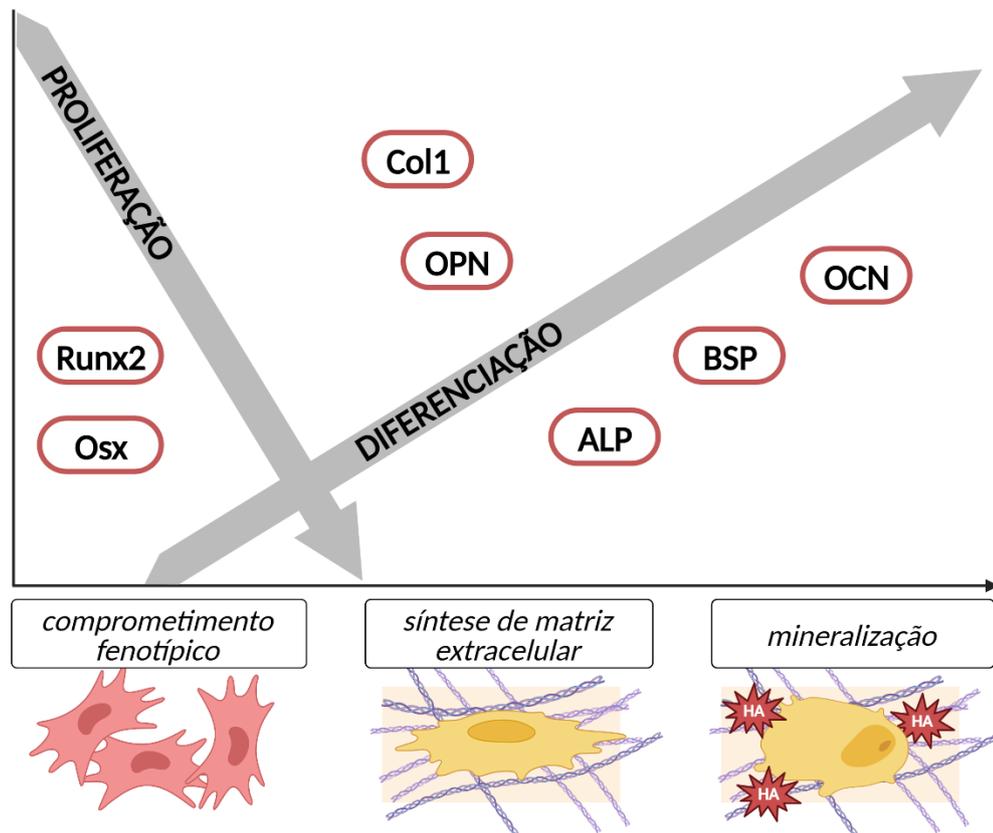


Figura 5. Principais fases e marcadores da diferenciação osteogênica. Runx2, *Runt-related transcription factor 2*; Osx, osterix; Col1, colágeno tipo 1; OPN, osteopontina; ALP, fosfatase alcalina; OCN, osteocalcina; BSP, sialoproteína óssea; HÁ, hidroxiapatita. Criado com BioRender.com, baseado em Stein and Lian (1993).

Após a maturação, os osteoblastos têm três destinos possíveis. Eles podem permanecer na matriz mineralizada, diferenciando-se em osteócitos, que constituem cerca de 95% das células no tecido ósseo maduro. Os osteócitos desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase do tecido, regulando a remodelação óssea em resposta a sinais mecânicos e hormonais (Delgado-Calle & Bellido, 2022;

Robling & Bonewald, 2020). Outra possibilidade é que os osteoblastos maduros se tornem osteoblastos quiescentes, que revestem as superfícies ósseas inativas (Miller et al., 1989), e por fim, alguns osteoblastos podem entrar em apoptose (Jilka et al., 1998).

Os miRNAs têm um importante papel tanto na diferenciação das células osteoprogenitoras quanto na atividade das células maduras, regulando a rede de expressão gênica que governa as respostas dessas células a diferentes estímulos. Nesse contexto, um número crescente de miRNAs vem sendo identificado e estudado, como revisado por diferentes autores (Hensley & McAlinden, 2021; Huang et al., 2017; Wang et al., 2019). Por exemplo, estudos têm demonstrado que a superexpressão de miR-23a, miR-27b-3p, miR-93-5p, miR-132-3p e miR-145 inibe a diferenciação osteogênica in vitro de precursores mesenquimais (Hao et al., 2018; Peng et al., 2017; Xu et al., 2019; Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2017), enquanto a superexpressão de miR-29a, miR-98 e miR-342-3p tem o efeito oposto (Gao et al., 2018; Han et al., 2018; Tan et al., 2018).

As desordens esqueléticas geralmente são caracterizadas por um desequilíbrio na diferenciação e função dos osteoblastos e osteoclastos, por exemplo em condições como osteoporose, osteoartrite e doença periodontal. Nessas condições, processos inflamatórios crônicos dentro ou próximos aos ossos prejudicam a dinâmica tecidual adequada, e prejuízos na osteogênese podem comprometer o reparo da reabsorção óssea patológica (Epsley et al., 2020; Redlich & Smolen, 2012). Nesse contexto, devido a sua capacidade dos miRNAs em regular várias proteínas e vias diferentes, esses têm chamado a atenção como candidatos promissores para a terapia de doenças complexas (McAlinden & Im, 2018; Simonson & Das, 2015).

Os avanços nas tecnologias de modulação dos miRNAs *in vivo* têm aberto caminho para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas interessantes, e além disso os miRNAs podem ser úteis como marcadores diagnósticos e prognósticos, bem como para o monitoramento terapêutico. Um exemplo interessante é a modulação transiente de miRNAs por meio de inibidores e agonistas, também chamados de mímicos ou antagomiRs, que oligonucleotídeos sintéticos, com modificações químicas que os tornam mais estáveis que os miRNAs endógenos, o que já veem sendo explorados por a companhias biofarmacêuticas (Chakraborty et al., 2021).

Entretanto, é importante ressaltar que a maioria dessas novas abordagens ainda são experimentais, e não uma realidade clínica. Avanços importantes ainda precisam ser feitos em relação a melhor caracterização dos efeitos dessas molecular a nível sistêmico, bom como possíveis efeitos off-target (Jin et al., 2015). Além disso, a administração local desses novos “medicamentos” ainda é desafiadora em tecidos mineralizados (Saiyed et al., 2022).

Ainda assim, a caracterização funcionais de novos miRNAs na homeostase dos tecidos e em desordens de interesse clínico são de grande interesse para a comunidade, como proposto no capítulo 3 desta tese, onde avaliamos os efeitos do miR-127-3p na osteogênese de precursores mesenquimais *in vitro*, após identificarmos que este miRNA foi inibido na mandíbula de ratos com doença periodontal.

PROPOSIÇÃO

A doença periodontal e a hipertensão arterial são altamente prevalentes e compartilham fatores de risco comuns, além de possíveis relações causais. Essas condições representam um desafio significativo à saúde pública, com impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos, e especialmente preocupante nas populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica, onde a prevalência é muito maior. Vale ressaltar que o estudo dessas condições em humanos é desafiador devido à dificuldade de estratificar populações que apresentem apenas uma dessas condições, uma vez que são amplamente prevalentes e frequentemente estão associadas a outras comorbidades.

Nesse sentido, o uso de modelos experimentais desempenha um papel fundamental, pois permite um maior controle das variáveis a serem analisadas e oferece maior flexibilidade no delineamento de intervenções e condições experimentais, sempre respeitando as diretrizes éticas para o uso de animais em pesquisa. No contexto do presente trabalho, os animais SHR se destacam como um modelo interessante, uma vez que apresentam uma progressão agravada da doença periodontal associada ao fenótipo hipertensivo.

Nosso trabalho teve como propósito investigar a participação do sistema renina-angiotensina, um mecanismo patológico importante na hipertensão que já foi associado à progressão da doença periodontal. Além disso, analisamos o perfil de miRNAs na mandíbula desses animais. A maioria dos estudos disponíveis se concentram nos tecidos moles do periodonto, havendo uma lacuna em relação aos microRNAs específicos do osso alveolar, e sua relação as alterações induzidas pela doença periodontal.

Por fim, a partir de miRNAs diferencialmente expressos na mandíbula de animais com doença periodontal, buscamos por aqueles que apresentassem sequência conservada entre espécies e cuja função na diferenciação de células osteoprogenitoras não houve sido elucidada, a fim de identificar miRNAs que pudessem ter um papel significativo não apenas no osso alveolar, mas na homeostase óssea, ou em desordens ósseas de outras naturezas. Nesse contexto, realizamos a caracterização funcional de um microRNAs de interesse, miR-127-3p, na diferenciação osteogênica de células mesenquimais da medula óssea humana.

Esta tese foi então dividida em três capítulos, apresentados na forma de artigos científicos, cujos objetivos estão elencados a seguir. Destacamos aqui a importância destes trabalhos, que visam uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença periodontal no contexto da hipertensão arterial.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos relacionados à perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal em ratos hipertensos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A. Avaliar a participação do sistema renina-angiotensina local na perda óssea alveolar em ratos espontaneamente hipertensos com doença periodontal, através da inibição farmacológica do receptor de angiotensina II do tipo 1.

B. Avaliar o perfil de expressão diferencial de miRNAs associado à perda óssea alveolar em ratos espontaneamente hipertensos com doença periodontal, por meio de microarranjos, e evidenciar possíveis mecanismos regulados por miRNAs através de análises bioinformáticas.

C. Caracterizar a função do miR-127-3p na diferenciação osteogênica, por meio do silenciamento e superexpressão *in vitro* em células osteoprogenitoras humanas

- CAPÍTULO 1 -

1 **PAPEL DOS TELMISARTAN SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO NA**
2 **MANDÍBULAS DE RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE**
3 **HIPERTENSOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

4

5 Neste **Capítulo 1**, apresenta-se um estudo sobre a influência do sistema
6 renina-angiotensina na perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal em
7 ratos espontaneamente hipertensos. Os dados foram publicados em forma de artigo
8 científico, do qual foram extraídas as figuras (**Brito VGB**, Patrocínio MS, de Sousa
9 MCL, Barreto AEA, Frasnelli SCT, Lara VS, Santos CF, Oliveira SHP. Telmisartan
10 Prevents Alveolar Bone Loss by Decreasing the Expression of Osteoclast Markers in
11 Hypertensive Rats with Periodontal Disease. **Front Pharmacol.** Nov 2020 11;
12 11:579926. doi: 10.3389/fphar.2020.579926).

13

14

15 **RESUMO**

16 A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória com alta prevalência, sendo
17 a perda óssea alveolar sua consequência mais severa. Estudos têm demonstrado um
18 papel importante do sistema renina-angiotensina (SRA) no processo inflamatório, o
19 qual já foi caracterizado em tecidos periodontais. Neste trabalho, nosso objetivo foi
20 avaliar os efeitos do telmisartan (TELM), um antagonista do receptor tipo 1 da
21 angiotensina II (Agtr1), na perda óssea alveolar induzida pela DP em ratos Wistar
22 (normotensos) e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs). A DP foi induzida por
23 meio de ligadura bilateral nos primeiros molares inferiores em ratos tratados com
24 TELM (10 mg/kg), durante 15 dias. Os SHRs apresentaram maior perda óssea
25 alveolar em comparação com os Wistar, a qual foi significativamente prevenida pelo
26 TELM, parcialmente explicada pela redução da produção de citocinas inflamatórias.
27 Em relação à modulação dos componentes do SRA na mandíbula, a DP resultou em
28 aumento da expressão de Agt, enquanto a expressão de Agtr2 diminuiu. Por sua vez,
29 o tratamento com TELM reduziu a expressão de Agtr1, aumentou a expressão de
30 Agtr2, além de elevar a expressão de Runx2 e Alp, e prevenir o aumento da expressão
31 de marcadores de reabsorção óssea, Mmp9, Ctsk e Vtn. Nosso estudo sugere que o
32 TELM possui um efeito protetor na progressão da DP, especialmente em animais

33 hipertensos, parcialmente explicado pela modulação na expressão dos receptores de
34 angiotensina II (Agtr1 e Agtr2), menor produção de mediadores inflamatórios, menor
35 expressão dos marcadores de reabsorção e aumento da expressão dos marcadores
36 de formação óssea.

37

38

39 **1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO**

40 A doença periodontal (DP) é considerada a doença inflamatória mais prevalente
41 mundialmente, afetando principalmente as estruturas que revestem e sustentam os
42 dentes, incluindo a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar (Pihlstrom et
43 al., 2005). Sem cuidados adequados, pode levar à perda dentária, redução na
44 qualidade de vida, dificuldades de mastigação e problemas na fala, sendo, portanto,
45 considerada um problema de saúde pública. A DP se inicia com a inflamação gengival
46 causada pelo acúmulo de biofilme nos dentes. No entanto, a progressão da DP não
47 depende apenas de fatores microbianos, mas também da resposta inflamatória do
48 organismo, que desempenha um papel fundamental na destruição dos tecidos.
49 Comorbidades como hipertensão podem afetar significativamente a gravidade da
50 doença, aumentando a carga inflamatória e induzindo alterações como aumento do
51 estresse oxidativo e ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) (Macedo Paizan
52 & Vilela-Martin, 2014).

53 O SRA é um importante sistema endócrino que regula o equilíbrio de eletrólitos
54 e a pressão arterial, desempenhando um papel central na patogênese da hipertensão.
55 Além disso, tem sido amplamente estudado por seu papel na inflamação. De forma
56 resumida, o angiotensinogênio (Agt) é clivado pela renina em angiotensina (Ang) I,
57 que, por sua vez, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (Ace) em Ang II.
58 Os principais efeitos da Ang II são mediados pelo receptor tipo 1 (At1r), incluindo

59 vasoconstricção, aumento da pressão arterial, estresse oxidativo e estado inflamatório
60 (Capettini et al., 2012; Paul et al., 2006). Por outro lado, o receptor tipo 2 da Ang II
61 (At2r) tem efeitos opostos, induzindo vasodilatação para reduzir a pressão arterial,
62 além de possuir ações anti-inflamatórias (Paz Ocaranza et al., 2020).

63 Além do eixo clássico, ou canônico, o eixo não-canônico do SRA envolve a
64 enzima conversora de angiotensina 2 (Ace2), que cliva a Ang II em Ang 1-7 ou a Ang
65 I em Ang 1-9, que pode ser clivada pela Ace em Ang 1-7. A Ang 1-9 pode ativar o
66 receptor At2r, enquanto a Ang 1-7 se liga ao receptor Mas (Masr), desencadeando
67 efeitos opostos aos da sinalização do At1r, semelhantes aos do At2r, constituindo um
68 mecanismo endógeno de contra regulação (Simoies e Silva et al., 2013). Os
69 componentes do SRA são expressos em diferentes tecidos, compondo SRA locais,
70 que podem atuar de maneira coordenada ou independente ao SRA sistêmico (Giese
71 & Speth, 2014; Shimizu et al., 2008). Estudos já mostram a existência de um SRA
72 local nos tecidos osseos (Asaba et al., 2009; Izu et al., 2009; Yongtao et al., 2014;
73 Zhang et al., 2014), além de estudos *in vitro* que evidenciaram a expressão dos
74 receptores de Ang II em osteoblastos e osteoclastos (Asaba et al., 2009) (Izu et al.,
75 2009).

76 O telmisartan (TELM) é um potente antagonista do receptor At1r, e usado
77 clinicamente no tratamento da hipertensão, por apresentar vantagens em relação a
78 outras drogas da mesma classe, incluindo alto volume de distribuição, meia-vida longa
79 e, conseqüentemente, efeitos de maior duração, podendo ser administrado em doses
80 diárias únicas (Deppe et al., 2010; Frampton, 2011). Além disso, o TELM tem ação
81 como agonista parcial do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- γ
82 (PPAR- γ) (Fujimura et al., 2013; Kakuta et al., 2014). Os efeitos do TELM no
83 metabolismo ósseo já foram estudados, porém os resultados são controversos.

84 Aydogan et al. (2019) observaram que TELM não teve efeitos sobre os marcadores
85 de remodelação óssea em hipertensos recém-diagnosticados. Por outro lado, Ma et
86 al. (2010) demonstraram que o TELM reduziu a perda óssea induzida por rosiglitazona
87 em ratas espontaneamente hipertensas (*spontaneously hypertensive rats*, SHR) e
88 ovariectomizadas, enquanto, Birocale et al. (2016) observaram que o tratamento com
89 TELM levou a prejuízos ósseos em SHRs machos.

90 Nosso grupo mostrou em trabalhos anteriores que SHRs apresentam um
91 processo inflamatório periodontal exacerbado associado ao fenótipo hipertensivo
92 (Bonato et al., 2012). Além disso, a inibição do SRA pode prevenir a reabsorção
93 alveolar induzida pela DP (Dionisio et al., 2019; Oliveira et al., 2019). Desta forma,
94 nosso objetivo foi avaliar os efeitos do TELM na perda óssea alveolar de ratos
95 normotensos e hipertensos com DP, uma vez que os efeitos desta droga ainda não
96 são claramente compreendidos, além de investigar a participação do SRA local na
97 DP, no contexto da hipertensão.

98

99

100 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

101

102 **2.1. Animais e aspectos éticos**

103 Foram utilizados 66 ratos machos (*Rattus norvegicus*), de 10 semanas de
104 idade, da linhagem Wistar e SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), oriundos do
105 Biotério do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de
106 Araçatuba, Unesp. Os animais Wistar e SHR foram mantidos em salas, com umidade
107 e temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12 horas), 3-4 animais por
108 caixa forradas com maravalha, consumindo o mesmo tipo de ração (Labina, Nestlé,

109 Brasil) e água potável *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela
110 Comissão Local de Ética para Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FOA nº
111 00686-2016; certificado encontra-se no Anexo I).

112

113 **2.2. Tratamento com telmisartan**

114 Os animais foram tratados com telmisartan 10 mg/kg/dia (Micardis®;
115 Boehringer Ingelheim; São Paulo, SP, Brasil). Um comprimido foi dissolvido em PBS
116 a 10 mg de telmisartan/mL, e administrada por gavagem uma vez ao dia, por 15 dias,
117 começando 1 dia antes da indução da doença periodontal. Os animais foram pesados
118 a cada 5 dias para o ajuste do volume administrado. A dose de tratamento foi baseada
119 na literatura (Araujo et al., 2013; Wiene et al., 2001).

120

121 **2.3. Indução da doença periodontal**

122 Os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal de
123 hidrocloreto de quetamina 80 mg/Kg (Cetamim, Syntec; Hortolândia, SP, Brasil) e
124 hidrocloreto de xilazina 10 mg/Kg (Calmium, Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil)
125 e posicionados em decúbito ventral, em mesa odontológica adaptada para roedores,
126 com retratores apoiados nos dentes incisivos. Foi então realizada a inserção das
127 ligaduras bilaterais (fio de sutura de seda USP 4-0; Ø 0,15 mm) nos primeiros molares
128 inferiores, com amarração mesial. Após 15 dias, foi realizada a medida da pressão
129 arterial média, e os animais foram submetidos à eutanásia (Isoflurano; Cristália,
130 Itapina, SP, Brasil), para coleta de plasma e hemi-mandíbulas.

131

132

133 **2.4. Medida não invasiva da pressão arterial sistólica**

134 A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada por
135 pletismografia de cauda (sistema *NIBP* acoplado ao PowerLab System;
136 ADInstruments; Sydney, Austrália). Brevemente, os animais foram imobilizados em
137 um contensor cilíndrico e um manguito de pressão foi instalado no terço proximal da
138 cauda, e um transdutor de pulso foi posicionado sob a artéria caudal. O manguito foi
139 inflado até 240 mmHg e lentamente desinflado, resultando na interrupção e retorno do
140 sinal de pulso, respectivamente. A medida de PAS foi determinada pelo valor de
141 pressão do manguito quando observado o retorno do sinal de pulso. Foram realizadas
142 três medidas consecutivas e o valor médio foi considerado. Os animais foram
143 ambientados ao procedimento uma vez ao dia, por três dias, para reduzir alterações
144 dos resultados causadas por estresse.

145

146 **2.5. Dosagem plasmática de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase ácida resistente** 147 **ao tartarato (TRAP)**

148 O sangue total dos animais foi coletado em tubos com heparina e o plasma foi
149 separado por centrifugação (10 min × 1500 RCF), e a atividade das enzimas foi
150 determinada por ensaio colorimétrico (Fernandes et al., 2020). Brevemente, para o
151 ensaio de ALP, a reação compreendeu 2,5 mM de p-nitrofenil fosfato (pNPP), 2 mM
152 de MgCl₂ e 25 mM de tampão de glicina (pH 9,4) e a para o ensaio de TRAP, a reação
153 compreendeu 10 mM de pNPP, 50 mM de tartarato de sódio, 1 mM de p-hidroxi-
154 benzoato de mercúrio e 100 mM de tampão de acetato de sódio (pH 5,8). A atividade
155 enzimática foi calculada pela quantidade de substrato hidrolisado (pNPP) por minuto,
156 a 37 °C, e normalizada pela quantidade de proteína total, determinado pelo método
157 de Lowry (Lowry et al., 1951).

158

159 **2.6. Microtomografia computadorizada (microCT)**

160 As hemi-mandíbulas direitas coletadas e foram armazenadas em PBS a -20°C
161 até a realização do ensaio. Os escaneamentos foram realizados em tomógrafo
162 SkyScan 1272 (Bruker microCT; Kontich, Bélgica). Os espécimes foram posicionados
163 verticalmente e as radiografias adquiridas com os seguintes parâmetros: 70kVp;
164 142µA; filtro de alumínio 0.5 mm; voxel isotrópico 9 µm; tempo de exposição 1100 ms;
165 rotação de 0.5° (rotação total de 180°). As imagens foram reconstruídas com o
166 software NRecon (v1.6, Bruker), alinhadas com o software DataViewer (v1.5.1.2,
167 Bruker), e analisadas com o software CT Analyser (v1.13, Bruker).

168 Para análise do osso alveolar, uma região de interesse (ROI) foi padronizada a
169 partir de pontos anatômicos (limite superior: teto da furca; limite inferior: 100 fatias a
170 partir do teto (900 µm); limite distal: raiz proximal do 2º molar; limite proximal: raiz
171 proximal do 1º molar; e limites vestibular e lingual: limites do osso alveolar). Um
172 volume de interesse (VOI) foi delimitado automaticamente considerando as bordas do
173 osso alveolar na ROI, removendo o volume do dente (cora e raízes). Foram medidas
174 a porcentagem de osso (BV/TV), e número, espessura e separação de trabéculas
175 (Tb.N, Tb.Th, e Tb.Sp) (Bouxsein et al., 2010). Imagens tridimensionais
176 representativas de cada grupo foram construídas com o software CTvox (v3.0,
177 Bruker).

178

179 **2.7. Dosagem de mediadores inflamatórios**

180 As hemi-mandíbulas esquerdas foram cortadas na região dos molares, os
181 tecidos moles adjacentes foram removidos, e os espécimes foram maceradas em
182 nitrogênio líquido, e homogeneizadas com um tampão de lise (Tris 100 mM, NaCl 150

183 mM, Tween 20 1%, deoxicolato de sódio 0.5% e coquetel inibidor de proteases
184 cOmplete™/Sigma, pH 7.4), usando um homogeneizador de tecidos (Omni TH, Omni
185 International; Tulsa, Oklahoma, EUA). As amostras foram centrifugadas (16000 RCF,
186 20 minutos, 4 °C), e o sobrenadante coletado para o a quantificação dos mediadores
187 inflamatórios, para a quantificação de mediadores inflamatórios.

188 A técnica de ELISA realizada, utilizando os kits DuoSet (R&D systems,
189 Minneapolis, Minnesota, EUA) para fator de necrose tumoral- α (TNF- α ; DY510),
190 interleucina-6 (IL-6; DY501), interleucina-10 (IL-10; DY506), e quimiocinas C-X-C motif
191 chemokine ligand 3/Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 (CXCL3/CINC-2;
192 DY540) e CC chemokine ligand 20/Macrophage Inflammatory Protein-3 Alpha
193 (CCL20/MIP-3 α ; DY516), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração
194 dos alvos foi normalizadas pelo conteúdo de proteínas totais (Lowry et al., 1951).

195

196 **2.8. Análise de expressão gênica**

197 As hemi-mandíbulas foram cortadas na região dos molares, limpas dos tecidos
198 moles adjacentes, e o RNA total foi extraído com reagente Trizol LS (Invitrogen™),
199 com protocolo adaptado a partir do recomendado pelo fabricante. A quantificação do
200 RNA total foi realizada utilizando o *Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit*
201 (Invitrogen) em equipamento Nanodrop 4000 (Thermo Fisher Scientific), seguindo as
202 recomendações do fabricante. A pureza das amostras foi avaliada por
203 espectrofotometria, considerando as razões 260/280 (1.8-2.0) e 260/230 (2.0-2.2). As
204 amostras foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich), e o DNA complementar
205 (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 μ g de RNA total, utilizando o *High Capacity Kit*
206 *RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Themo Fisher Scientific), seguindo as
207 recomendações do fabricante.

208 As reações em cadeia de polimerase em tempo real (*qPCR*) foram realizadas
 209 com sistema TaqMan (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems)
 210 (Tabela 1-1), em equipamento *StepOne™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher
 211 Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A expressão dos alvos foi
 212 determinada pelo método de Ct comparativo, utilizando *Actb* como gene constitutivo
 213 e o grupo Wistar Controle como referência (Livak & Schmittgen, 2001).

214

215 **Tabela 1- 1. Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados**

| Componentes do sistema renina angiotensina | | |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|
| Agt | <i>Angiotensinogen</i> | Rn00593114_m1 |
| Ace | <i>Angiotensin I converting enzyme</i> | Rn00561094_m1 |
| Agt1r | <i>Angiotensin II receptor, type 1</i> | Rn02758772_s1 |
| Agt2r | <i>Angiotensin II receptor, type 2</i> | Rn00560677_s1 |
| Ace2 | <i>Angiotensin I converting enzyme 2</i> | Rn01416293_m1 |
| Masr | <i>MAS1 proto-oncogene, G protein-coupled receptor</i> | Rn00562673_s1 |
| Ren | <i>Renin</i> | Rn02586313_m1 |
| Fatores de transcrição | | |
| Runx2 | <i>Runt-related transcription factor 2</i> | Rn01512298_m1 |
| Osx/Sp7 | <i>Osterix/Sp7 transcription factor</i> | Rn02769744_s1 |
| Catnb | <i>β-catenin/cadherin associated protein beta 1</i> | Rn00584431_g1 |
| Marcadores de formação óssea | | |
| Alp | <i>Bone alkaline phosphatase</i> | Rn01516028_m1 |
| Col1a1 | <i>Collagen type I alpha 1</i> | Rn01463848_m1 |
| Opn/Spp1 | <i>Osteopontina / secreted phosphoprotein 1</i> | Rn00681031_m1 |
| Ocn/Bglap | <i>Osteocalcin / bone gamma-carboxyglutamate protein</i> | Rn00566386_g1 |
| Bsp/lbsp | <i>Bone sialoprotein / integrin-binding sialoprotein</i> | Rn00561414_m1 |
| Bmp2 | <i>Bone morphogenetic protein 2</i> | Rn00567818_m1 |
| Marcadores de reabsorção / Remodelamento ósseo | | |
| Opg | <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b</i> | Rn00563499_m1 |

Tabela 1-1 (continuação)**Marcadores de reabsorção / Remodelamento ósseo**

| | | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|
| Rankl | <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11</i> | Rn00589289_m1 |
| Rank | <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a</i> | Rn04340164_m1 |
| Trap/Acp5 | <i>Acid phosphatase 5, tartrate resistant</i> | Rn00569608_m1 |
| Mmp2 | <i>Matrix metalloproteinase 2</i> | Rn01538170_m1 |
| Mmp9 | <i>Matrix metalloproteinase 9</i> | Rn00579162_m1 |
| Ctsk | <i>Cathepsin K</i> | Rn00580723_m1 |
| Oscar | <i>Osteoclast associated immunoglobulin-like receptor</i> | Rn01530958_m1 |
| Vtn | <i>Vitronectin</i> | Rn01466920_g1 |
| Itgav | <i>Integrin, alpha V</i> | Rn01485633_m1 |
| Itgb5 | <i>Integrin, beta 5</i> | Rn01439348_m1 |
| Gene constitutivo (Housekeeping gene) | | |
| Actb | <i>Beta actin</i> | Rn00667869_m1 |

216

217

218 4.9. Imunohistoquímica em cortes parafinizados

219 As hemi-mandíbulas direitas foram fixadas em formaldeído 4% tamponado e
 220 descalcificadas em solução de EDTA 10% (Titriplex® III; Merck Millipore; Burlington,
 221 MA, USA). Posteriormente, as peças foram desidratadas em concentrações
 222 crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, e infiltrada e emblocadas em parafina
 223 histológica. As lâminas foram preparas com cortes de 3 µm das hemi-mandíbulas em
 224 plano sagital (3 cortes/lâmina).

225 Para as reações de imunohistoquímica (IHC), as lâminas foram
 226 desparafinizadas, reidratadas em concentrações decrescentes de etanol e finalizadas
 227 em PBS. Foi realizado o bloqueio da atividade de peroxidases endógenas (*Hydrogen*
 228 *Peroxide Block*, DHP-125; Spring Bioscience Corp.; Pleasanton, CA, USA), e a
 229 recuperação antigênica a quente (tampão citrato 10 mM, pH 6.0, 55°C por 20 min,

230 seguido 20 min a temperatura ambiente). As lâminas foram incubadas com os
 231 respectivos anticorpos primários (Tabela 1-2) por 16 horas a 4°C, seguido de
 232 incubação com o respectivo reagente de detecção (Tabela 1-2), incubação com
 233 substrato cromógeno (DAB Enhancer; Dako Corp., Carpinteria, CA, EUA) e contra
 234 coloração com hematoxilina de Harry (Sigma-Aldrich). As reações acompanharam um
 235 controle negativo (sem anticorpo primário).

236 As lâminas foram analisadas em microscópio (Olympus, BX53, Tóquio, Japão)
 237 na região do terço médio da furca do primeiro molar. A expressão dos alvos foi
 238 baseada no padrão de imunomarcação: negativo (-), marcação fraca (+); moderada
 239 (++) e forte (+++), e imagens representativas de cada grupo foram realizadas.

240

241 **Tabela 1- 2. Relação dos anticorpos e sistema de detecção utilizados para os**
 242 **ensaios de imunohistoquímica**

| Anticorpos primários | Origem | Referência | Marca |
|------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|
| Ant-AGT | Camundongo | sc-374511 | Santa Cruz Biotechnology. |
| Anti-AT1 (N-10) | Cabra | sc-1173-G | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-AT2 (K-15) | Cabra | sc-48452 | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-ACE (H-170) | Coelho | sc-20791 | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-ACE2 (H-175) | Coelho | sc-20998 | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-MAS1 (G-1) | Camundongo | sc-390453 | Santa Cruz Biotechnology |
| Sistema de detecção | Espécie de detecção | Referência | Marca |
| Histofine® Simple Stain™ Rat MAX PO (MULTI) | Camundongo e coelho | 414191F | Nichirei Biosciences |
| Histofine® Simple Stain™ Rat MAX PO (G) | Cabra | 414331F | Nichirei Biosciences |

243

244

245 **4.10. Análise estatística**

246 A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e foi realizada
247 análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*), seguido de teste *post hoc* de
248 *Sidak*, incluindo as comparações Controle vs. DP, DP vs. TELM+DP, e Wistar vs. SHR
249 nas mesmas condições experimentais. Os gráficos representam a média e o erro
250 padrão da média, e as diferenças estatística são indicados pelo valor de p, como
251 *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001), e ****(p<0.0001). As análises foram realizadas no
252 software estatístico Graph Pad Prism v7.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego,
253 Califórnia, USA).

254

255

256 **3. RESULTADOS**

257

258 **3.1. Telmisartan (TELM) reverte o fenótipo hipertensivo reduzindo a pressão** 259 **arterial**

260 Para confirmar o fenótipo hipertensivo, assim como o efeito hipotensor do
261 telmisartan, realizamos a medida de pressão arterial dos grupos experimentais, por
262 pletismografia de cauda (Figura 1A). O grupo SHR mostrou pressão arterial acima 150
263 mmHg, caracterizando o fenótipo hipertensivo, e a doença periodontal (DP) não
264 alterou este parâmetro. O tratamento com telmisartan, como esperado, reduziu
265 significativamente a pressão arterial, tanto nos animais hipertensos, como nos Wistar,
266 indicam a efetividade do tratamento.

267

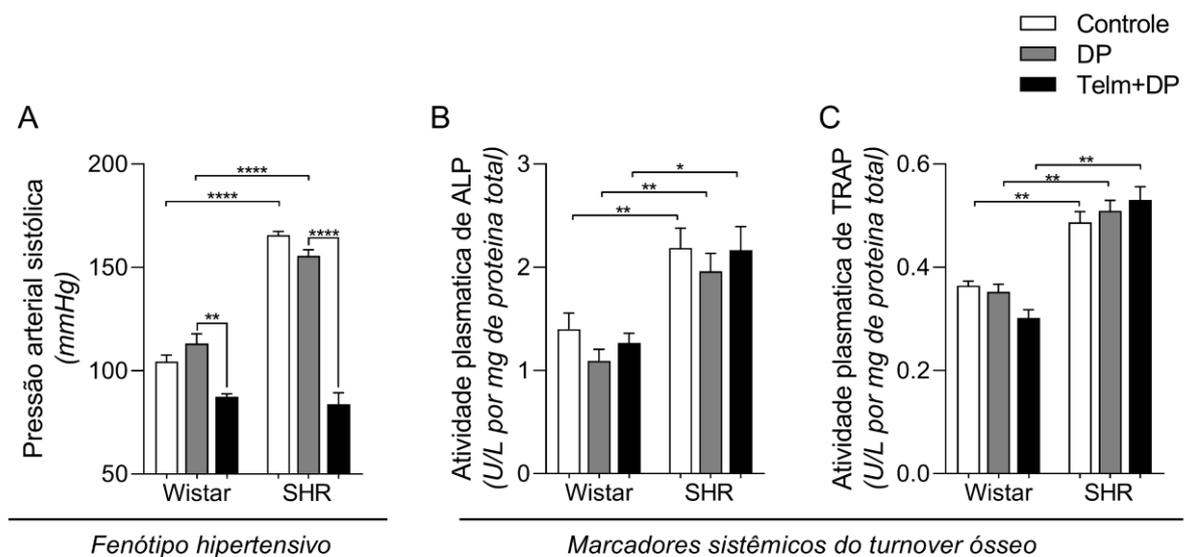
268

269 **3.2. SHR apresenta atividade aumentada de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase**
 270 **ácida resistente ao tartarato (TRAP) no plasma**

271 A fim de evidenciar um possível efeito sistêmico no metabolismo ósseo,
 272 avaliamos a atividade das enzimas FAL e TRAP no plasma, por método enzimático
 273 colorimétrico (Figura 1-1B e C). Os grupos SHR apresentaram maior atividade de ALP
 274 e da TRAP no plasma em comparação aos grupos Wistar, indicando um *turnover*
 275 aumentado nos animais hipertensos. Entretanto, a DP e o tratamento com TELM não
 276 alteraram esses marcadores.

277

278



279

280

281 **Figura 1- 1. Pressão arterial sistólica e marcadores sistêmicos de remodelação**
 282 **óssea de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan.** (A) Pressão
 283 arterial sistólica medida por pletismografia de cauda; (B) atividade plasmática de
 284 fosfatase alcalina, ALP, e (C) fosfatase ácida resistente ao tartarato, TRAP,
 285 determinadas por métodos enzimáticos colorimétricos. Gráficos representam a média
 286 \pm erro padrão da média (n=6) e as diferenças estatísticas são representadas com * p
 287 <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001.

288

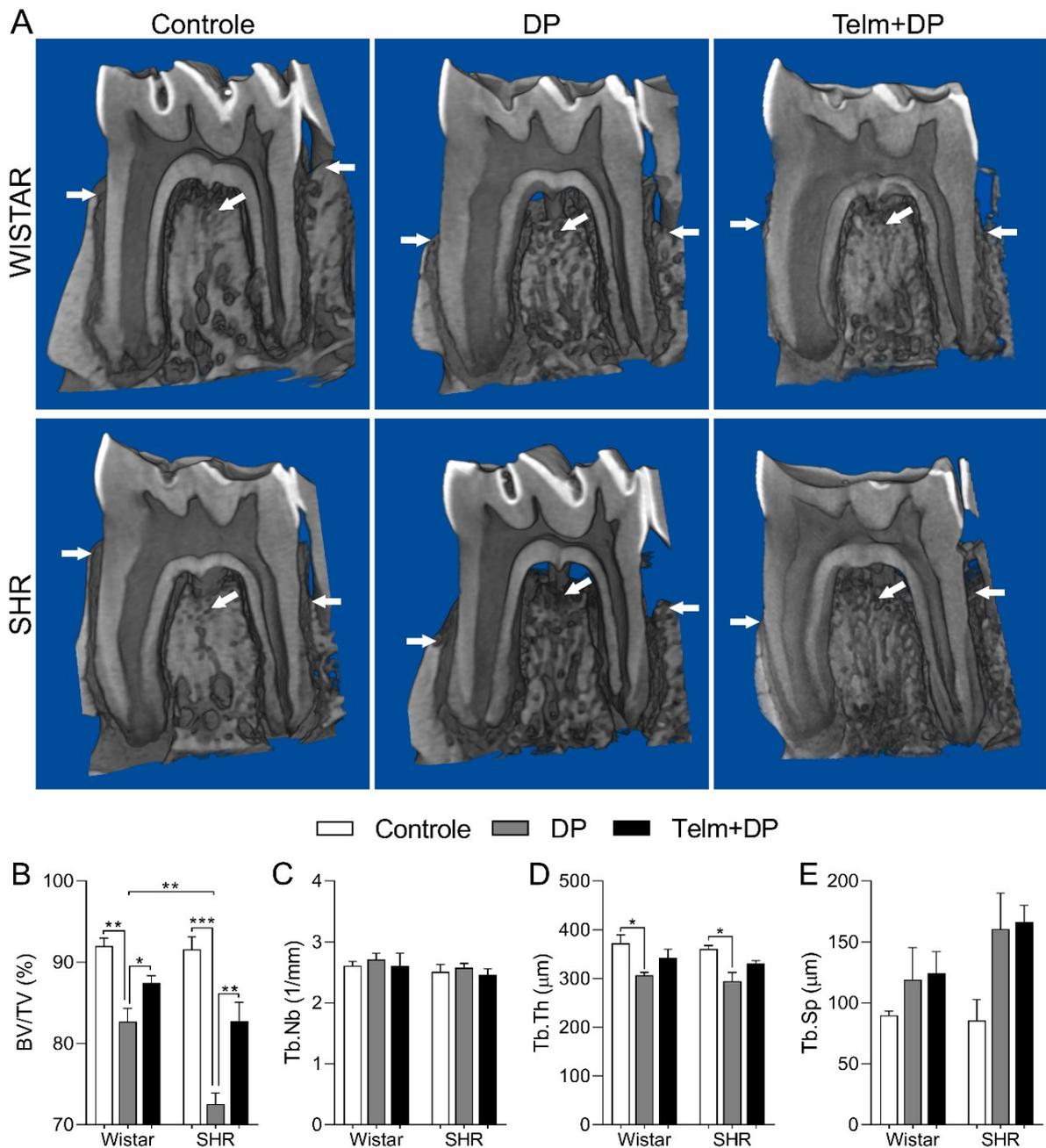
289

290 **3.3. TELM reduz a perda óssea alveolar induzida por DP**

291 Analisamos então os efeitos do TELM na perda óssea alveolar, por meio da
292 microCT. Os parâmetros de arquitetura óssea nos grupos Wistar Controle (WC) e SHR
293 Controle (SC) foram semelhantes (Figura 1-2A). Entretanto, os grupos Wistar com DP
294 (WPD) e SHR com DP (SPD) apresentaram uma perda óssea significativa, como
295 evidenciado pela redução do percentual ósseo (%BV/TV) (Figura 1-2B). Observamos
296 que a perda óssea foi mais severa no grupo SPD, acompanhado da redução da
297 espessura trabecular (Tb.Th) (Figura 1-2C), enquanto as alterações no número e
298 separação trabecular não foram significativas (Figura 1-2D e E). O TELM preveniu a
299 perda óssea no grupo Wistar com DP (WTelm+PD), sendo este efeito evidente nos
300 SHRs (STelm+PD) (Figura 1-2B), mas não alterou significativamente os parâmetros
301 da arquitetura trabecular.

302

303



304

305

306 **Figura 1- 2. Microtomografia de mandíbula (região do primeiro molar inferior) de**
 307 **ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan. (A) Reconstrução**
 308 **tridimensional, em vista lingual com corte na região da furca (setas apontam**
 309 **reabsorção óssea). Gráficos representam a média ± erro padrão da média (n=6) de**
 310 **(B) BV/TV, (C) Tb.Nb, (D) Tb.Th e (E) Tb.Sp. Diferenças estatísticas representadas**
 311 **com * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001.**

312

313

314 **3.4. TELM reduziu a expressão de Agt1r e aumentou a expressão de Agt2r no**
315 **osso alveolar**

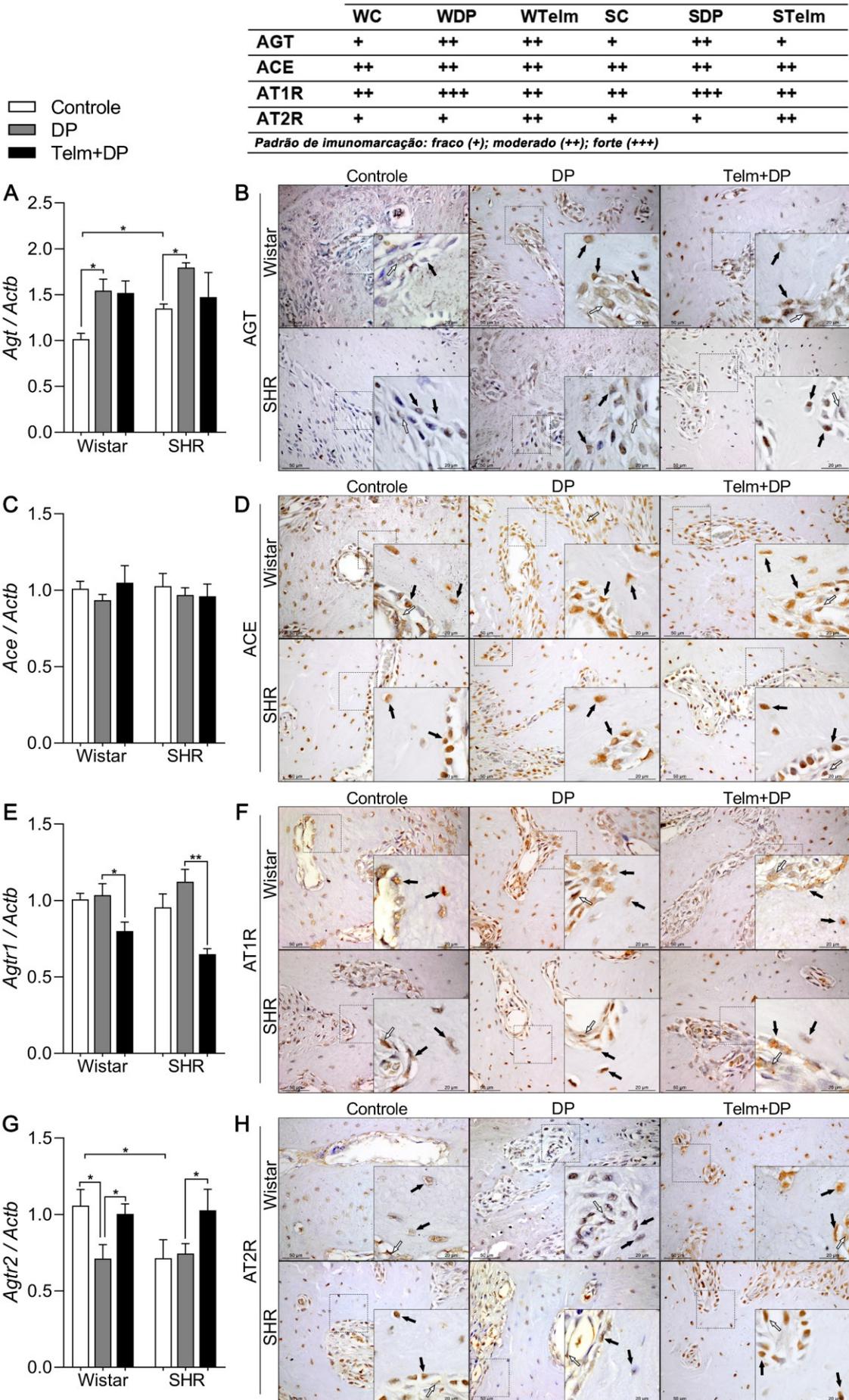
316 Para melhor compreensão a participação do sistema renina-angiotensina
317 (RAS) nos efeitos protetores do TELM, analisamos a expressão de seus
318 componentes. O grupo SC apresentou maior expressão constitutiva de Agt, e a DP
319 levou ao aumento dessa expressão, confirmado pela maior imunomarcação em
320 células ósseas e tecido conjuntivo adjacente ao osso (Figura 1-3A e B).

321 A expressão de Ace não foi alterada nas condições experimentais propostas
322 (Figura 1-3C e D). A expressão de Agt1r não foi alterada pela DP, mas o tratamento
323 com TELM reduziu significativamente sua expressão em Wistar e SHR, o que também
324 foi observado na imunomarcação (Figura 1-3E e F). A DP diminuiu a expressão de
325 Agt2r apenas em Wistar, mas o tratamento com TELM aumentou significativamente
326 sua expressão nos dois modelos (Figura 1-3G e H).

327 Em relação ao eixo Ace2/Masr, nos grupos com DP houve diminuição na
328 expressão de Ace2, em comparação aos respectivos controles, e o tratamento com
329 TELM levou a uma redução ainda maior na expressão deste alvo (Figura 1-4A e B). A
330 expressão de Masr aumentou nos grupos com DP, mas o TELM não alterou essa
331 resposta (Figura 1-4C e D).

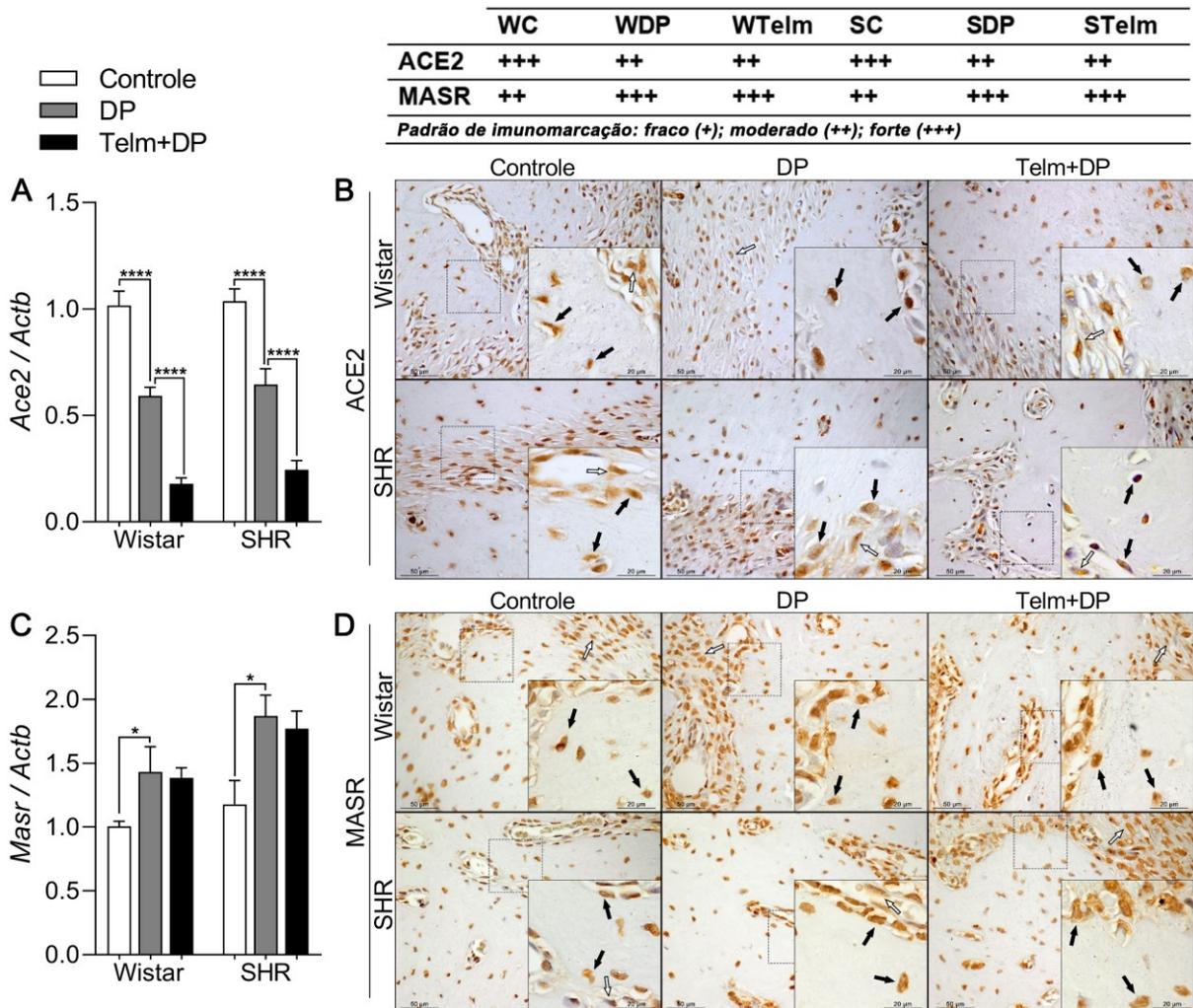
332

333



335 **Figura 1-3. Expressão dos componentes do SRA em mandíbulas de ratos Wistar**
 336 **e SHR com DP, tratados com telmisartan.** Respectivamente qRT-PCR e IHC para
 337 Agt (A e B), Ace (C e D), Agtr1 (E e F), e Agtr2 (G e H). Gráficos representam a média
 338 \pm erro padrão da média (n=6) e as diferenças estatísticas são representadas com * p
 339 <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001. Pranchas mostram imagens
 340 representativas de cada grupo, e a tabela superior mostra média do padrão de
 341 imunomarcação (n=5). Setas pretas indicam marcação positiva em células ósseas e
 342 setas brancas indicam marcação em tecido conjuntivo adjacente ao osso.

343
 344



345

346

347

348

349

350

351

352

353

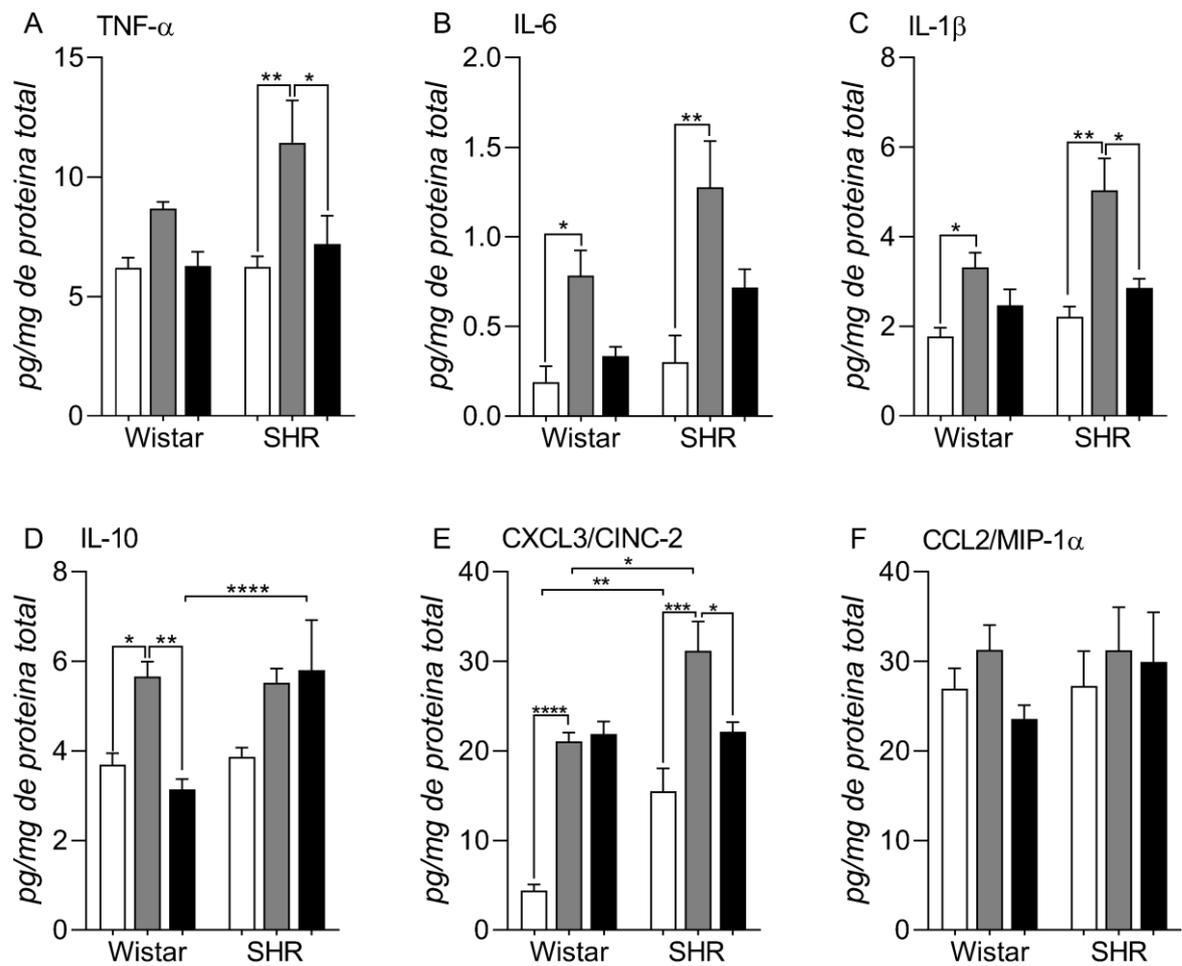
Figura 1-4. Expressão dos componentes do SRA em mandíbulas de ratos Wistar
e SHR com DP, tratados com telmisartan. Respectivamente qRT-PCR e IHC para
 Ace2 (A e B), e Masr (C e D). Gráficos representam a média \pm erro padrão da média
 (n = 5) e as diferenças estatísticas são representadas com * p <0,05, ** p <0,01, *** p
 <0,001 e **** p <0,0001. Pranchas mostram imagens representativas de cada grupo,
 e a tabela superior mostra média do padrão de imunomarcação (n=5). Setas pretas
 indicam marcação positiva em células ósseas e setas brancas indicam marcação em
 tecido conjuntivo adjacente ao osso.

354 **3.5. TELM reduziu a produção de mediadores inflamatórios na mandíbula de**
355 **ratos com DP**

356 Para avaliarmos o processo inflamatório, quantificamos a produção de
357 mediadores inflamatórios nas mandíbulas, por ELISA (Figura 1-5). A DP aumentou
358 significativamente a produção IL-6 e IL-1 β nos Wistar e SHR, enquanto a produção de
359 TNF- α foi aumentada apenas nos SHR com DP, e a produção de IL-10 apenas
360 aumentada nos Wistar com DP (Figura 1-5A e C). O tratamento com TELM reduziu a
361 produção de TNF- α e IL-1 β apenas no SHR, e de IL-10 apenas nos Wistar (Figura 1-
362 5D). Em relação às quimiocinas, a DP aumentou produção de CXCL3, um quimiotático
363 de neutrófilos, em Wistar e SHR, mas o tratamento com TELM apenas preveniu este
364 aumento nos SHR (Figura 1-5E). A produção de CCL2, um quimiotático de
365 macrófagos, não foi alterada pela DP ou tratamento com TELM (Figura 1-5F).

366

367



368

369

370

371

372

373

374

375

376

Figura 1- 5. Produção de mediadores inflamatórios em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan. ELISA para (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-1 β , (D) IL-10, (E) CXCL3/CINC-2 e (F) CCL20/MIP-1 α . Gráficos representam a média \pm erro padrão da média (n=6) e as diferenças estatísticas são representadas com * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001.

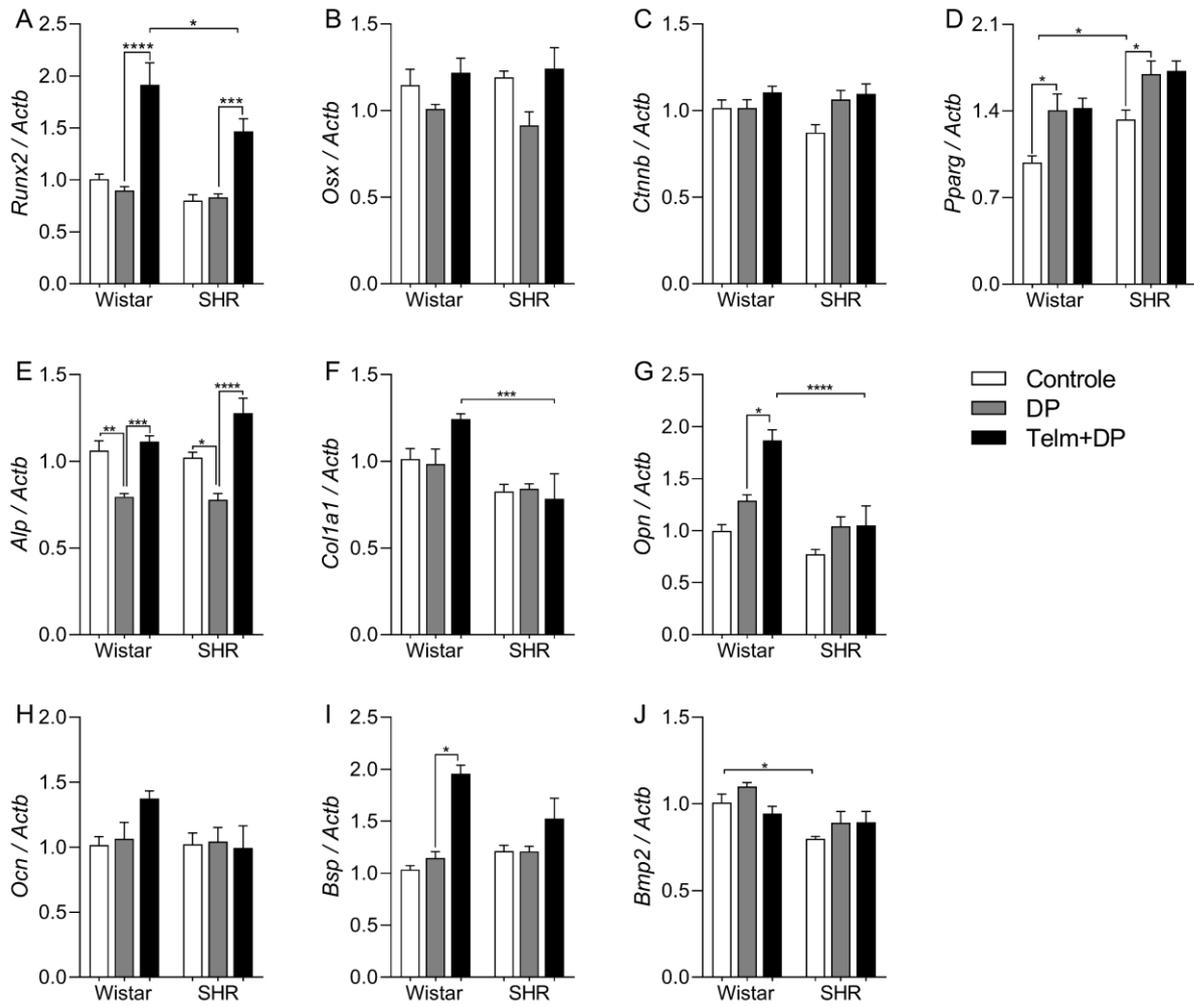
376

377 **3.6. TELM aumentou a expressão de Runx2 e Alp na mandíbula de SHRs com**
378 **DP**

379 Para melhor compreender o efeito do TELM nas alterações ósseas induzida
380 pela DP, avaliamos a expressão de diferentes marcadores ósseos (Figuras 1-6 e 1-
381 7). O grupo SC apresentou maior expressão constitutiva de Pparg, comparado a WC,
382 e a DP aumentou sua expressão em Wistar e SHR, enquanto Runx2, Osx e Ctnnb
383 não foram alterados pela DP. De maneira interessante, o tratamento com TELM
384 aumentou a expressão de Runx2 em Wistar e SHR (Figura 1-6A). Entre os
385 marcadores de formação óssea avaliados, apenas a expressão de Alp foi reduzida
386 nos grupos com DP, o que foi prevenido pelo tratamento com TELM (Figura 1-6E),
387 além aumentar a expressão de Opn e Bsp em Wistar (Figura 1-6G e I).

388

389



390
391
392
393
394
395
396
397

Figura 1-6. Expressão gênica de marcadores de formação óssea em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan. qRT-PCR for (A) Runx2, (B) Osterix, (C) Catnb, (D) Pparg, (E) Alp, (F) Col1a1, (G) Opn, (H) Ocn, (I) Bsp, e (J) Bmp2. Gráficos representam a média \pm erro padrão da média (n=6) e as diferenças estatísticas são representadas com * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001.

398

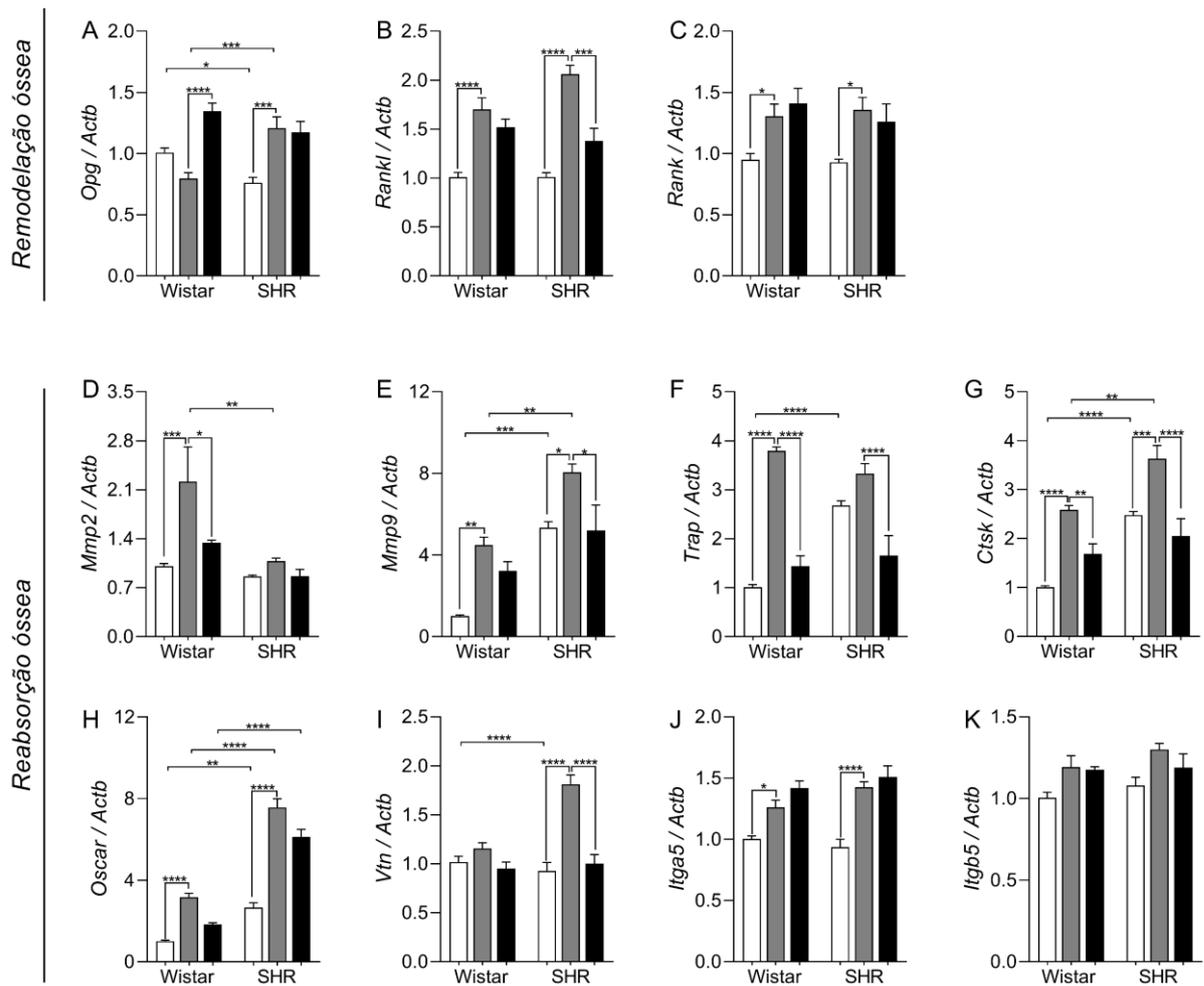
399 **3.7. O eixo Opg/Rankl/Rank foi modulado de maneira diferente pelo TELM em**
400 **Wistar e SHR**

401 Em seguida, analisamos a expressão do eixo Opg/Rankl/Rank como um
402 marcador da remodelação e dinâmica óssea (Figura 1-7A a C). Inicialmente,
403 observamos uma expressão constitutiva diminuída de Opg nos SHR Controle, em
404 comparação aos Wistar, enquanto a expressão de Rankl e Rank foi similar. A DP
405 aumentou a expressão de Rankl e Rank em Wistar e SHR, enquanto Opg foi
406 aumentada apenas no SHR (Figura 1-7A a C). O tratamento com TELM aumentou a
407 expressão de Opg apenas no grupo Wistar e inibiu a expressão de Rankl apenas no
408 grupo SHR (Figura 1-7A e B), enquanto a expressão de Rank não foi alterada (Figura
409 1-7C).

410

411 **3.8. TELM reduz a expressão de marcadores de reabsorção óssea na mandíbula**
412 **de ratos com DP**

413 Por fim, os marcadores de reabsorção óssea foram avaliados, e observamos
414 uma maior expressão constitutiva de Mmp9, Trap, Ctsk, receptor associado a
415 osteoclastos (Oscar) e Vtn nos SHR em relação ao Wistar (Figura 1-7E, F, G e I). A
416 DP aumentou a expressão de Mmp9, Trap, Ctsk, Oscar e Itga5 nos grupos Wistar e
417 SHR, sendo mais significativo no SHR, exceto pela expressão de Trap (Figura 1-7F).
418 A expressão de Mmp2 aumentou apenas no grupo Wistar com DP, enquanto a
419 expressão de Vtn aumentou apenas no grupo SHR com DP, em comparação com
420 seus controles (Figura 1-7D e I). O tratamento com TELM preveniu a expressão
421 aumentada desses marcadores, exceto para Mmp9, Oscar e Itga5 no grupo Wistar, e
422 Oscar e Itga5 no grupo SHR (Figura 1-7E, H e J).



423

424

425

Figura 1- 7. Expressão gênica de marcadores de remodelamento e reabsorção

óssea em mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, tratados com telmisartan.

qRT-PCR for (A) Opg, (B) Rankl, (C) Rank, (D) Mmp2, (E) Mmp9, (F) Trap, (G) Ctsk,

(H) Oscar, (I) Vtn, (J) Itga5, e (K) Itgb5. Gráficos representam a média \pm erro padrão

da média (n=6) e as diferenças estatísticas são representadas com * p <0,05, ** p

<0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001.

430

431

432

433 4. DISCUSSÃO

434 Os resultados do presente estudo demonstraram que o bloqueio do receptor
435 AT1R, pelo tratamento com TELM, teve um efeito protetor na inflamação induzida pela
436 DP e na perda óssea alveolar em animais hipertensos, reduzindo a produção de
437 citocinas e a expressão de marcadores de reabsorção em animais hipertensos. A ação
438 do sistema renina-angiotensina local nos tecidos periodontais já foi associada a danos
439 inflamatórios periodontais (Dionisio et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Santos et al.,
440 2009; Santos et al., 2015). A linhagem SHR é conhecida por apresentar alterações no
441 sistema renina-angiotensina sistêmico (Gouldsbrough et al., 2003; Ohta et al., 1996;
442 Schiffrin et al., 1984), bem como um comprometimento ósseo intrínseco associado ao
443 genótipo e fenótipo hipertensivo (Landim de Barros et al., 2016; Manrique et al., 2012;
444 Tiyasatkulkovit et al., 2019). Entretanto, alterações locais do sistema renina-
445 angiotensina no osso alveolar e sua associação com a maior suscetibilidade a danos
446 ósseos induzidos pela inflamação ainda não foram demonstradas na literatura.

447 Após confirmar o fenótipo hipertensivo dos SHR pelo aumento da pressão
448 arterial sistólica (Potje et al., 2014), observamos que TELM foi capaz de reduzir
449 significativamente a PAS em ratos Wistar e SHR, verificando a eficácia do tratamento.
450 De acordo com as informações do fabricante, essa dose equivale a aproximadamente
451 1,25 vezes a dose máxima recomendada para humanos (80 mg/dia), com base na
452 relação mg/m² (Boehringer-Ingelheim, 2009). Outros estudos também mostram que
453 essa dose tem ação anti-hipertensiva e anti-inflamatória em roedores, corroborando
454 nossos dados (Araujo et al., 2013; Wienen et al., 2001).

455 Para determinar possíveis alterações ósseas sistêmicas causadas pela DP ou
456 tratamento com TELM, foram avaliadas as atividades plasmáticas de ALP e TRAP
457 (Bauer et al., 2004; Halleen et al., 2006; Naylor & Eastell, 2012). Esses marcadores

458 não foram alterados nas condições experimentais propostas, mas os SHRs
459 apresentaram aumento da atividade sistêmica de ALP e TRAP, sugerindo aumento
460 do turnover ósseo, o que já foi sugerido por outros estudos (Tiyasatkulkovit et al.,
461 2019). Além disso, há evidência de prejuízos na produção de matriz orgânica por
462 precursores de osteoblastos no SHR (Chaves Neto et al., 2018; Landim de Barros et
463 al., 2016), explicando em parte, a maior suscetibilidade dos SHR à perda óssea
464 induzida por inflamação.

465 Em seguida, avaliamos a expressão dos componentes do SRA na mandíbula
466 de animais hipertensos com DP, a fim de entender melhor o papel desse sistema na
467 resposta óssea local. Observamos que o Agt é constitutivamente mais expresso em
468 SHRs, e sua expressão aumentou após a DP. Agt é o precursor de todos os peptídeos
469 de angiotensina, e podemos sugerir que os níveis desses peptídeos ativos estariam
470 aumentados nos tecidos ósseos inflamados, principalmente em animais hipertensos.
471 O Agt é convertido inicialmente em Ang I pela renina (Lu et al., 2016), no entanto, a
472 expressão da renina não foi detectada em nosso estudo, sugerindo que a conversão
473 de Ang I é mediada pela renina circulante, como observado anteriormente (Oliveira et
474 al., 2019). A expressão de Ace não foi alterada pela DP. Inúmeros estudos sugeriram
475 o papel dessa enzima na fisiologia óssea, demonstrando maior densidade mineral
476 óssea e menor risco de fraturas após o tratamento com inibidores da Ace (de Vries et
477 al., 2007; Garcia-Testal et al., 2006; Kwok et al., 2012; Perez-Castrillon et al., 2003).
478 Embora expressa na mandíbula de Wistar e SHRs, não observamos uma associação
479 com o aumento da perda óssea alveolar em animais hipertensos a modulação de Ace.

480 Como esperado, TELM reduziu significativamente a expressão de At1r, porém,
481 não houve diferença nas respostas entre Wistar e SHR, sugerindo não estar
482 relacionada as diferenças entre Wistar e SHRs. Yu et al. (2019) demonstraram efeito

483 anti-inflamatório *in vitro* do candesartan em células epiteliais renais humanas (HEK),
484 possivelmente associado à redução do estresse oxidativo, independentemente de
485 At1r. Os resultados do presente estudo também sugerem que outros mecanismos
486 podem estar envolvidos no efeito protetor do TELM, como a produção de citocinas.

487 A expressão de At2r já foi associada a efeitos anti-inflamatórios e reparo
488 tecidual em diferentes modelos (Namsolleck et al., 2014; Terenzi et al., 2017). Em
489 nossos resultados, a expressão de At2r foi reduzida após a indução de DP no grupo
490 Wistar, e o TELM aumentou sua expressão nos dois modelos, o que poderia ser
491 explicado pela maior ativação deste receptor devido ao bloqueio do receptor Agt1r.
492 Estudos já demonstraram que a ativação de At2r antagoniza os efeitos deletérios da
493 ativação do At1r (Kumar et al., 2002; Yang et al., 2012), e promove respostas anti-
494 inflamatórias, antifibróticas e antioxidantes (Lu et al., 2015; Okada et al., 2006; Wang
495 et al., 2017).

496 Embora a expressão de Ace não ter sido alterada, a de Ace2 diminuiu após a
497 indução de DP. Esta enzima é responsável por converter Ang II em Ang 1-7, que se
498 liga ao receptor MasR. A via Ace2/Ang (1-7) /MasR antagoniza os efeitos pró-
499 inflamatórios e fibrogênicos da via Ace/Ang II/AT1R, sendo considerada um novo alvo
500 terapêutico para a hipertensão (F. Jiang et al., 2014). Yang et al. (2013) demonstraram
501 uma expressão aumentada de Ace em SHRs, enquanto Ace2 é reduzida no tecido
502 cardíaco, sugerindo que expressão de Ace2 é tecido específico. O mecanismo de
503 ação de Ace2 no osso mandibular pode ser diferente do tecido cardíaco,
504 possivelmente devido às diferenças nas citocinas liberadas no microambiente. A DP
505 reduziu a expressão de Ace2, mas aumentou a expressão de MasR, o que sugere um
506 mecanismo compensatório, como uma tentativa de proteger ou induzir o reparo frente
507 ao estímulo inflamatório. Entretanto, são necessários mais estudos para melhor

508 compreender este mecanismo. Trabalhos já demonstraram que TELM aumenta a
509 expressão do eixo Ace2/MasR na miocardite, vasculatura renal e fibrose hepática
510 (Soler et al., 2009; Sukumaran et al., 2012; Yi et al., 2012), mas não observamos esta
511 resposta no osso alveolar.

512 O processo inflamatório induzido pela DP foi mediado pela liberação de
513 citocinas e quimiocinas no osso mandibular, com aumento de IL-6, IL-1 β e CXCL3, e
514 é importante observar que o aumento na concentração desses mediadores foi mais
515 significativo em animais hipertensos (Bonato et al., 2012). As citocinas TNF- α , IL-1 β e
516 IL-6 são extremamente importantes, pois podem estimular os osteoblastos,
517 aumentando a expressão de Rankl (Souza & Lerner, 2013). Esse mecanismo pode
518 contribuir para a fragilidade na mandíbula dos SHR, uma vez que uma grande
519 quantidade dessas citocinas foi liberada, acompanhado do aumento da expressão
520 de Rankl e ativação de osteoclastos, o que foi prevenido pelo TELM.

521 Para uma melhor compreensão do efeito de TELM na reabsorção óssea,
522 avaliamos o perfil de expressão gênica dos marcadores de formação óssea na
523 mandíbula. A DP não alterou a expressão dos fatores de transcrição Runx2, Osx e
524 Ctnnb, mas o TELM aumentou significativamente a expressão de Runx2. Em células
525 de osteossarcoma (ROS17/2.8), Nakai et al. (2015) demonstraram que a Ang II inibe
526 a diferenciação e mineralização *in vitro* e reduz a expressão de Runx2 via AGTR1.
527 Sugerimos que o efeito do TELM pode ser parcialmente explicado por seus efeitos
528 antagonistas sobre a Ang II via AGTR1 em osteoblastos.

529 O Pparg é um importante fator de transcrição que regula o metabolismo ósseo,
530 e os SHRs apresentaram uma expressão constitutivamente maior, o que também foi
531 mostrado na diferenciação osteogênica *in vitro* de células mesenquimais da medula
532 óssea de SHRs jovens (Chaves Neto et al., 2018). Isso sugere uma alteração

533 intrínseca associada ao genótipo hipertensivo, o que ajuda a explicar a maior
534 fragilidade óssea nos SHRs, uma vez que um aumento sustentado na atividade de
535 *Pparg* pode levar a prejuízos ósseos (Wan, 2010). Além do efeito direto de *Pparg* no
536 metabolismo ósseo, ele atua como uma via anti-inflamatória, inibindo o NFkB e a
537 produção de citocinas (Korbecki et al., 2019). Não há estudos que mostram a
538 expressão de *Pparg* em tecido periodontal inflamado, mas sugerimos que o aumento
539 de *Pparg* com a DP pode representar um mecanismo compensatório de proteção.
540 TELM não alterou a expressão de *Pparg*, apesar de ter atividade agonista parcial de
541 *Pparg* (Goyal et al., 2011), o que poderia ser explicado pela expressão já aumentada
542 na DP.

543 A análise dos marcadores de formação óssea revelou que a DP apenas reduziu
544 a *Alp*, uma das principais enzimas envolvidas na mineralização da matriz extracelular
545 (Orimo, 2010). A redução da *Alp* provavelmente refletiu os danos ósseos induzidos
546 pela DP e aumento da produção de mediadores inflamatórios (Graves et al., 2011). O
547 TELM aumentou a expressão de *Alp*, *Opn* e *Bsp* nos Wistar, mas apenas aumentou a
548 expressão de *Alp* nos SHR. Sugerimos que esta resposta possa estar relacionada ao
549 aumento da expressão de *Runx2*, como discutido anteriormente, que pode modular a
550 expressão de genes como *Alp*, *Opn* e *Bsp* (Jonason et al., 2009). O *Col1a1* e *Opn* não
551 foram alterados pela DP, mas é possível que os processos relacionados a degradação
552 e tentativa de reparo da matriz ocorreram em períodos mais iniciais e, portanto, não
553 tenham sido visualizados em nossos dados (Almeida et al., 2015). Entretanto, o TELM
554 aumentou a expressão de *Col1a1* e *Opn* em Wistar, sugerindo um estímulo na síntese
555 da matriz, favorecendo o recrutamento e adesão de diferentes células, como
556 osteoblastos.

557 A via Opg/Rankl/Rank é um dos principais reguladores da atividade dos
558 osteoclastos, e observamos que a DP reduziu a expressão de Opg e aumentou a
559 expressão de Rankl e Rank, sendo o efeito mais pronunciado nos SHRs, com
560 consequente maior reabsorção óssea nesses animais. O TELM alterou a expressão
561 dos componentes desta via de maneira diferencial, em Wistar houve o aumento de
562 Opg, que tem efeito osteoprotetor, mas em SHR reduziu a expressão de Rankl, que
563 estimula os osteoclastos. Ainda assim, esses resultados reforçam o efeito protetor do
564 TELM na DP.

565 A análise dos marcadores de reabsorção revelou que a expressão de Trap,
566 uma enzima responsável pela degradação da matriz mineralizada e importante
567 marcador da atividade dos osteoclastos (Boyle et al., 2003), e Oscar, um receptor do
568 tipo IgG com funções coestimuladoras na diferenciação dos osteoclastos (Nemeth et
569 al., 2011), aumentou nos grupos com DP. Esses resultados sugerem que os
570 mediadores inflamatórios podem induzir a diferenciação e ativação dos osteoclastos,
571 que foi mais pronunciada nos animais hipertensos. O TELM reduziu a expressão de
572 Trap, no entanto, a expressão de Oscar permaneceu inalterada. Podemos sugerir que
573 o TELM tem maior ação na manutenção da função dos osteoclastos, mas não no
574 estímulo da diferenciação (Kim et al., 2002).

575 Estudos anteriores demonstraram que a inibição de proteases da matriz reduz
576 o processo inflamatório e a destruição do osso alveolar (Chen et al., 2016). A DP
577 aumentou a expressão de Mmp9 e Ctsk em Wistar e SHR, porém a expressão de
578 Mmp2 permaneceu inalterada nos SHR, possivelmente devido a diferença constitutiva
579 na expressão de Mmp2 nos animais hipertensos. A inibição do AT1R reduziu a
580 expressão dessas proteases nos Wistar, entretanto, a expressão de Mmp2
581 permaneceu inalterada nos SHR. Estudos prévios in vitro e in vivo demonstraram que

582 a Ang II pode estimular a expressão de MMPs via AT1R (Nakai et al., 2015). Além
583 disso, outros autores demonstraram que essa regulação é tecido específica (Araujo et
584 al., 2013; Okada et al., 2009; Okada et al., 2010).

585 Vitronectina (Vtn) é uma integrina que medeia a adesão celular à matriz
586 extracelular, migração celular e interações célula-célula (Barczyk et al., 2010), e sua
587 expressão aumentou após a indução de DP em animais hipertensos, o que foi
588 reduzido pelo TELM. Lakkakorpi et al. (1991) demonstraram que Vtn tem importante
589 papel na regulação dos osteoclastos, e Steffensen et al. (1992) caracterizaram a
590 distribuição de Vtn no periodonto. Nossos resultados sugerem que Vtn é modulada
591 via AT1R, e é um dos fatores responsáveis pela diferença na resposta entre Wistar e
592 SHR. A Vtn pode ser ligar a quatro receptores conhecidos, as integrinas $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$,
593 $\alpha\beta5$ e $\alpha11\beta3$ (Felding-Habermann & Cheresch, 1993). A DP aumentou a expressão
594 de Itga5, o que foi mais pronunciado nos SHR, mas o tratamento com TELM não
595 modulou essa resposta. Embora alguns estudos tenham demonstrado o papel de
596 moléculas de adesão nos tecidos periodontais (Barczyk et al., 2010; Ghannad et al.,
597 2008), há poucas informações sobre a função dessas proteínas na perda óssea
598 alveolar durante a DP, apesar das evidências do envolvimento de integrinas na
599 fisiologia óssea (El Azreq et al., 2015; Slany et al., 2014). Entretanto, esses resultados
600 sugerem o envolvimento da Itga5 na perda óssea alveolar em animais hipertensos
601 com DP.

602

603

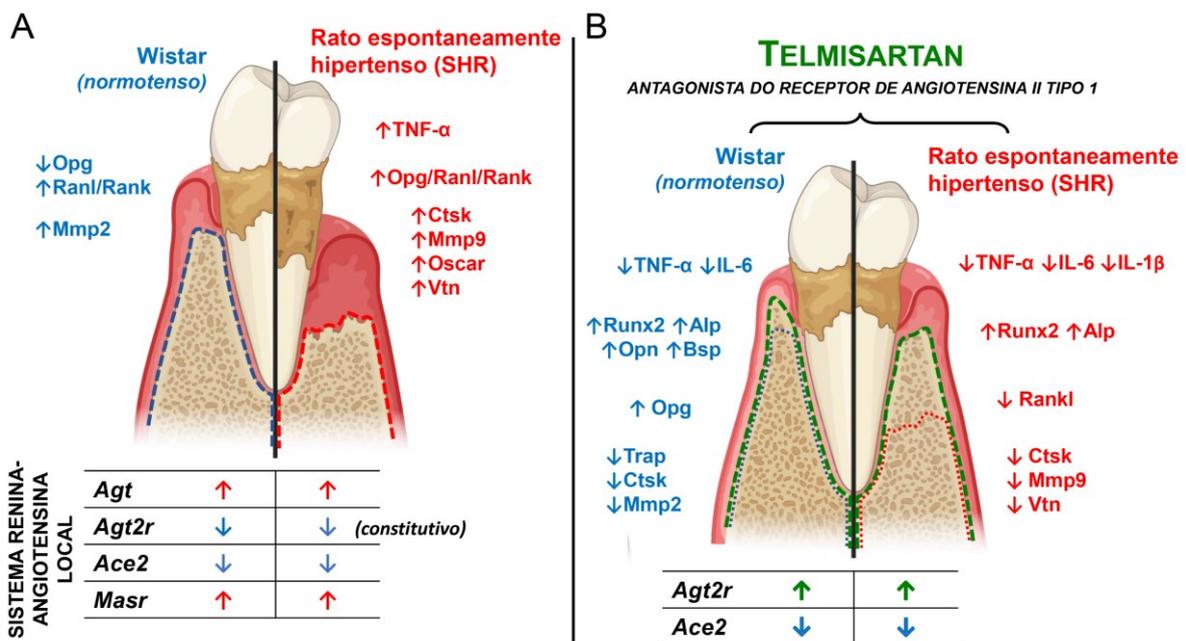
604 **5. CONCLUSÃO**

605 Em conjunto, nossos resultados sugerem que o antagonista de receptor AT1,
606 TELM, teve um efeito protetor na perda óssea alveolar induzida pela DP. Esse efeito

607 pode ser associado principalmente a redução da expressão de marcadores de
 608 reabsorção e menor produção de citocinas, possivelmente devido ao favorecimento
 609 da ativação do receptor AT2 (esquemático na Figura 1-8). Além disso, apesar de
 610 evidenciarmos que sistema renina-angiotensina local tem importante papel na perda
 611 óssea alveolar, a modulação deste sistema foi semelhante em Wistar e SHR, o que
 612 sugere não ser este o principal responsável pelas diferenças ósseas associadas ao
 613 fenótipo hipertensivo.

614

615



616

617

618 **Figura 1- 8. Principais resultados.** (A) Principais diferenças entre Wistar e SHR com
 619 DP. As linhas pontilhadas azuis e vermelhas ilustram a perda óssea alveolar em Wistar
 620 e SHR. Os alvos diferencialmente expressos entre os modelos estão listados ao lado,
 621 e os componentes do sistema renina-angiotensina local alterados pela DP estão
 622 listados abaixo. (B) Principais efeitos do telmisartan em Wistar e SHR com DP. A linha
 623 pontilhada verde ilustra o efeito protetor do TELM na perda óssea alveolar induzida
 624 pela DP em Wistar e SHR. Os mecanismos relacionados estão listados ao lado, e os
 625 componentes do sistema renina-angiotensina local alterados pelo tratamento estão
 626 listados abaixo.

627

- CAPÍTULO 2 -

1 PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS NA MANDÍBULA DE RATOS 2 ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COM DOENÇA PERIODONTAL

3
4 Neste **Capítulo 2** é apresentado o estudo sobre o perfil de expressão de
5 miRNAs induzido pela doença periodontal em ratos hipertensos (dados não
6 publicados).

9 RESUMO

10 No presente estudo, nosso objetivo foi investigar o perfil de expressão de
11 miRNA associado à perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal (DP) em
12 ratos espontaneamente hipertensos, que apresentam resposta inflamatória
13 aumentada e comprometimento ósseo intrínseco associado ao fenótipo hipertensivo.
14 A regulação de miRNAs tem sido estudada no contexto da DP, porém a maioria dos
15 estudos se concentra nos tecidos moles do periodonto, como gengiva e tecido
16 periodontal, enquanto a regulação de miRNAs no tecido ósseo alveolar ainda é pouco
17 estudada. Para isso, DP foi induzida em ratos Wistar e SHR com 10 semanas de idade
18 por ligadura bilateral nos primeiros molares inferiores, por 15 dias. O fenótipo
19 hipertensivo foi confirmado por pletismografia de cauda, e a perda óssea alveolar foi
20 avaliada por radiografia. O RNA total de amostras de mandíbula (corpo mandibular,
21 limpo de tecidos moles adjacentes) foi usado para um microarranjo de miRNA e
22 análise de expressão diferencial. Ferramentas *in silico* foram usadas para prever o
23 alvo de miRNA significativamente modulado, e a análise de enriquecimento foi
24 realizada nas listas de genes previstos. Nossos resultados demonstraram um perfil
25 distinto de miRNA associadas a DP no modelo SHR, possivelmente associados a
26 maior perda óssea alveolar. Além disso, destacamos miRNA anteriormente não
27 relacionados a homeostase ou desordens periodontais, como o miR-96-5p e o miR-
28 296, que podem ser de interesse para futuras pesquisas.

29

30

31 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

32 A doença periodontal (DP) é um distúrbio inflamatório que afeta principalmente
33 os tecidos de suporte dos dentes (Kinane et al., 2017). Apesar prevenível, a DP é
34 altamente prevalente e comumente associada à higiene oral inadequados, tendo um
35 impacto direto na qualidade de vida dos indivíduos (Chen et al., 2021b). A reabsorção
36 óssea alveolar induzida pela inflamação é predominantemente irreversível e,
37 eventualmente, leva à perda dos dentes, o que requer reabilitação especializada e
38 intensiva em recursos, como enxertos de tecido e próteses dentárias, representando,
39 assim, um problema de saúde pública. Comorbidades, como hipertensão, tem alta
40 chance de coexistir e podem afetar significativamente a severidade da DP, como já
41 demonstrado em modelos humanos e animais, como o rato espontaneamente
42 hipertensivo (SHR), que mimetiza a hipertensão essencial humana (Bonato et al.,
43 2012; Tada et al., 2022).

44 O fator microbiológico é decisivo para o estabelecimento da DP, mas sua
45 progressão é principalmente influenciada pela resposta do hospedeiro, incluindo
46 fatores como a intensidade da carga inflamatória e comprometimentos intrínsecos do
47 metabolismo ósseo, que por sua vez são finamente reguladas pela expressão gênica,
48 o que está diretamente relacionada a variabilidade de resposta entre indivíduos.

49 Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não codantes, de 17 a 25 nucleotídeos,
50 que regulam a expressão gênica a nível pós-transcricional. Os miRNAs são transcritos
51 do DNA genômico como transcritos primários de miRNA (pri-miRNA) e, em seguida,
52 processados no núcleo em miRNA precursores (pre-miRNAs), que são transportados
53 para o citoplasma onde são processados nos miRNAs maduros de fita dupla. Uma
54 das fitas (5p ou 3p), associada ao complexo de silenciamento induzido por RNA
55 (RISC), interage por complementaridade de sua sequência seed (7-8 nucleotídeos),

56 com a região 3'UTR de um mRNA alvo, levando à degradação do mRNA ou inibição
57 da tradução proteica (Bartel, 2004).

58 Devido ao seu tamanho e mecanismo de ação, os miRNAs podem modular
59 vários mRNAs e induzir seus efeitos pela modulação de diferentes vias e processos
60 celulares. Como importantes reguladores da função celular, alterações no seu perfil
61 de expressão já foram associadas a homeostase e desordens inflamatórias e ósseas
62 (Hensley & McAlinden, 2021), incluindo a DP (Yuan et al., 2021), e desta forma, são
63 considerados ferramentas terapêuticas e diagnósticas atrativas (Jin et al., 2020;
64 Kagiya, 2016; Krongbamee et al., 2021).

65 A maioria dos estudos até o momento dedicaram-se ao estudo dos tecidos
66 moles associados ao periodonto, como a gengiva, ligamento periodontal e fluido
67 crevicular ou saliva, mas poucas evidências mostram alterações na expressão de
68 miRNAs no osso alveolar. Desta forma, nosso objetivo foi investigar o perfil de
69 expressão de miRNAs associados à DP na mandíbula de ratos hipertensos (SHR),
70 em comparação a ratos normotensos (Wistar), por meio de ensaio de microarranjo de
71 miRNAs e ferramentas de análise bioinformática, para evidenciar possíveis
72 mecanismos que contribuam para a perda óssea alveolar no contexto da hipertensão,
73 nesse modelo.

74

75

76 2. MATERIAL E MÉTODOS

77

78 2.1. Animais e grupos experimentais

79 Os procedimentos experimentais estavam de acordo com o Controle de
80 Experimentos com Animais do Conselho Nacional do Brasil e foram aprovados pelo
81 Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba
82 (Unesp) (Processo FOA-00383-2020; Anexo 2). Foram utilizados ratos machos Wistar
83 (n=6) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (n=6), com 10 semanas de idade,
84 obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp). Os
85 animais foram mantidos em condições ambientais controladas (ciclo de claro/escuro
86 de 12 horas, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\% \pm 5\%$), com acesso livre
87 a uma dieta padrão (ração comercial em pellet) e água potável. Os animais foram
88 divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: Wistar Controle (WC),
89 SHR Controle (SC), Wistar com doença periodontal (WPD) e SHR com doença
90 periodontal (SPD).

91

92 2.1. Indução da doença periodontal

93 A doença periodontal (DP) foi induzida por ligadura bilateral ao redor dos
94 primeiros molares inferiores (Brito et al., 2020). Para isso, os animais foram
95 anestesiados com administração intraperitoneal da mistura de cloridrato de cetamina
96 (80 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), e posicionados em decúbito ventral em
97 mesa odontológica adaptada para roedores, com retratores apoiados nos dentes
98 incisivos. Um fio de seda 4-0 (Shalon; Goiânia, GO, Brasil) foi inserido ao redor dos
99 primeiros molares inferiores e amarrado na região mesial e mantido por 15 dias.

100

101 **2.3. Medida não invasiva da pressão arterial**

102 A pressão arterial sistólica dos animais foi medida após 15 dias de indução de
103 DP, antes da coleta das amostras, utilizando a técnica de pletismografia de cauda.
104 Animais com valores de pressão arterial sistólica acima de 150 mmHg foram
105 classificados como hipertensos, de acordo com critérios previamente estabelecidos
106 (Potje et al., 2014). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5),
107 e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism
108 (versão 8.0). A distribuição normalidade foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk,
109 seguido de uma análise de variância de um fator (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey
110 para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$).

111

112 **2.4. Coleta das amostras e avaliação da perda óssea alveolar**

113 Após 15 dias de indução da DP, os animais foram sacrificados por overdose
114 anestésica. As mandíbulas esquerdas foram coletadas cirurgicamente e limpas dos
115 tecidos adjacentes. Uma imagem radiográfica foi realizada para confirmar a indução
116 da DP, e a perda óssea alveolar foi avaliada medindo a área entre a junção cimento-
117 esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA), na região dos molares. Os dados são
118 apresentados como média \pm desvio padrão (n=5), e as análises estatísticas foram
119 realizadas como descrito no item 2.3.

120

121 **2.5. Extração do RNA total**

122 Para extração do RNA total foram utilizadas três amostras de mandíbula. O
123 dente incisivo e ramo mandibular foram removidos, e a medula óssea foi lavada. Os
124 espécimes foram pulverizados em nitrogênio líquido usando um almofariz e um pistilo
125 e a extração do RNA total, preservando os miRNAs, foi realizada com o mirVana™

126 miRNA isolation kit (Ambion #AM1560; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA),
127 seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por
128 espectrofotometria (NanoDrop™ 2000/2000c; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
129 EUA), e a pureza do RNA foi avaliada com base nas razões 260/280 e 260/230.

130

131 **2.6. Microarranjo de microRNA**

132 Para as análises de microarranjo foram utilizados 250 ng de RNA de cada
133 amostra, para o kit miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) (n=3).
134 De maneira resumida, as amostras de RNA foram submetidas à poliadenilação e
135 marcação com biotina usando o RNA FlashTag™ Biotin HSR kit (Affymetrix). Em
136 seguida, foi realizada a hibridização das amostras por 20 horas a 48 °C, seguida de
137 lavagens e coloração usando os kits de hibridização, lavagem e coloração
138 GeneAtlas™ (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), seguindo as
139 instruções do fabricante. Por fim, os micros arranjos foram escaneadas no
140 equipamento Gene Atlas Imaging Station (Affymetrix).

141

142 **2.7. Análise de dados de microarranjo**

143 Na análise do microarranjo foi utilizado o software Transcriptome Analysis
144 Console (versão 4.0.2; Thermo Fisher Scientific) para o controle de qualidade,
145 normalização de dados e detecção de sinal de expressão [algoritmo *robust multichip*
146 *analysis* (RMA) e algoritmos *detection above background* (DABG)], e análise de
147 expressão diferencial [pacote limma com estatística eBayes ($p < 0.05$ e fold change \geq
148 1.5 ou ≤ -1.5)]. Os dados foram então filtrados para incluir apenas miRNAs maduros
149 e específicos da espécie *Rattus norvegicus*, que foram então utilizados para análises
150 bioinformáticas subsequentes.

151 Para gerar os *heatmaps* dos miRNAs diferencialmente expressos, as
152 intensidades de sinal das amostras foram *clusterizadas* a partir da distância
153 euclidiana, utilizando o pacote "ComplexHeatmap" no R (versão 4.2.0) (Gu et al.,
154 2016), utilizando o RStudio (versão 2023.03.0+386). Gráficos de dispersão e tipo
155 vulcão foram criados utilizando o GraphPad Prism (versão 8.0), utilizando os valores
156 de *fold change*, delta *fold change* e valores de p. Diagramas de Venn foram
157 construídos utilizando o pacote "VennDiagram" no R.

158

159 **2.8. Predição *in silico* de alvos de miRNA e análise de enriquecimento de vias**

160 Os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos foram previstos *in silico*
161 utilizando a plataforma mirMap (<https://mirmap.ezlab.org/>; versão de dados
162 mirmap_202203), considerando um *score* de 90 ou superior (Vejnar et al., 2013).

163 A análise de enriquecimento *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and*
164 *Genomes*) e *GO* (*Gene Ontology*) foi realizada utilizando a aplicação g:Profiler (versão
165 e109_eg56_p17_1d3191d; <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>), com o método de correção
166 de múltiplos testes (g:SCS; significância de 0,05) (Raudvere et al., 2019). Análises de
167 enriquecimento para os alvos previstos dos miRNAs *downregulados* e *upregulados*
168 foram conduzidas separadamente. Para as vias *KEGG*, os resultados são
169 apresentados em gráficos de barras. Para os termos de Gene Ontology, mapas de
170 enriquecimento foram criados usando o aplicativo EnrichmentMap (versão 3.3.6)
171 (Merico et al., 2010), no software Cytoscape (versão 3.10.0) (Shannon et al., 2003).
172 Para melhor visualização e interpretação, o AutoAnnotate (versão 1.4.0) foi usado
173 para identificar os clusters de termos *GO*, que foram curados manualmente para
174 produzir as figuras (Reimand et al., 2019).

175 Para o miRNA de interesse, foi construída uma rede de interações miRNA-
176 mRNA (*Rattus norvegicus*) usando o Cystoscape, com alvos validados obtidos a partir
177 da miRTarBase 9 (Huang et al., 2022).

178

179

180 **3. RESULTADOS**

181

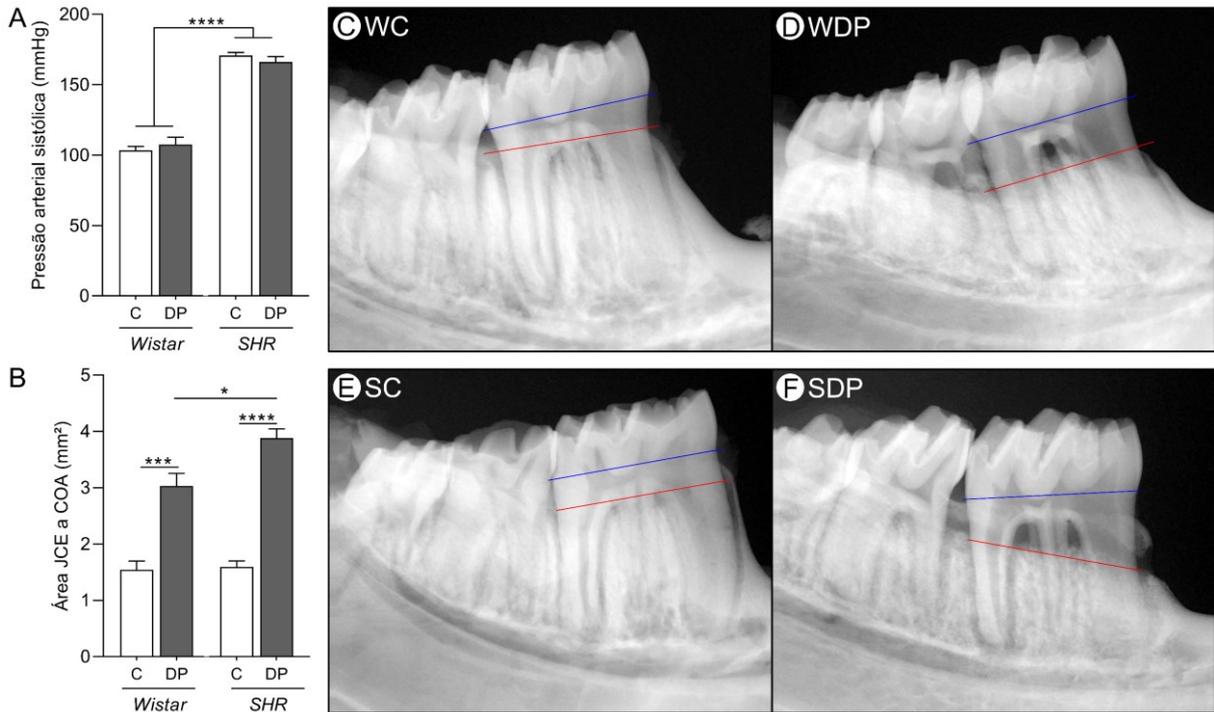
182 **3.1. Animais hipertensos tem maior perda óssea alveolar induzida pela doença** 183 **periodontal (DP)**

184 Avaliamos a pressão arterial sistólica (PAS) após a indução da DP para
185 confirmar o fenótipo hipertensivo em nosso modelo (Figura 2-1A). Os grupos SHR
186 apresentaram uma média de PAS de 160 mmHg, confirmando a hipertensão, diferente
187 dos grupos Wistar, com um valor médio de 100 mmHg. Além disso, a DP não alterou
188 a PAS.

189 Em seguida, avaliamos a perda óssea alveolar por medida radiográfica, para
190 confirmar a indução da DP (Figura 2-1B). Wistar e SHR com DP apresentaram
191 significativa reabsorção óssea, em relação a seus respectivos controles (Figura 2-1C-
192 D e E-F). Como esperado, a perda óssea foi mais pronunciada nos SHRs, como já
193 mostrado anteriormente (Bonato et al., 2012; Brito et al., 2021).

194

195



196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

Figura 2- 1. Pressão arterial sistólica e perda óssea alveolar induzida por DP em ratos SHR e Wistar. (A) Pressão arterial sistólica 15 dias após a indução da DP (n=5). (B) Distância média entre a junção cimento-esmalte (CEJ) e crista óssea alveolar lingual (ABC) na região do primeiro molar. (C-F) Radiografia representativa, na região dos molares, delineando a área de reabsorção óssea alveolar. Os gráficos representam a média \pm DP, e as diferenças estatísticas são indicadas com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, e **** $p < 0,0001$ (one-way ANOVA, com teste *post hoc* de Sidak)

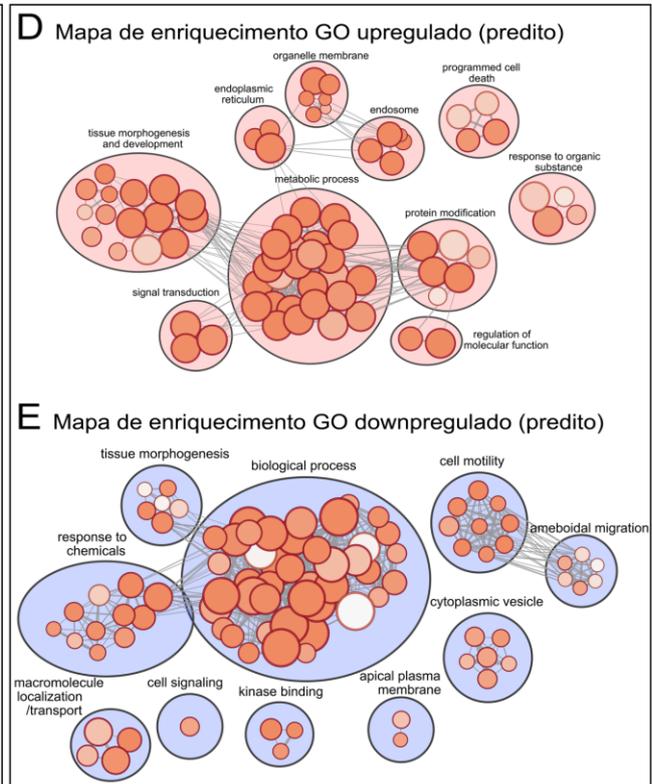
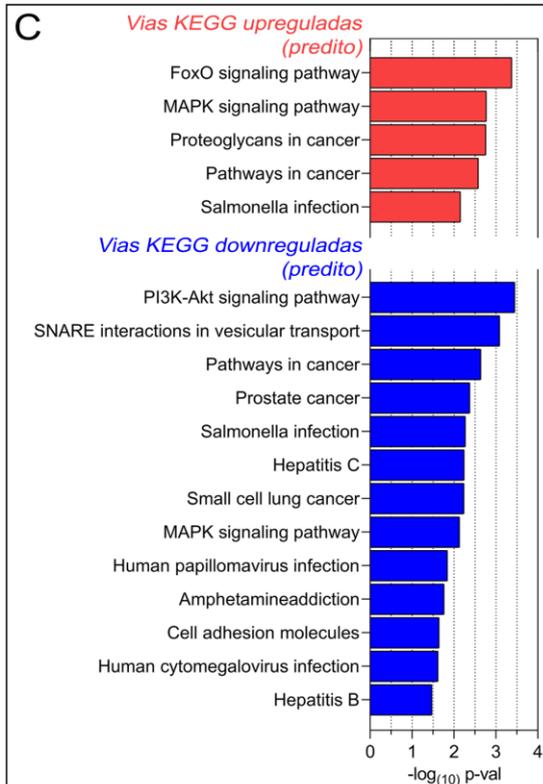
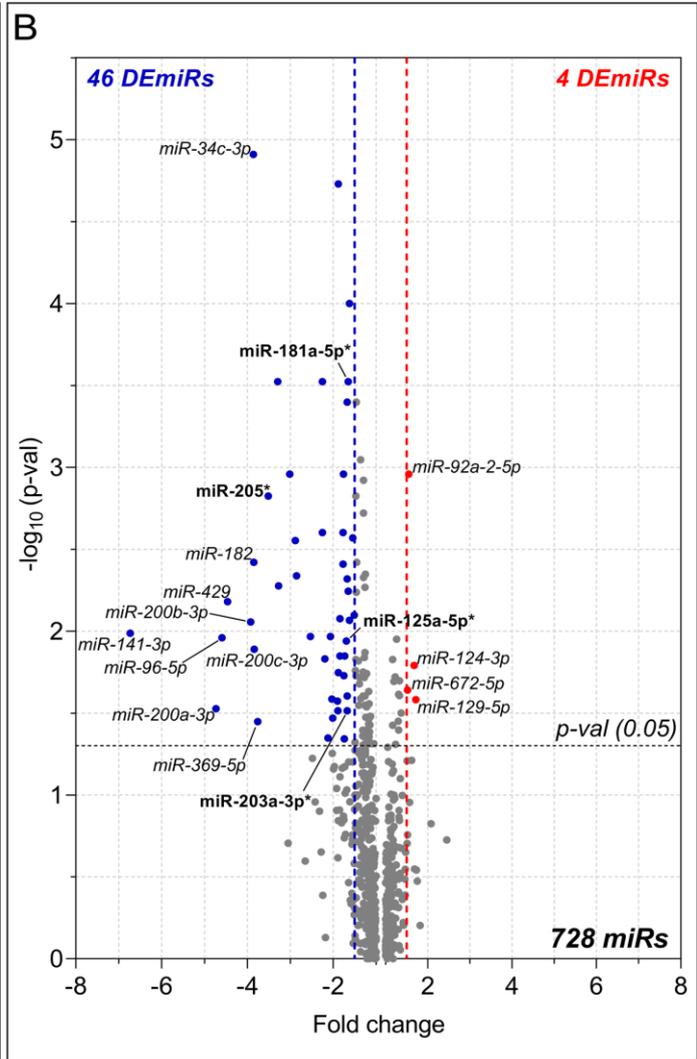
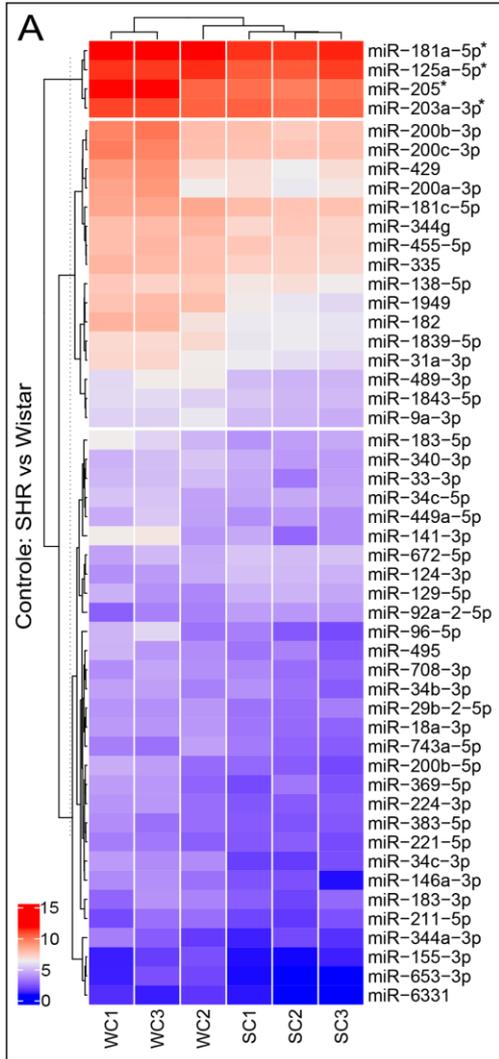
207 **3.2. SHR apresentam diferenças intrínsecas na expressão de miRNAs na**
208 **mandíbula**

209 Para investigar potenciais fatores que contribuem para o aumento da perda
210 óssea alveolar em SHR, realizamos uma análise em microarranjo de microRNAs
211 (miRNAs) na mandíbula, e um total de 728 miRNAs maduros (*Rattus norvegicus*)
212 foram identificados nas amostras de mandíbula.

213 Inicialmente, comparamos os grupos SHR e Wistar Controle para evidenciar
214 diferenças constitutivas no animal hipertensivo. Cinquenta miRNAs diferencialmente
215 expressos (DEmiRs) foram encontrados no grupo SHR Controle, em comparação com
216 o Controle Wistar. Desses, 46 foram *downregulados* e 4 foram *upregulados*, e a
217 clusterização no *heatmap* mostrou que os miR-181a-5p, miR-125a-5p, miR-205 e
218 miR-200a-3p apresentaram os maiores níveis de expressão (Figura 2-2A e B, e
219 Tabela 2-1). O enriquecimento KEGG dos alvos previstos dos miRNAs *downregulados*
220 mostrou que as vias de sinalização FoxO e MAPK foram as mais significativas,
221 juntamente com a regulação de morfogênese e a transdução de sinais, no mapa de
222 enriquecimento de GO (Figura 2-2C e D).

223 Em relação ao enriquecimento alvos previstos de miRNAs *upregulados*, as vias
224 de sinalização PI3K-Akt e transporte de vesículas associado ao SNARE foram
225 significativas (Figura 2-2C). Além disso, entre as vias previstas como *downreguladas*,
226 também observamos a sinalização de MAPK, adesão celular, vias associadas a
227 infecções bacterianas e virais, além de motilidade celular e resposta a produtos
228 químicos, no enriquecimento de GO (Figura 2-2C e E). Esses dados sugerem
229 diferenças intrínsecas na expressão de miRNAs no modelo SHR, associadas a vias
230 de sinalização e respostas imunes.

231



233 **Figura 2- 2. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de**
 234 **SHR Controle versus Wistar Controle.** (A) *Heatmap* mostra o nível de expressão
 235 dos DEmiRs, com agrupamento hierárquico (dendrogramas), asterisco (*) indica os
 236 miRNAs mais expressos); (B) Gráfico tipo vulcão mostra a significância estatística (p-
 237 val; eixo y) e fold change (eixo x) dos DEmiR; (C) Vias KEGG e (D e E) mapas de
 238 enriquecimento GO dos alvos previstos dos DEmiR; Enriquecimento dos alvos de
 239 miRNA downregulados são mostrados como vias upreguladas e vice-versa; tamanho
 240 dos nodos indicam a quantidade de genes enriquecidos; Saturação de cor dos nodos
 241 representa a significância (valor Q); Espessura das arestas representa a quantidade
 242 de genes compartilhados.
 243

244

245 **Tabela 2- 1. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de**
 246 **SHR Controle versus Wistar Controle**

247

| Downregulados | | | Downregulados (cont.) | | |
|-----------------|-------|---------|-----------------------|-----------|--------------|
| microRNA | FC | p-val | microRNA | FC | p-val |
| rno-miR-141-3p | -6,73 | 0,0103 | rno-miR-138-5p | -1,84 | 0,0142 |
| rno-miR-200a-3p | -4,73 | 0,0298 | rno-miR-340-3p | -1,84 | 0,0084 |
| rno-miR-96-5p | -4,59 | 0,0110 | rno-miR-181c-5p | -1,77 | 0,0039 |
| rno-miR-429 | -4,46 | 0,0066 | rno-miR-29b-2-5p | -1,77 | 0,0025 |
| rno-miR-200b-3p | -3,92 | 0,0088 | rno-miR-1843-5p | -1,76 | 0,0011 |
| rno-miR-34c-3p | -3,86 | 1,2E-05 | rno-miR-449a-5p | -1,75 | 0,0187 |
| rno-miR-182 | -3,85 | 0,0038 | rno-miR-34c-5p | -1,74 | 0,0455 |
| rno-miR-200c-3p | -3,84 | 0,0129 | rno-miR-155-3p | -1,73 | 0,0142 |
| rno-miR-369-5p | -3,76 | 0,0357 | rno-miR-125a-5p* | -1,69 | 0,0115 |
| rno-miR-205 | -3,51 | 0,0015 | rno-miR-203a-3p | -1,67 | 0,0306 |
| rno-miR-1949 | -3,29 | 0,0003 | rno-miR-344g | -1,67 | 0,0004 |
| rno-miR-200b-5p | -3,27 | 0,0053 | rno-miR-6331 | -1,67 | 0,0048 |
| rno-miR-489-3p | -3,01 | 0,0011 | rno-miR-743a-5p | -1,67 | 0,0249 |
| rno-miR-224-3p | -2,88 | 0,0028 | rno-miR-181a-5p | -1,65 | 0,0003 |
| rno-miR-146a-3p | -2,85 | 0,0046 | rno-miR-9a-3p | -1,65 | 0,0057 |
| rno-miR-183-5p | -2,53 | 0,0108 | rno-miR-33-3p | -1,62 | 0,0086 |
| rno-miR-31a-3p | -2,25 | 0,0003 | rno-miR-335 | -1,62 | 0,0001 |
| rno-miR-653-3p | -2,25 | 0,0025 | rno-miR-455-5p | -1,54 | 0,0027 |
| rno-miR-18a-3p | -2,19 | 0,0148 | rno-miR-383-5p | -1,51 | 0,0080 |
| rno-miR-34b-3p | -2,12 | 0,0450 | | | |
| rno-miR-211-5p | -2,06 | 0,0108 | Upregulados | | |
| rno-miR-495 | -2,03 | 0,0260 | microRNA | FC | p-val |
| rno-miR-344a-3p | -2,01 | 0,0340 | rno-miR-129-5p | 1,72 | 0,0262 |
| rno-miR-183-3p | -1,90 | 0,0267 | rno-miR-124-3p | 1,68 | 0,0162 |
| rno-miR-221-5p | -1,89 | 0,0306 | rno-miR-92a-2-5p | 1,55 | 0,0011 |
| rno-miR-1839-5p | -1,88 | 0,0000 | rno-miR-672-5p | 1,52 | 0,0229 |
| rno-miR-708-3p | -1,88 | 0,0179 | | | |

248 **3.3. Predição *in silico* sugerem vias de sinalização celular e resposta imune**
249 **modulados por miRNAs em mandíbula de ratos Wistar com DP**

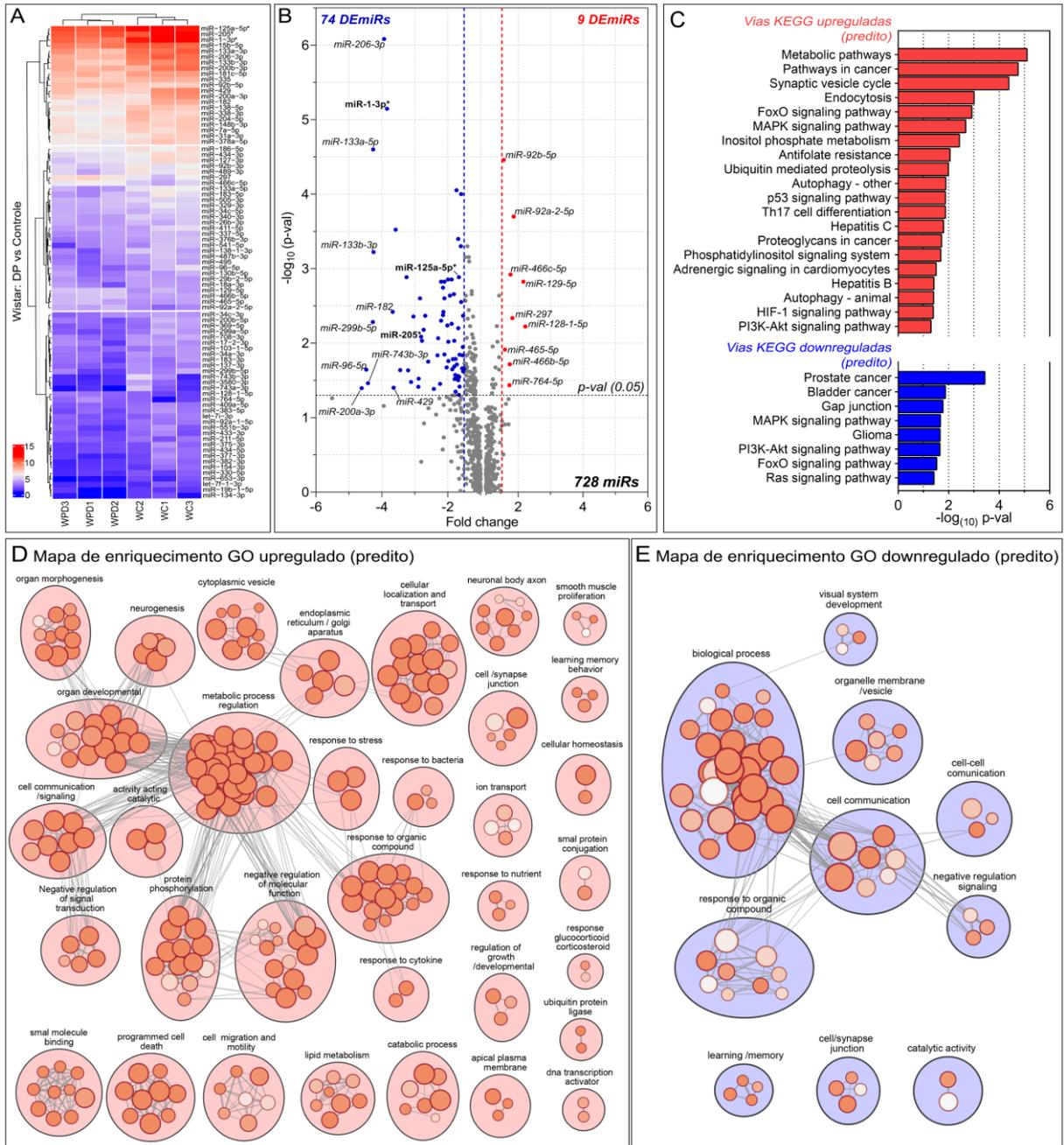
250 Avaliamos então as diferenças entre os grupos com DP e Controle em cada
251 modelo animal. Nos ratos Wistar com DP, em comparação ao Controle, encontramos
252 83 DEmiRs, sendo 74 *downregulados* e 9 *upregulados* (Figura 2-3A e B, e Tabela 2-
253 2). Os miR-125a-5p, miR-205, miR-1-3p e miR-15b-5p foram os mais expressos, como
254 observado na *clusterização* do *heatmap* (Figura 2-3A).

255 A análise de enriquecimento KEGG mostrou que a autofagia e a diferenciação
256 Th17 estariam *upreguladas*, além das vias de sinalização FoxO, MAPK, p53, HIF-1 e
257 PI3K (Figura 2-3C), e o mapa de enriquecimento de GO mostrou *clusters* associados
258 a processos metabólicos, comunicação celular, fosforilação de proteínas, resposta a
259 bactérias e citocinas, migração celular e apoptose (Figura 2-3D).

260 Em relação as vias *downreguladas*, observamos a sinalização de MAPK, PI3K
261 e FoxO (também previstas como *upreguladas*), juntamente com junção de gap e
262 sinalização Ras, e comunicação celular e resposta a produtos químicos, em *cluster*
263 do enriquecimento de GO (Figura 2-3E). Esses achados sugerem o potencial
264 envolvimento de microRNAs na regulação de sinalização intracelular, respostas
265 imunes e migração celular na mandíbula de ratos Wistar com DP.

266

267



268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281

Figura 2- 3. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de Wistar com DP versus Wistar Controle. (A) *Heatmap* mostra o nível de expressão dos DEmiRs, com agrupamento hierárquico (dendrogramas), asterisco (*) indica os miRNAs mais expressos); (B) Gráfico tipo vulcão mostra a significância estatística (p-val; eixo y) e fold change (eixo x) dos DEmiR; (C) Vias KEGG e (D e E) mapas de enriquecimento GO dos alvos previstos dos DEmiR; Enriquecimento dos alvos de miRNA regulados negativamente são mostrados como vias reguladas positivamente e vice-versa. Mapas independentes; tamanho dos nodos indicam a quantidade de genes enriquecidos; Saturação de cor dos nodos representa a significância; Espessura das arestas representa a quantidade de genes compartilhados.

282 **Tabela 2- 2. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de**
 283 **Wistar com DP versus Wistar Controle**
 284

| Downregulados | | | Downregulados (cont.) | | |
|----------------------|-----------|--------------|------------------------------|-----------|--------------|
| microRNA | FC | p-val | microRNA | FC | p-val |
| rno-miR-200a-3p | -4,61 | 0,040 | rno-miR-338-3p | -1,98 | 0,010 |
| rno-miR-96-5p | -4,47 | 0,023 | rno-miR-434-3p | -1,93 | 0,002 |
| rno-miR-743b-3p | -4,42 | 0,034 | rno-miR-34c-3p | -1,88 | 0,006 |
| rno-miR-299b-5p | -4,27 | 0,005 | rno-miR-505-3p | -1,88 | 0,0014 |
| rno-miR-133a-5p | -4,26 | 2,5E-05 | rno-miR-137-3p | -1,86 | 0,0225 |
| rno-miR-133b-3p | -4,25 | 0,001 | rno-miR-7a-5p | -1,84 | 0,0164 |
| rno-miR-206-3p | -3,93 | 0,000 | rno-miR-181c-5p | -1,81 | 0,0022 |
| rno-miR-1-3p | -3,84 | 0,000 | rno-miR-103-1-5p | -1,80 | 0,0206 |
| rno-miR-182 | -3,67 | 0,004 | rno-miR-34a-3p | -1,80 | 0,0093 |
| rno-miR-429 | -3,64 | 0,040 | rno-miR-434-5p | -1,79 | 0,0303 |
| rno-miR-133a-3p | -3,58 | 0,000 | rno-miR-34c-5p | -1,77 | 0,0267 |
| rno-miR-369-5p | -3,44 | 0,023 | rno-miR-134-3p | -1,76 | 0,0163 |
| rno-miR-299a-5p | -3,25 | 0,001 | rno-miR-18a-3p | -1,76 | 0,0447 |
| rno-miR-743a-3p | -3,20 | 0,023 | rno-miR-378a-5p | -1,73 | 0,0001 |
| rno-miR-541-5p | -3,11 | 0,033 | rno-miR-19b-1-5p | -1,72 | 0,0280 |
| rno-miR-183-5p | -3,04 | 0,004 | rno-miR-495 | -1,72 | 0,0193 |
| rno-miR-200b-3p | -2,89 | 0,039 | rno-miR-26b-3p | -1,68 | 0,0063 |
| rno-miR-138-1-3p | -2,88 | 0,030 | rno-miR-31a-3p | -1,68 | 0,0314 |
| rno-miR-377-3p | -2,84 | 0,003 | rno-miR-335 | -1,68 | 0,0004 |
| rno-miR-205 | -2,81 | 0,008 | rno-miR-375-3p | -1,68 | 0,0276 |
| rno-miR-200b-5p | -2,78 | 0,009 | rno-miR-125a-5p | -1,66 | 0,0013 |
| rno-miR-487b-3p | -2,73 | 0,007 | rno-miR-211-5p | -1,66 | 0,0496 |
| rno-miR-376b-3p | -2,68 | 0,004 | rno-miR-433-3p | -1,65 | 0,0284 |
| rno-miR-3580-3p | -2,59 | 0,018 | rno-miR-17-2-3p | -1,64 | 0,0384 |
| rno-miR-411-5p | -2,42 | 0,041 | rno-miR-204-5p | -1,64 | 0,0143 |
| rno-miR-551b-3p | -2,31 | 0,015 | rno-miR-92a-1-5p | -1,60 | 0,0005 |
| rno-miR-154-3p | -2,29 | 0,009 | rno-miR-148b-3p | -1,59 | 0,0001 |
| rno-miR-130b-5p | -2,23 | 0,035 | rno-miR-15b-5p | -1,59 | 0,0028 |
| rno-miR-127-3p | -2,20 | 0,005 | rno-miR-186-5p | -1,56 | 0,0218 |
| rno-miR-383-5p | -2,20 | 0,002 | rno-miR-29b-2-5p | -1,55 | 0,0146 |
| rno-miR-337-5p | -2,14 | 0,002 | rno-miR-409a-5p | -1,54 | 0,0113 |
| rno-miR-653-3p | -2,14 | 0,004 | rno-miR-183-3p | -1,53 | 0,0239 |
| rno-miR-382-3p | -2,13 | 0,004 | rno-miR-92b-3p | -1,53 | 0,0043 |
| rno-let-7i-3p | -2,10 | 0,014 | rno-let-7f-1-3p | -1,50 | 0,0222 |
| rno-miR-489-3p | -2,10 | 0,002 | | | |
| rno-miR-708-3p | -2,10 | 0,003 | | | |
| rno-miR-330-5p | -2,03 | 0,021 | Upregulados | | |
| rno-miR-138-5p | -2,01 | 0,006 | microRNA | FC | p-val |
| rno-miR-340-3p | -1,99 | 0,001 | rno-miR-128-1-5p | 2,22 | 0,0060 |
| rno-miR-329-3p | -1,98 | 0,017 | rno-miR-129-5p | 2,16 | 0,0015 |
| | | | rno-miR-92a-2-5p | 1,86 | 0,0002 |

Tabela 2-2 (continuação)

| Upregulados (cont.) | | | Upregulados (cont.) | | |
|---------------------|------|--------|---------------------|------|---------|
| microRNA | FC | p-val | microRNA | FC | p-val |
| rno-miR-297 | 1,82 | 0,0046 | rno-miR-764-5p | 1,73 | 0,0367 |
| rno-miR-466c-5p | 1,76 | 0,0012 | rno-miR-465-5p | 1,59 | 0,0122 |
| rno-miR-466b-5p | 1,74 | 0,0192 | rno-miR-92b-5p | 1,55 | 3,5E-05 |

285

286

287 **3.4. SHR apresenta um perfil distinto de miRNAs associado a DP**

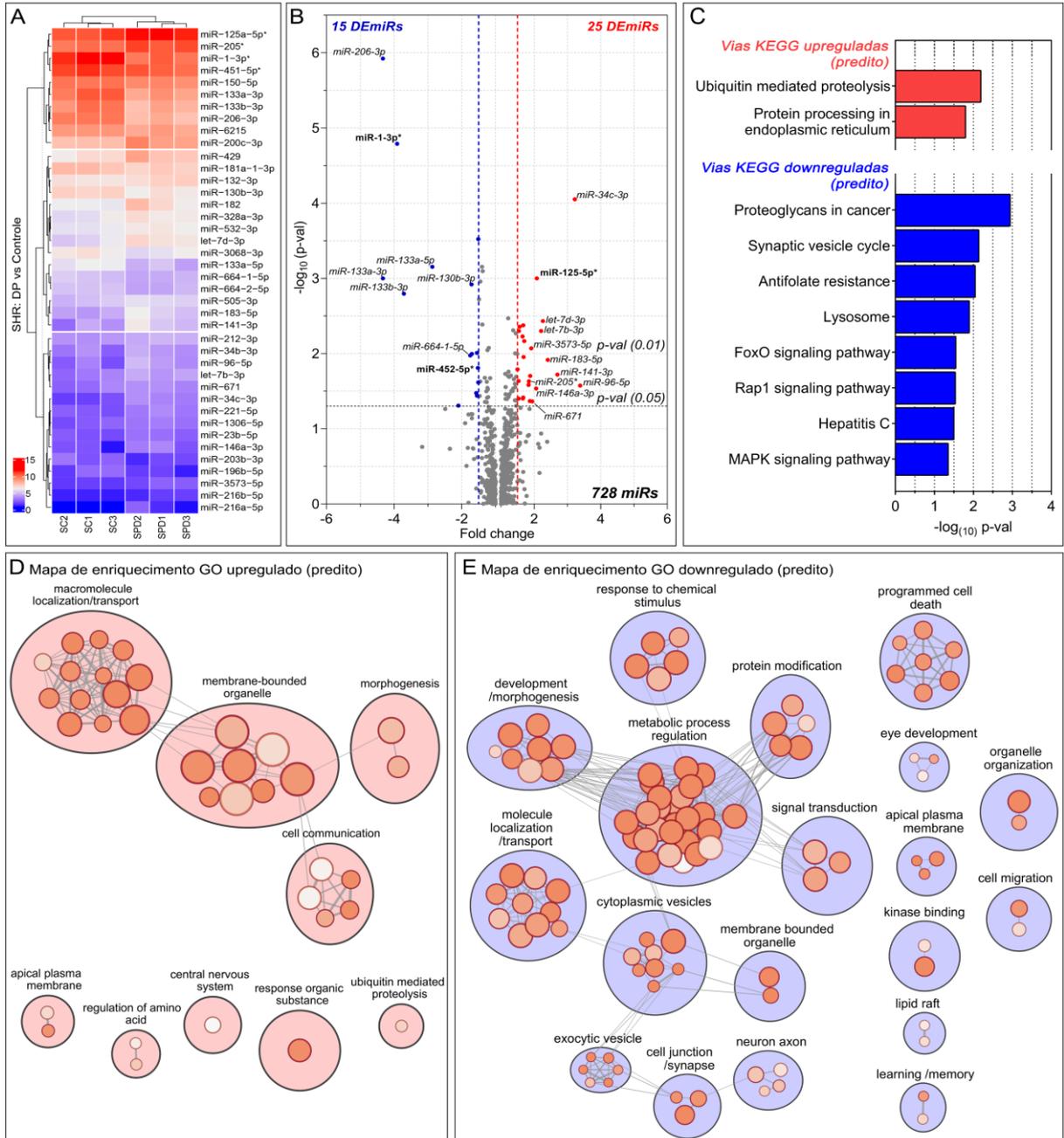
288 Nos SHRs com DP, comparados ao seu grupo controle, foram identificados 40
289 miRNAs DEmiRs, sendo 15 *downregulados* e 25 *upregulados*. Entre os mais
290 expressos, foram observados os miR-125a-5p, miR-205 e miR-1-3p, como nos Wistar
291 (Figura 2-4A e B, e Tabela 2-3), entretanto nos SHR com DP, os miR-125a-5p e miR-
292 205 foram *upregulados*. A análise de enriquecimento KEGG indicou a regulação
293 positiva da proteólise e processamento de proteínas no retículo endoplasmático, além
294 de clusters do enriquecidos de GO associados à comunicação celular, organelas
295 delimitadas por membrana e localização/transporte de macromoléculas (Figura 2-4C
296 e D). As vias previstas como *downreguladas* incluíram sinalização Ras1, FoxO e
297 MAPK, também observadas nos ratos Wistar (Figura 2-4C), além de vias associadas
298 a hepatite, diferente do Wistars. Os clusters de GO também indicaram repressão da
299 transdução de sinais, resposta a estímulos químicos e apoptose (Figura 2-4E).

300 É importante destacar que o modelo SHR apresentou menos DEmiR, com a
301 maioria sendo *upreguladas*, enquanto nos Wistar, a maioria dos DEmiRs foram
302 *downregulados*, sugerindo uma resposta distinta entre os dois modelos. Apenas
303 quatro miRNAs *downregulados* (miR-206-3p, miR-133a-3p, miR-133b-3p e miR-1-3p)
304 foram compartilhados entre SHR e Wistar com DP, em comparação com seus
305 respectivos controles, enquanto os demais miRNAs foram modulados apenas em um
306 modelo específico, como mostrado na Figura 2-5, por meio de um diagrama de Venn.

307 Nossos resultados evidenciam um perfil distinto de miRNAs associado à DP no rato
308 hipertenso, o que pode ajudar a compreender os mecanismos associados a maior
309 perda óssea alveolar induzida pela DP.

310

311



312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325

Figura 2- 4. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de SHR com DP versus SHR Controle. (A) *Heatmap* mostra o nível de expressão dos DEmiRs, com agrupamento hierárquico (dendrogramas), asterisco (*) indica os miRNAs mais expressos); (B) Gráfico tipo vulcão mostra a significância estatística (p-val; eixo y) e fold change (eixo x) dos DEmiR; (C) Vias KEGG e (D e E) mapas de enriquecimento GO dos alvos previstos dos DEmiR; Enriquecimento dos alvos de miRNA regulados negativamente são mostrados como vias reguladas positivamente e vice-versa. Mapas independentes; tamanho dos nodos indicam a quantidade de genes enriquecidos; Saturação de cor dos nodos representa a significância; Espessura das arestas representa a quantidade de genes compartilhados.

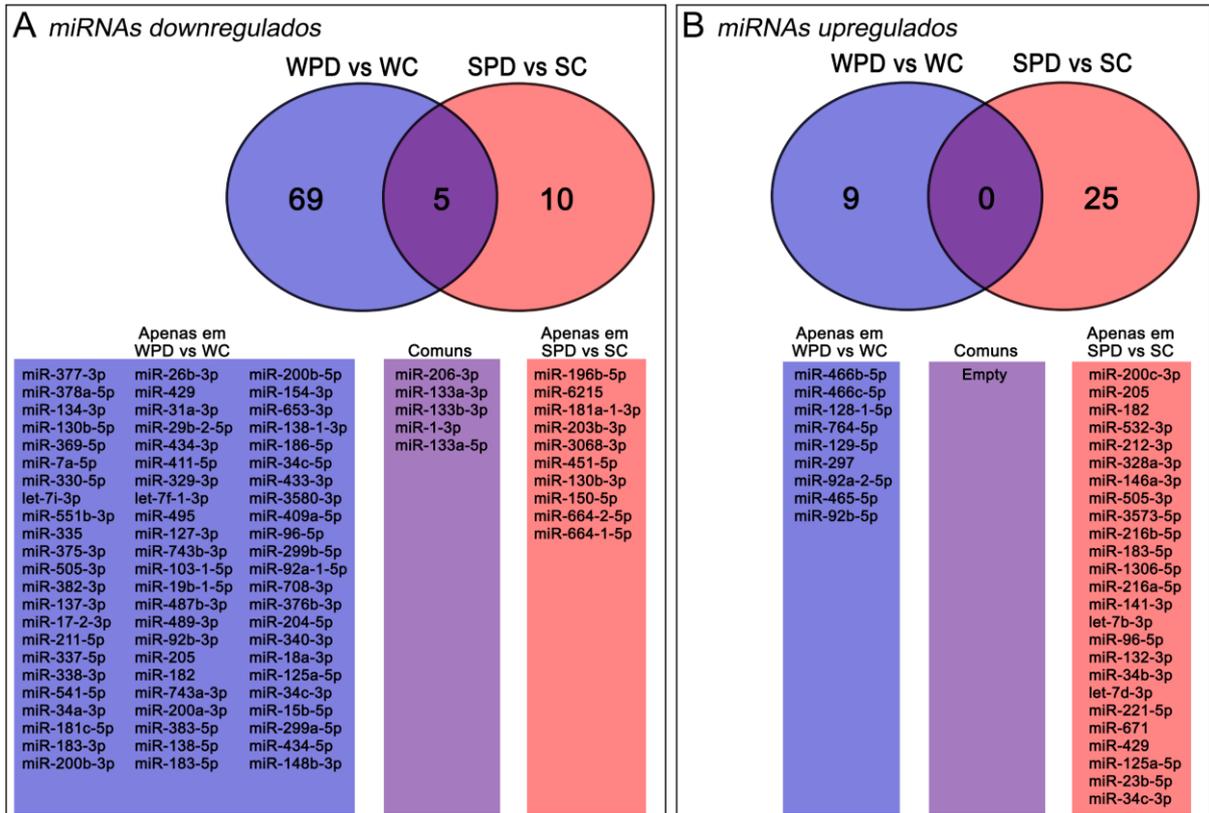
326 **Tabela 2- 3. MiRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) nas mandíbulas de**
 327 **SHR com DP versus SHR Controle**

328

| Downregulados | | | Upregulados (cont.) | | |
|----------------------|-----------|--------------|----------------------------|-----------|--------------|
| microRNA | FC | p-val | microRNA | FC | p-val |
| rno-miR-206-3p | -4,33 | 1,2E-06 | rno-let-7d-3p | 2,26 | 0,0037 |
| rno-miR-133a-3p | -4,33 | 0,0010 | rno-let-7b-3p | 2,21 | 0,0050 |
| rno-miR-1-3p | -3,91 | 1,6E-05 | rno-miR-125a-5p | 2,08 | 0,0010 |
| rno-miR-133b-3p | -3,71 | 0,0016 | rno-miR-146a-3p | 2,06 | 0,0291 |
| rno-miR-133a-5p | -2,87 | 0,0007 | rno-miR-671 | 1,94 | 0,0432 |
| rno-miR-196b-5p | -2,10 | 0,0492 | rno-miR-3573-5p | 1,91 | 0,0085 |
| rno-miR-664-2-5p | -1,75 | 0,0106 | rno-miR-200c-3p | 1,88 | 0,0198 |
| rno-miR-130b-3p | -1,71 | 0,0012 | rno-miR-182 | 1,87 | 0,0428 |
| rno-miR-181a-1-3p | -1,70 | 0,0101 | rno-miR-205 | 1,84 | 0,0233 |
| rno-miR-3068-3p | -1,57 | 0,0334 | rno-miR-34b-3p | 1,83 | 0,0261 |
| rno-miR-664-1-5p | -1,55 | 0,0098 | rno-miR-221-5p | 1,70 | 0,0068 |
| rno-miR-203b-3p | -1,55 | 0,0363 | rno-miR-216a-5p | 1,68 | 0,0111 |
| rno-miR-451-5p | -1,52 | 0,0155 | rno-miR-23b-5p | 1,67 | 0,0042 |
| rno-miR-6215 | -1,51 | 0,0241 | rno-miR-212-3p | 1,67 | 0,0384 |
| rno-miR-150-5p | -1,51 | 0,0003 | rno-miR-328a-3p | 1,66 | 0,0395 |
| | | | rno-miR-1306-5p | 1,65 | 0,0059 |
| | | | rno-miR-216b-5p | 1,56 | 0,0044 |
| Upregulados | | | rno-miR-505-3p | 1,54 | 0,0050 |
| microRNA | FC | p-val | rno-miR-429 | 1,53 | 0,0397 |
| rno-miR-96-5p | 3,38 | 0,0266 | rno-miR-132-3p | 1,53 | 0,0231 |
| rno-miR-34c-3p | 3,22 | 0,0001 | rno-miR-532-3p | 1,50 | 0,0162 |
| rno-miR-141-3p | 2,70 | 0,0190 | | | |
| rno-miR-183-5p | 2,41 | 0,0121 | | | |

329

330



331

332

333

334

335

336

337

Figura 2- 5. Diagrama de Venn para DEmiRs na DP. (A) MiRNAs downregulados e (B) upregulados nas mandíbulas de SHR e Wistar com DP versus seus respectivos controles (WPD vs WC e SPD vs SC).

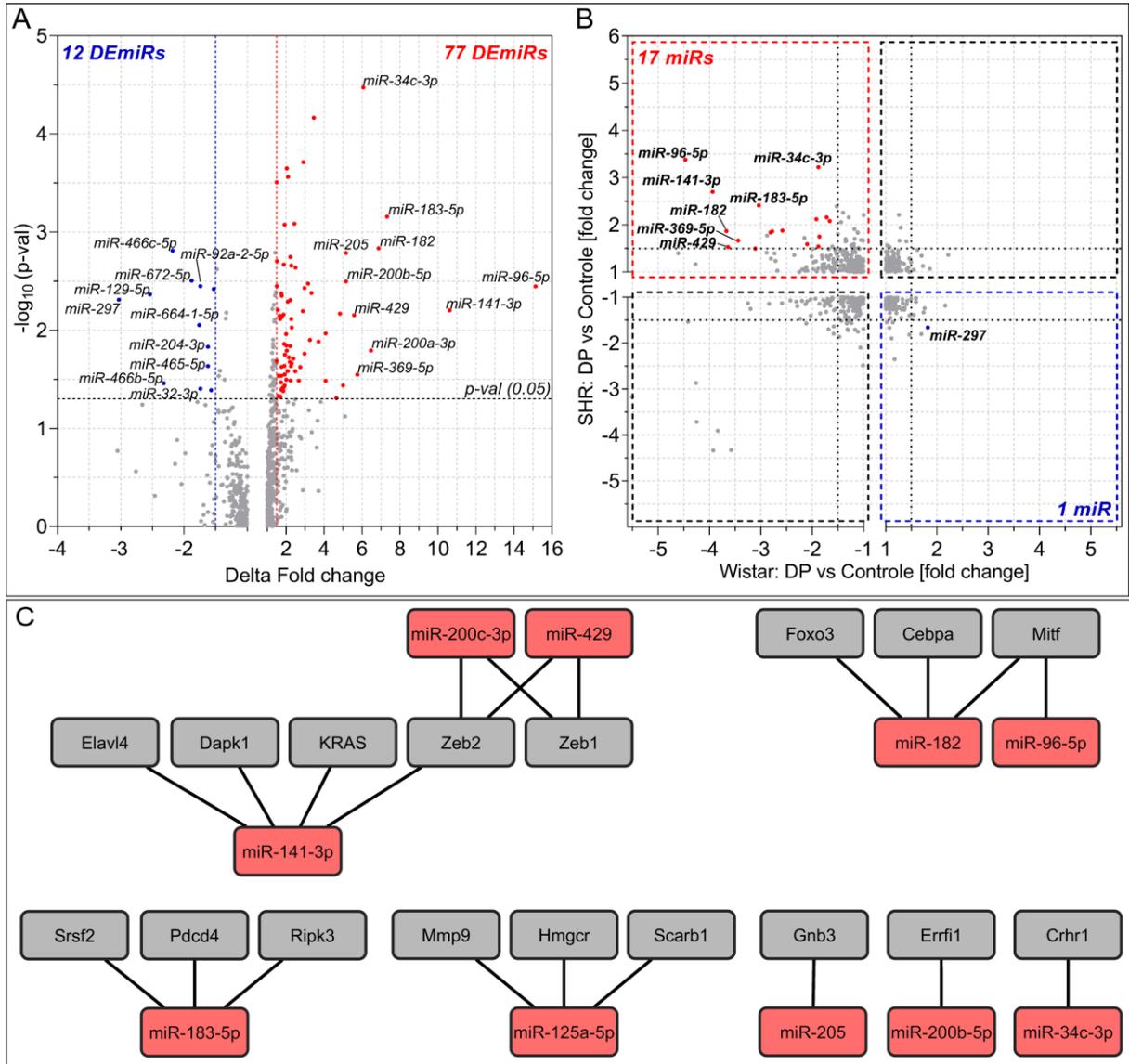
338 **3.5. MiRNAs são diferencialmente regulados no SHR com DP em relação aos**
339 **grupos normotensos**

340 Para melhor compreender a modulação distintas de miRNAs no modelo SHR,
341 investigamos a interação entre os grupos com DP e controle em ratos SHR e Wistar,
342 obtendo os miRNAs com *delta fold change* (deltaFC) significativos, onde um deltaFC
343 negativo indica regulação positiva em SHR (PD vs. controle), enquanto negativa ou
344 neutra em Wistar (PD vs. controle), e vice-versa.

345 Identificamos 12 miRNAs com deltaFC negativo e 77 com deltaFC positivo
346 (Figura 2-6A) e para visualizar os miRNAs que apresentaram modulação oposta em
347 SHR e Wistar, com pelo menos 1,5 vezes de modulação em cada linhagem, geramos
348 um gráfico de dispersão (Figura 2-6B). Um miRNA foi *downregulado* em SHR com DP,
349 enquanto foi *upregulado* em Wistar com DP, enquanto 17 miRNAs foram *upregulados*
350 nos SHR com DP e *downregulados* nos Wistar com DP (Figura 2-6B).

351 Para obter mais informações sobre a modulação de vias pelos DEmiRs,
352 construímos uma *network* utilizando interações miRNA-mRNA (IMM) validadas
353 experimentalmente, anotadas na base de dados miRTarBase (Figura 2-6C). Entre os
354 alvos identificados, podemos destacar Zeb2 (miR-200c-3p, miR-449, miR-141-3p),
355 Zeb1 (miR-200c-3p, miR-449) e Mitf (miR-182 e miR-96-5p), que apresentaram mais
356 (IMM) (Figura 2-6C). Em conjunto, nossos dados sugerem vias reguladas por miRNAs
357 potencialmente associadas a perda óssea aumentada no modelo SHR, como Zeb1 e
358 2 e Mitf.

359



360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

Figura 2- 6. MiRNAs regulados diferencialmente em SHR com PD versus SHR Controle comparado a Wistar com PD versus Wistar Controle. (A) Gráfico tipo vulcão mostra a significância estatística (p-val; eixo y) e delta fold change (dFC; eixo x); (B) Gráfico de dispersão mostra o fold change de DE miRNAs em SHR com PD versus SHR Controle (eixo y) e Wistar com PD versus Wistar Controle (eixo x) (linhas pontilhadas indicam fold change de 1,5 ou -1,5); (C) Network de miRNAs (vermelho) e mRNA-alvos validados (cinza).

Tabela 2-4 (continuação)

| Delta positivo (cont.) | | | Delta positivo (cont.) | | |
|------------------------|------|--------|------------------------|------|--------|
| microRNA | dFC | p-val | microRNA | dFC | p-val |
| rno-miR-30e-5p | 1,74 | 0,0292 | rno-miR-33-3p | 1,59 | 0,0469 |
| rno-miR-204-5p | 1,73 | 0,0340 | rno-miR-92a-1-5p | 1,56 | 0,0062 |
| rno-miR-3557-3p | 1,70 | 0,0475 | rno-miR-224-5p | 1,52 | 0,0020 |
| rno-miR-23b-5p | 1,69 | 0,0077 | rno-miR-543-3p | 1,51 | 0,0036 |
| rno-miR-92a-3p | 1,65 | 0,0071 | rno-miR-216b-5p | 1,50 | 0,0205 |
| rno-miR-322-5p | 1,61 | 0,0291 | rno-miR-100-5p | 1,50 | 0,0003 |

374

375

376 **4. DISCUSSÃO**

377 No presente estudo, examinamos o perfil de expressão dos miRNAs nas
378 mandíbulas de ratos Wistar e SHR com DP, com o objetivo de identificar miRNAs
379 associados ao aumento da perda óssea alveolar em animais hipertensos. Os miRNAs
380 desempenham um papel complexo como reguladores pós-transcricionais, visto que
381 um único miRNA pode potencialmente modular diferentes mRNAs. Para que ocorra a
382 repressão gênica e um efeito biológico significativo através das interações miRNA-
383 mRNA, é necessário que o miRNA seja expresso em níveis suficientes e
384 simultaneamente ao mRNA alvo (Wilczynska & Bushell, 2015). A regulação de
385 processos biológicos por miRNAs geralmente envolve uma rede de diferentes miRNAs
386 que podem modular de forma redundante a mesma via biológica, produzindo
387 coletivamente um fenótipo mais robusto.

388 Realizamos o enriquecimento de vias com base nos alvos previstos dos
389 miRNAs significativamente modulados para obter uma melhor compreensão dos
390 processos associados aos miRNAs em nosso modelo. É importante considerar que a
391 predição de alvos *in silico* pode introduzir vieses e gerar falsos positivos. Para mitigar
392 esse problema, utilizamos o algoritmo miRmap, que incorpora um escore de força de
393 repressão do miRNA baseado em um modelo linear que combina diferentes

394 características de predição para aumentar a assertividade (Vejnar et al., 2013). Com
395 essa abordagem, buscamos aumentar a confiabilidade na identificação de
396 perturbações em vias potencialmente associadas aos miRNAs identificados em
397 nossos dados.

398 Além disso, destacamos miRNAs de interesse que não foram previamente
399 associados à homeostase ou distúrbios periodontais, e discutimos os DEmiRs mais
400 significativos que já foram relacionados à inflamação periodontal e ao metabolismo
401 ósseos. Ainda, é importante ressaltar que a literatura existente se concentra em
402 mecanismos relacionados aos osteoblastos, enquanto a regulação de osteoclastos
403 por miRNAs ainda é relativamente pouco estudada.

404 O rato SHR, em comparação ao Wistar, apresenta um comprometimento ósseo
405 intrínseco (Landim de Barros et al., 2016; Tiyasatkulkovit et al., 2019), e uma resposta
406 inflamatória aumentada (Bonato et al., 2012). Em nosso estudo, observamos
407 diferenças constitutivas no perfil de miRNAs nas mandíbulas desses dois modelos e
408 identificamos três miRNAs com expressão significativamente reduzida no SHR (miR-
409 181a-5p, miR-125a-5p e miR-205). Estudos anteriores já associaram a redução da
410 expressão de miR-181a-5p e miR-205 a um aumento na produção de citocinas, por
411 meio da regulação positiva de HMGB1 (*high mobility group box 1*) (Jiang et al., 2021;
412 Wu et al., 2022), que possui efeitos pró-inflamatórios e já foi descrito no tecido
413 periodontal (Nogueira et al., 2014). Além disso, estudos mostraram que a inibição do
414 miR-125a-5p aumentou a diferenciação de osteoclastos (Sun et al., 2019) e a
415 polarização de macrófagos M1 (He et al., 2021).

416 No grupo SHR Controle, encontramos apenas quatro miRNAs com expressão
417 aumentada em comparação ao grupo Wistar Controle. Dentre esses, o miR-124-3p e
418 miR-92a-2-5p foram previamente associados à inibição da osteogênese *in vitro* (Cao

419 et al., 2021; Wang & Duan, 2022). Por outro lado, o silenciamento do miR-129-5p inibiu
420 a osteogênese das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana, por meio
421 da modulação de Fzd4 (J. Wang et al., 2021). No entanto, esse mesmo miRNA
422 promoveu a osteogênese em células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos
423 em *scaffolds* de hidroxiapatita, através da regulação positiva de Pkia (*cAMP-*
424 *dependent protein kinase inhibitor alpha*) (Deng et al., 2022). Além disso, o miR-129-
425 5p foi associado a efeitos anti-inflamatórios pela inibição de Ddx3x (*DEAD-box*
426 *helicase 3 X-linked*) e Hmgb1 (Cheng et al., 2022; Xiao et al., 2019). É interessante
427 notar que o miR-672-5p não foi previamente associado à homeostase periodontal,
428 mas estudos demonstraram seu efeito na promoção da osteogênese *in vitro* e na
429 prevenção da osteopenia induzida por ovariectomia (Ahmad et al., 2019), além de
430 seus efeitos anti-inflamatórios durante o reparo de lesões na medula espinhal (Zhou
431 et al., 2022).

432 Com base na análise de enriquecimento, previu-se um aumento na sinalização
433 de FoxO no grupo SHR Controle em comparação ao grupo Wistar Controle, uma via
434 *downstream* da via de MAPK, e associada a vários processos celulares, como
435 metabolismo, resposta ao estresse oxidativo e apoptose (Eijkelenboom & Burgering,
436 2013), alguns dos quais também foram observados nos resultados de enriquecimento
437 de GO. A regulação positiva do FoxO já foi associada ao aumento da massa óssea e
438 à inibição da osteoclastogênese (Ambrogini et al., 2010; Tan et al., 2015). Além disso,
439 a via FoxO medeia a resposta dos osteoblastos a espécies reativas de oxigênio,
440 desviando a β -catenina da via canônica de Wnt e inibindo a osteogênese (Almeida et
441 al., 2007).

442 Das vias previstas como negativamente reguladas, identificamos os SNAREs
443 (*soluble NSF attachment protein receptors*), que são expressos nos tecidos

444 periodontais, embora foram principalmente associados à inervação da polpa dental
445 (Honma et al., 2010). Esses componentes são importantes nas vias secretórias e já
446 foram propostos como possíveis alvos terapêuticos para doenças inflamatórias
447 (Collins et al., 2015; Woska & Gillespie, 2012). Embora o papel dos SNAREs na
448 homeostase óssea não tenha sido amplamente estudado, eles desempenham um
449 papel importante na comunicação célula-célula e na secreção da matriz extracelular
450 em osteoblastos (Kawai et al., 2017; Prele et al., 2003) e atividade de osteoclastos
451 (Zhao et al., 2008). Estudos adicionais são necessários para entender o papel
452 específico do FoxO e dos SNAREs na homeostase óssea alveolar, mas nossos dados
453 sugerem uma regulação mediada por miRNA desses componentes no SHR, o que
454 pode estar relacionado a maior susceptibilidade destes animais a prejuízos
455 periodontais.

456 Em seguida, avaliamos o perfil de DEmiRs em ratos Wistar e SHR após a
457 indução da DP e notamos um padrão de expressão de miRNA distinto entre os dois
458 modelos. Em particular, observamos uma expressão elevada do miR-125a-5p nas
459 mandíbulas, mas com *downregulação* nos Wistar com DP e *upregulação* nos SHR
460 com DP. Estudos anteriores demonstraram que a inibição do miR-125a-5p resulta no
461 aumento da osteoclastogênese em células RAW 264.7 (monócitos de medula de
462 camundongos), através da regulação positiva do receptor de TNF (TNFRSF1B, *TNF*
463 *receptor superfamily member 1B*) (Sun et al., 2019). Além disso, o aumento da
464 expressão do miR-125a-5p induzido pelo estresse oxidativo inibiu a diferenciação
465 osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano
466 (Ye et al., 2021). Esses achados são consistentes com estudos que associaram o
467 miR-125a-5p à inflamação gengival (Stoecklin-Wasmer et al., 2012) e à sua
468 *upregulação* no ligamento periodontal de pacientes submetidos a tratamento

469 ortodôntico, sugerindo seu papel na polarização de macrófagos M2 in vitro e no
470 processo de reparo tecidual (He et al., 2021).

471 De maneira interessante, nenhum miRNA upregulado foi compartilhado entre
472 as comparações nos ratos Wistar e SHR com DP, enquanto apenas cinco miRNAs
473 foram inibidos em ambos os modelos (miR-206-3p, miR-133ab-3p, miR-133a-5p e
474 miR-1-3p), os quais também apresentaram uma diferença significativa de *fold change*.
475 O miR-206-3p já foi amplamente associado ao tecido muscular esquelético, mas sua
476 relação com a DP ainda não foi explorada. No entanto, estudos demonstraram que o
477 silenciamento do miR-206-3p in vitro inibiu a osteogênese em células
478 osteoprogenitoras da mandíbula de camundongos, através da modulação de Wtn3,
479 além de aumentar a osteoclastogênese em células RAW 264.7, por meio da
480 modulação de NFATc1 (Guo et al., 2021). Além disso, a inibição in vivo do miR-1-3p
481 (que pertence à mesma família do miR-206-3p) resultou na redução da densidade
482 mineral óssea e aumento do número de células TRAP-positivas nos fêmures de
483 camundongos (Gu et al., 2020). Esses achados sugerem um potencial papel desses
484 miRNAs na regulação da homeostase óssea e podem contribuir para melhor
485 compreensão da DP no modelo SHR.

486 A família do miR-133 (incluindo o miR-133-ab-3p) foi demonstrada como
487 moduladora direta do gene Runx2 (Zhang et al., 2011), sendo considerada um
488 regulador negativo da osteogênese, além de apresentar um efeito pró-
489 osteoclastogênico (Li et al., 2018). De maneira interessante, estudos mostraram que
490 a família miR-133 é *upregulada* no fêmur, mas *downregulada* na mandíbula de
491 camundongas com osteoporose induzida por ovariectomia (An et al., 2014; Hao et al.,
492 2016). Além disso, o silenciamento do miR-133a inibiu a osteogênese em células
493 MCT3T (osteoblastos de calvaria de camundongo) e aumentou a osteoclastogênese

494 em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (Zhou et al., 2021). A
495 função do miR-133 na homeostase óssea a partir de relatos da literatura ainda é
496 conflitante mas, até o momento, não foram estabelecidas associações diretas entre
497 esse miRNA e a DP. Nossos dados sugerem a possível participação desses miRNAs
498 na perda óssea alveolar, o que ressalta a necessidade de investigações adicionais
499 para compreender seu papel nesse contexto específico.

500 A análise de enriquecimento de vias previstas revelou algumas diferenças
501 interessantes entre os ratos Wistar e SHR com DP. Foi observado que a sinalização
502 do FoxO seria downregulada nos dois modelos, sugerindo um possível mecanismo
503 envolvido na DP. No entanto, foi notável que nos SHR Controle, essa via foi a principal
504 enriquecida como *upregulada*, a partir dos miRNAs downregulados, o que sugere sua
505 participação nos prejuízos periodontais no rato hipertenso, porém estudos adicionais
506 ainda são necessários para melhor compreender melhor a regulação da via FoxO na
507 DP e como os miRNAs podem estar envolvidos nesse processo.

508 Os ratos Wistar com DP apresentaram *upregulação* de vias metabólicas
509 relacionadas à resposta imune, o que não foi observado nos SHR. É importante
510 ressaltar que o grupo Wistar mostrou um número maior de termos enriquecidos,
511 devido à identificação de mais DEmiRs e, conseqüentemente, uma lista maior de
512 genes alvo previstos. Ainda assim, esses dados sugerem que pode haver um controle
513 alterado mediado por miRNA da resposta inflamatória nos ratos SHR com DP.

514 Apesar de não termos encontrado muitos miRNA compartilhados nos Wistar e
515 SHR com DP, é interessante notar que alguns miRNA foram regulados de maneira
516 oposta, como o miR-141-3p, miR-200c-3p e miR-429 (downregulados em Wistar com
517 DP e upregulados em SHR com DP), que foram previamente associados à DP. A
518 superexpressão do miR-141-3p demonstrou ser capaz de reverter parcialmente a

519 inibição da osteogênese induzida por LPS em células do ligamento periodontal
520 humano, por meio da modulação de Ezh2 (Jin et al., 2020; Zhu & Xiong, 2022). Além
521 disso, foi observado que a superexpressão do miR-141-3p preveniu parcialmente a
522 osteopenia induzida por ovariectomia em mandíbulas de ratas (Liu & Guo, 2020). No
523 entanto, em estudos *in vitro* com células mesenquimais humanas derivadas de medula
524 óssea, o miR-141-3p inibiu a osteogênese por meio da modulação de Sirt1 (Zhou et
525 al., 2023).

526 Quanto ao miR-200c-3p, sua superexpressão reduziu a produção de
527 mediadores inflamatórios em fibroblastos gengivais estimulados por LPS e no tecido
528 gengival *in vivo* (Akkouch, Zhu, et al., 2019). Além disso, sua superexpressão foi capaz
529 de reduzir a perda óssea alveolar em ratos, por meio da modulação de IFRD1
530 (Akkouch, Zhu, et al., 2019). Ademais, o miR-429, que pertence à mesma família do
531 miR-200, inibiu a produção de IL-8 em células Ca9-22, por meio da modulação de
532 IKK β (Kawasaki & Amano, 2021). Esses resultados sugerem que os miR-141-3p, miR-
533 200c-3p e miR-429 desempenham papéis complexos na regulação da osteogênese e
534 inflamação na DP, com efeitos divergentes dependendo do contexto celular e das vias
535 de sinalização envolvidas, mas nossos dados reforçam sua relevância na patogênese
536 da DP.

537 De maneira interessante, ao avaliar as interações miRNA-mRNA validadas, os
538 miR-141-3p, miR-200c-3p e miR-429 modulam os fatores de transcrição Zeb 1 e 2
539 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1/2*). Feng et al. (2018) mostraram que a inibição
540 de Zeb2 mediada pelos miR-138 e miR-145 suprimiu a sinalização Wnt/ β -catenina,
541 inibindo a osteogênese *in vitro* de células mesenquimais da medula óssea humana.
542 Além disso, camundongos deficientes de Zeb1 apresentam menor massa óssea,
543 associada a maior atividade de osteoclastos (Zhu et al., 2023). Estas evidências

544 sugerem possíveis mecanismos mediados por miRNAs associados a maior perda
545 óssea nos SHR com DP.

546 O miR-96-5p e o miR-296, que apresentaram regulação oposta nos modelos
547 Wistar e SHR com DP, não foram previamente associados à DP, mas há evidências
548 sobre seus papéis na inflamação e no metabolismo ósseo. O miR-96-5p foi
549 identificado como um supressor tumoral, inibindo a proliferação e migração de células
550 de osteossarcoma *in vitro*, por meio da modulação de SYK (*spleen associated tyrosine*
551 *kinase*) (T. Wang et al., 2021). Estudos em camundongos deficientes de Syk
552 demonstraram um prejuízo na função de osteoclastos, devido à desestabilização do
553 citoesqueleto, resultando em um fenótipo de maior massa óssea (Zou et al., 2007).
554 Entretanto, o silenciamento do miR-96-5p inibiu a osteoclastogênese *in vitro* pela
555 modulação de *Abca1*, enquanto sua superexpressão resultou em um pequeno
556 aumento na formação de osteoclastos (T. Wang et al., 2022). Além disso, o miR-96-
557 5p promoveu a osteogênese em células MC3T3-E1, pela modulação de HBEGF
558 (*heparin binding EGF like growth factor*) e inibição da sinalização de EGFR (*epidermal*
559 *growth factor receptor*) (Yang et al., 2014), assim como a osteogênese de células
560 mesenquimais derivadas de medula óssea humana, pela modulação de PIK3R1
561 (*phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1*) e inibição da sinalização de PI3K-Akt
562 (Li et al., 2020). No entanto, o miR-96-5p foi associado ao comprometimento ósseo
563 no envelhecimento e inibiu a osteogênese de células-tronco mesenquimais de medula
564 óssea humana *in vitro* pela modulação direta de Osterix (Liu et al., 2018). Além disso,
565 níveis circulantes de miR-96-5p em pacientes jovens com escoliose idiopática foram
566 correlacionados com baixa densidade óssea, sugerindo como um biomarcador de
567 prognóstico clínico (Chen et al., 2022).

568 Quanto ao miR-296, sua superexpressão promoveu a osteogênese em células
569 osteoblásticas fetais humanas (Yu et al., 2020) e reverteu a inibição de marcadores
570 de autofagia induzido por alta concentração de flúor em células ameloblásticas (Luo
571 et al., 2022). Além disso, o miR-296 pode ter um efeito anti-inflamatório pela
572 modulação de IKBKE (*inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon*), um
573 ativador da via NF-κB (Patel et al., 2015; Robson et al., 2012). Essas evidências
574 destacam o potencial envolvimento do miR-96-5p e do miR-296 na regulação do
575 metabolismo ósseo e resposta inflamatória, mas é importante ressaltar que essas
576 observações foram feitas em diferentes contextos e modelos experimentais, e o papel
577 específico desses miRNAs na DP ainda precisa ser investigado.

578

579

580 **5. CONCLUSÃO**

581 Nossos resultados destacam um perfil distinto de expressão de miRNAs
582 associado à DP nos ratos SHR. Ademais, a regulação diferencial de vias de
583 sinalização e processos biológicos previstas pode ajudar a explicar a maior
584 reabsorção óssea alveolar induzida pela DP nos animais hipertensos. Ao analisar o
585 osso mandibular, ao invés dos tecidos moles do periodonto, fomos capazes de
586 identificar miRNAs ainda não associados à homeostase ou doença periodontal,
587 possivelmente diretamente relacionados ao metabolismo ósseo na mandíbula, que
588 podem ser de interesse para pesquisas futuras como biomarcadores e alvos
589 terapêuticos.

590

591

- CAPÍTULO 3 -

1 **EFEITO DO HSA-MIR-127-3P NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE**
2 **CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA**
3 **HUMANA**

4

5 Neste **Capítulo 3**, é apresentado o estudo funcional do miR-127-3p na
6 diferenciação osteogênica de células osteoprogenitoras humanas (dados não
7 publicados), realizado no Departamento de Cirurgia Ortopédica, da Faculdade de
8 Medicina da Universidade de Washington em St. Louis, sob supervisão da Professora
9 Titular Audrey McAlinden.

10

11

12 **RESUMO**

13 Os microRNAs (miRNAs) desempenham um importante papel na regulação
14 pós-transcricional da expressão gênica, suprimindo simultaneamente a expressão de
15 múltiplos RNAs mensageiros (mRNAs) e afetando vários processos celulares. A
16 regulação da diferenciação osteogênica é essencial para a manutenção da
17 homeostase óssea, que pode ser comprometida por desordens de diferentes
18 naturezas. O miR-127-3p foi anteriormente associado a condições de perda óssea,
19 mas seus mecanismos na diferenciação osteogênica ainda não foram completamente
20 elucidados. Portanto, nosso objetivo foi investigar os efeitos do silenciamento e
21 superexpressão do miR-127-3p na diferenciação de células-tronco mesenquimais da
22 medula óssea humana (hCTM), por meio da transfecção de um inibidor e mimico de
23 miRNA. Nossos resultados demonstraram que o silenciamento do miR-127-3p não
24 afetou a osteogênese *in vitro*, enquanto sua superexpressão inibiu significativamente
25 a diferenciação e mineralização da matriz extracelular. Esta resposta foi parcialmente
26 explicada pelo efeito antiproliferativo do miR-127-3p, além da redução na expressão
27 de *Osx* e *Bsp*, possivelmente afetando o comprometimento fenotípico e a deposição
28 mineral.

29

30

31 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

32 O tecido ósseo desempenha importantes funções mecânicas, metabólicas,
33 endócrinas e hematopoiéticas, e sua integridade é mantida através da contínua
34 remodelação, pela atividade coordenada de osteoblastos e osteoclastos (Burr & Allen,
35 2019). Os osteoblastos, especificamente, são as células responsáveis pela formação
36 óssea, realizando a deposição e mineralização da matriz orgânica, o que é regulado
37 por diferentes fatores locais e sistêmico (Siddiqui & Partridge, 2016).

38 A regulação da expressão gênica é determinante para a dinâmica do tecido
39 ósseo, e no controle da diferenciação de células osteoprogenitoras, incluindo o
40 comprometimento fenotípico, além da manutenção de osteoblastos maduros. Os
41 microRNAs (miRNAs) funcionam como reguladores epigenéticos da expressão gênica
42 a nível pós-transcricional, e já foram relacionados homeostase e desordens do tecido
43 ósseo (Hensley & McAlinden, 2021).

44 Resumidamente, miRNA primários são transcritos a partir do DNA e
45 processados ainda no núcleo em miRNAs precursores (pre-miRNAs), que são então
46 transportados ao citoplasma onde são processados em miRNAs maduros de fita
47 dupla. Uma das fitas (5p ou 3p) associa-se ao complexo de silenciamento induzido
48 por RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*) e, por complementariedade da
49 sequência *seed* (7-8 nucleotídeos na região 5' do miRNA), interagem com a região 3'-
50 UTR (*untranslated region*) de RNAs mensageiros (mRNAs), resultando na degradação
51 do mRNA ou na inibição da tradução proteica (Treiber et al., 2012).

52 Devido a sua sequência curta, os miRNAs podem reconhecer diferentes
53 mRNAs e induzir efeitos associados a múltiplas vias celulares (Bartel, 2009). Os
54 avanços nas tecnologias para identificar e modular sua expressão *in vitro* e *in vivo*
55 tornaram os miRNAs uma opção atraentes para biomarcadores e alvos terapêuticos

56 (Chakraborty et al., 2017; Hadjiargyrou & Komatsu, 2019; Komatsu et al., 2021), e
57 desta forma, a caracterização funcional de miRNAs é de grande relevância.

58 Em nosso estudo anterior, descrevemos o perfil de miRNAs associados a perda
59 óssea alveolar induzida pela doença periodontal em mandíbulas de ratos, revelando
60 novos miRNAs potencialmente envolvidos no metabolismo ósseo (capítulo 2 desta
61 tese, dados não publicados). Para o presente estudo, selecionamos entre os miRNAs
62 diferencialmente expressos aqueles que apresentavam sequência homóloga entre
63 ratos e humanos e cuja função no metabolismo ósseo não havia sido extensivamente
64 estudada. O miR-127-3p chamou atenção, pois foi inibido após indução de doença
65 periodontal em ratos normotensos, mas não em ratos hipertensos. Além disso, An et
66 al. (2014) demonstraram que o aumento da expressão plasmática deste miRNA
67 estava associado a osteoporose por deficiência de estrogênio, e a superexpressão do
68 pre-mir-127 inibiu a fosfatase alcalina in vitro, sugerindo um efeito anti osteogênico.
69 Entretanto, os mecanismos de ação do miR-127-3p na diferenciação osteogênica e
70 efeitos na mineralização de matriz não foram esclarecidos.

71 O objetivo deste estudo foi então avaliar a função do miR-127-3p na
72 diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula
73 óssea humana (hCTM), e explorar os mecanismos relacionados ao seu efeito.

74

75

76 2. MATERIAL E MÉTODOS

77

78 2.1. Cultura primária de células-tronco mesenquimais derivadas da medula 79 óssea humana (hCTM)

80 Três linhagens de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
81 humana (hCTM) de doadores do sexo masculino com idades entre 22 e 25 anos foram
82 adquiridas (Lonza Biosciences; Walkersville, MD, EUA). As células foram expandidas
83 em meio de cultura [DMEM baixa glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino
84 (SFB), L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 50 I.U./mL e fator de crescimento
85 básico de fibroblasto (bFGF) 1 ng/ml].

86

87 2.2. Indução da diferenciação osteogênica

88 Para os ensaios de diferenciação osteogênica, as hCTMs foram semeadas em
89 placas de 24 poços a 100000 células/poço, e após 24 horas a osteogênese foi
90 induzida pela adição do meio osteogênico (α MEM suplementado com 10% de SFB,
91 L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 50 I.U./mL, ácido ascórbico 2-fosfato 50
92 μ M, β -glicerofosfato 10 mM e dexametasona 10 nM), mantido por 10 dias. A
93 diferenciação foi avaliada por coloração de fosfatase alcalina (ALP) no dia 7
94 (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, #86C; Sigma Aldrich; St Louis, MO, EUA) e
95 mineralização da matriz no dia 10 (Alizarin Red S Staining Kit, #0223; ScienCell
96 Research Laboratories; Carlsbad, CA, EUA).

97

98 2.3. Silenciamento e superexpressão do hsa-miR-127-3p

99 Para superexpressar o miR-127-3p, as hCTM foram semeadas conforme
100 descrito e, após 24 horas, as culturas foram transfectadas com 30 nM do miRNA

101 mimico mirVana® (#4464066; ID MC10400) ou Controle Negativo do Mimico
102 (#4464058). Para o silenciamento do miRNA, as hCTM foram transfectadas com 30
103 nM do inibidor de miRNA mirVana® (#4464084; ID MH10400) ou Controle Negativo
104 do Inibidor (#4464076), utilizando o reagente de transfecção Lipofectamin RNAiMAX
105 (Invitrogen, #13778075), seguindo as instruções do fabricante. Após 24 horas, o meio
106 osteogênico foi adicionado e mantido por 10 dias. O protocolo de transfecção foi
107 determinado por um teste de concentração-resposta.

108

109 **2.4. Análise da expressão do hsa-miR-127-3p**

110 O RNA total foi isolado usando o Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp,
111 #17200; Thorold, ON, Canadá), e a concentração de RNA foi determinada usando o
112 equipamento NonoDrop™ (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). Para avaliar
113 a expressão do miRNA, foram utilizados 25 ng de RNA total para síntese do DNA
114 complementar, com o TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied
115 Biosystems, #4366596; Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA), seguido da
116 reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), usando o TaqMan™
117 Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4304437) e os ensaios para hsa-
118 miR-127-3p (#000452) e Snord44 (#001094), seguindo as instruções do fabricante. A
119 expressão relativa do miRNA alvo foi determinada pelo método de Ct comparativo,
120 utilizando o *Snord44* como gene constitutivo, e o grupo controle como referência.

121

122 **2.5. Análise de proliferação celular**

123 Para avaliar a proliferação celular, as hCTM foram semeadas em placas de 96
124 poços a 10000 células/poço, transfectadas com o 30 nM do miR-127-3p mimico,
125 inibidor ou respectivos controles negativos. Após 20 horas, o meio de cultura foi

126 substituído pelo meio osteogênico e a proliferação celular foi medida nos dias 0, 3, 7
127 e 10 pelo ensaio de incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), com o BrdU Cell
128 Proliferation ELISA Kit (Abcam ab126556), seguindo o protocolo do fabricante. Os
129 dados foram obtidos (densidade óptica) em um espectrofotômetro a 450 nm.

130

131 **2.6. Análise da viabilidade celular**

132 Para avaliar a viabilidade celular, as hCTM foram semeadas em placas de 96
133 poços, conforme descrito acima, e a viabilidade celular foi medida nos dias 0, 3, 7 e
134 10 utilizando o ensaio de captação de vermelho neutro (Borenfreund & Puerner, 1985).
135 Resumidamente, o meio de cultura foi substituído por 0,2 mL de solução de vermelho
136 neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) (50 µg/mL em meio de
137 cultura sem SFB) e incubado por 2 horas. O sobrenadante foi removido, os poços
138 foram lavados com formalina neutra tamponada a 4%, o corante foi extraído (0,3 mL
139 de solução de ácido acético glacial a 1% e 50% de metanol), e os dados foram obtidos
140 (densidade óptica) em um espectrofotômetro a 540 nm.

141

142 **2.7. Análise do citoesqueleto de actina**

143 Para analisar os filamentos de F-actina intracelulares, hCTM foram semeadas
144 em câmara de 8 poços (#354118; Corning, NY, EUA) em duas densidades: Densidade
145 regular (usada para ensaios de osteogênese) 43000 células/poço, ou em baixa
146 densidade (para permitir melhor visualização de células) 5000 células/poço. As células
147 foram transfectadas com o miR-127-3p mimico ou o controle negativo, como descrito,
148 e mantidas em meio osteogênico por 3 e 7 dias (densidade regular), ou 72 horas em
149 meio controle (baixa densidade). As células foram fixadas com formalina neutra
150 tamponada a 4% por 30 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS

151 por 5 minutos, incubadas com BSA a 1% em PBS por 20 minutos e marcadas com o
 152 reagente Phalloidin-iFluor 488 (Abcam, #ab176753; Cambridge, Reino Unido) por 1
 153 hora. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, preparadas com um meio de
 154 montagem aquoso contendo DAPI e as imagens foram realizadas em microscópio de
 155 fluorescência (excitação 493 nm e emissão 517 nm).

156

157 **2.8. Análise da expressão gênica de marcadores osteogênicos**

158 O RNA total foi isolado e quantificado como descrito anteriormente, e para
 159 síntese do cDNA, 300 ng foram utilizados para síntese do cDNA com o High-Capacity
 160 cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, #4368814), seguindo as
 161 instruções do fabricante. A qPCR foi realizada usando o SYBR™ Green PCR Master
 162 Mix (Applied Biosystems, #4309155), com os seguintes primers: fator de transcrição
 163 2 relacionado a runt (*Runx2*; fwd: CATCACTGTCCTTTGGGAGTAG, rev:
 164 ATGTCAAAGGCTGTCTGTAGG), fator de transcrição Sp7/Osterix (*Osx*; fwd:
 165 CCTCTGCGGGACTCAACAAC, rev: TAAAGGGGGCTGGATAAGCAT), colágeno
 166 tipo I alfa 1 (*Col1a1*; fwd: GGCAATAGCAGGTTACGTACA, rev:
 167 CGATAACAGTCTTGCCCCACTT), Osteopontina (*Opn*; fwd:
 168 CATATGATGGCCGAGGTGATAG , rev: AGGTGATGTCCTCGTCTGTA),
 169 Osteocalcina (*Ocn*; fwd: AGGAGGGCAGCGAGGTAG, rev: GAAAGCCGATGTGGT
 170 CAGC), Sialoproteína óssea (*Bsp*; fwd: TGCTACAACACTGGGCTATGGA, rev: CTC
 171 TTGGGAAGCTGGATTGC), e prolil isomerase (*Ppia*, fwd: TCCTGGC
 172 ATCTTGTCCATG, rev: CCATCCAACCACTCAGTCTTG). A expressão relativa dos
 173 alvos foi determinada pelo método de Ct comparativo, utilizando *Ppia* como gene
 174 constitutivo, e o grupo controle como referência.

175

176 **2.9. Análise da expressão proteica BCL6 por western blot**

177 Para coleta das amostras de proteína, as hCTM foram semeadas em placas de
178 6 poços, e os tratamento foram conduzidos respeitando as proporções dos
179 experimentos anteriores. Os lisados foram preparados com tampão RIPA (Cell
180 Signaling Technology, #9806; Danvers, MA, EUA) suplementado com inibidores de
181 protease (cOmplet®; Roche Diagnostics, #11697498001; Mannheim, Alemanha) e a
182 concentração de proteínas foi determinada por ensaio de Bradford (Bio-Rad Protein
183 Assay kit, #500000; Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, EUA). As amostras (20 mg
184 de proteína) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil
185 sulfato e transferidas para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF). As
186 membranas foram bloqueadas com o Intercept (TBS) Blocking Buffer (LI-COR
187 Biosciences, #927-60001; Lincoln, NE, EUA), e os western blots foram realizados com
188 os anticorpos primários anti- β -actina (1:50000; ABclonal, #AC026; Wuhan, Hubei,
189 China) e anti-BCL6 (1:500; ABclonal, #A7173), e anticorpo secundário conjugados a
190 fluoróforo (1:10000; IRDye® 680RD; LI-COR Biosciences, #926-68071). As bandas
191 foram digitalizadas no sistema de imagem LI-COR Odyssey Imager (LI-COR
192 Biosciences) e quantificadas no software Fiji (Schindelin et al., 2012). A quantidade
193 da proteína alvo foi normalizada com β -actina, e os dados expressos como fold-
194 change em relação ao grupo controle.

195

196 **2.10. Análise estatística**

197 Foram conduzidos três experimentos independentes (hCTM de diferentes
198 doadores) e a replicatas mostraram o mesmo perfil de resposta. Os dados
199 representativos são apresentados como médias \pm desvio padrão de um experimento
200 (n=3). A distribuição normal dos dados foi analisada com teste de Shapiro-Wilk, e as

201 diferenças estatísticas foram determinadas por teste ANOVA de um fator, seguido de
202 teste post hoc de Dunnett, no GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San
203 Diego, CA, EUA). As diferenças significativas são apresentadas como *p < 0,05; **p <
204 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

205

206

207 **3. RESULTADOS**

208

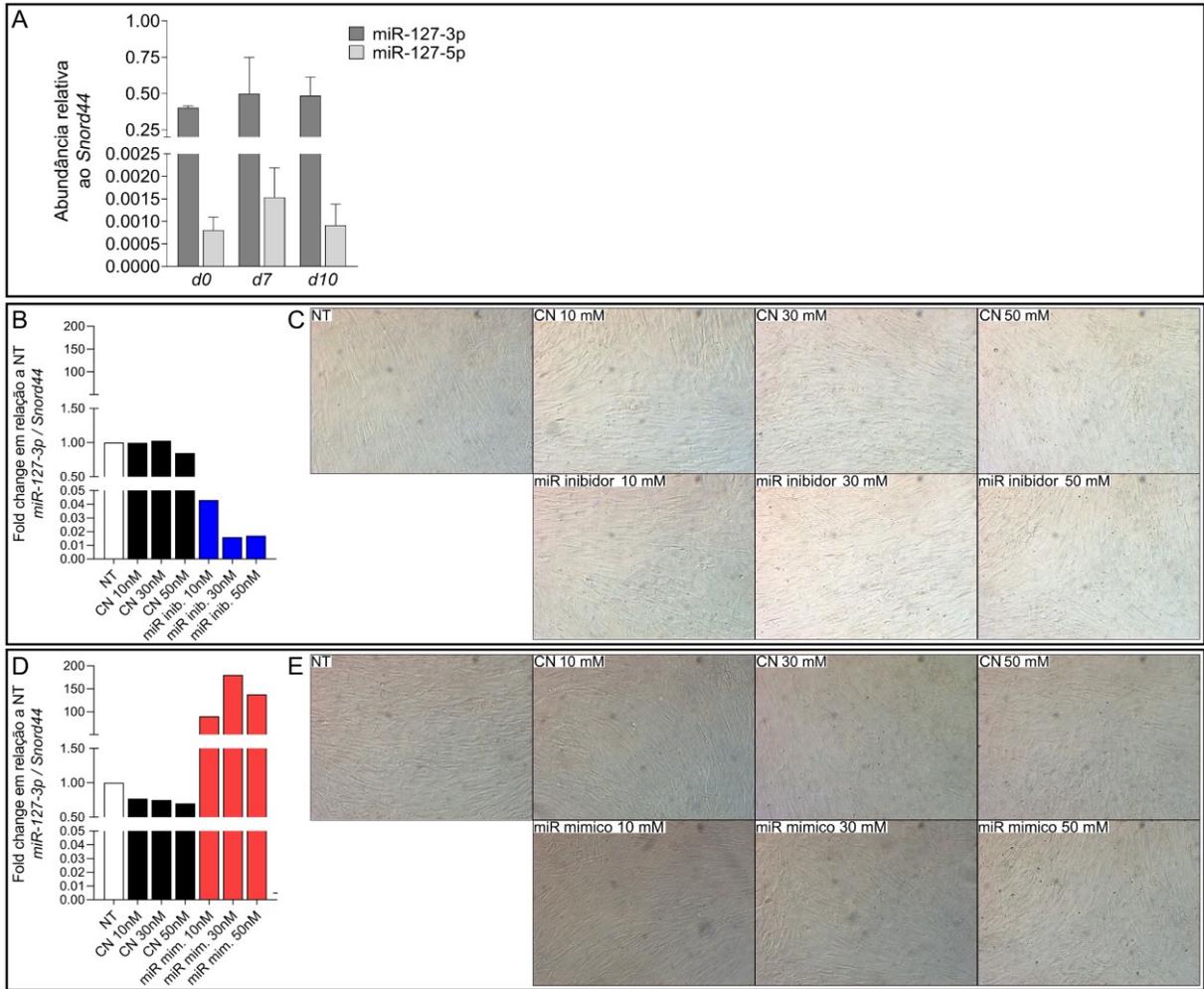
209 **3.1. A expressão do miR-127-3p não é modulada durante a diferenciação** 210 **osteogênica**

211 Inicialmente validamos a expressão endógena do hsa-miR-127-3p e 5p durante
212 a osteogênese de hCTM *in vitro*. Como esperado, a abundância do miR-127-3p, em
213 relação ao controle endógeno *Snord44*, foi significativamente maior do que a do miR-
214 127-5p (Figura 3-1A). Porém, não observamos diferenças significativa ao longo da
215 diferenciação.

216 Posteriormente, para determinar o protocolo de transfecção do mimico/inibidor
217 de miRNA, testamos diferentes concentrações destes no modelo proposto. A
218 concentração de 30 nM apresentou a maior inibição ou superexpressão, enquanto os
219 controles negativos não alteraram a expressão basal do miRNA de interesse (Figura
220 3-1B e D). Além disso, os reagentes de transfecção não causaram alterações
221 significativas na morfologia celular (Figura 3-1C e E).

222

223



224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

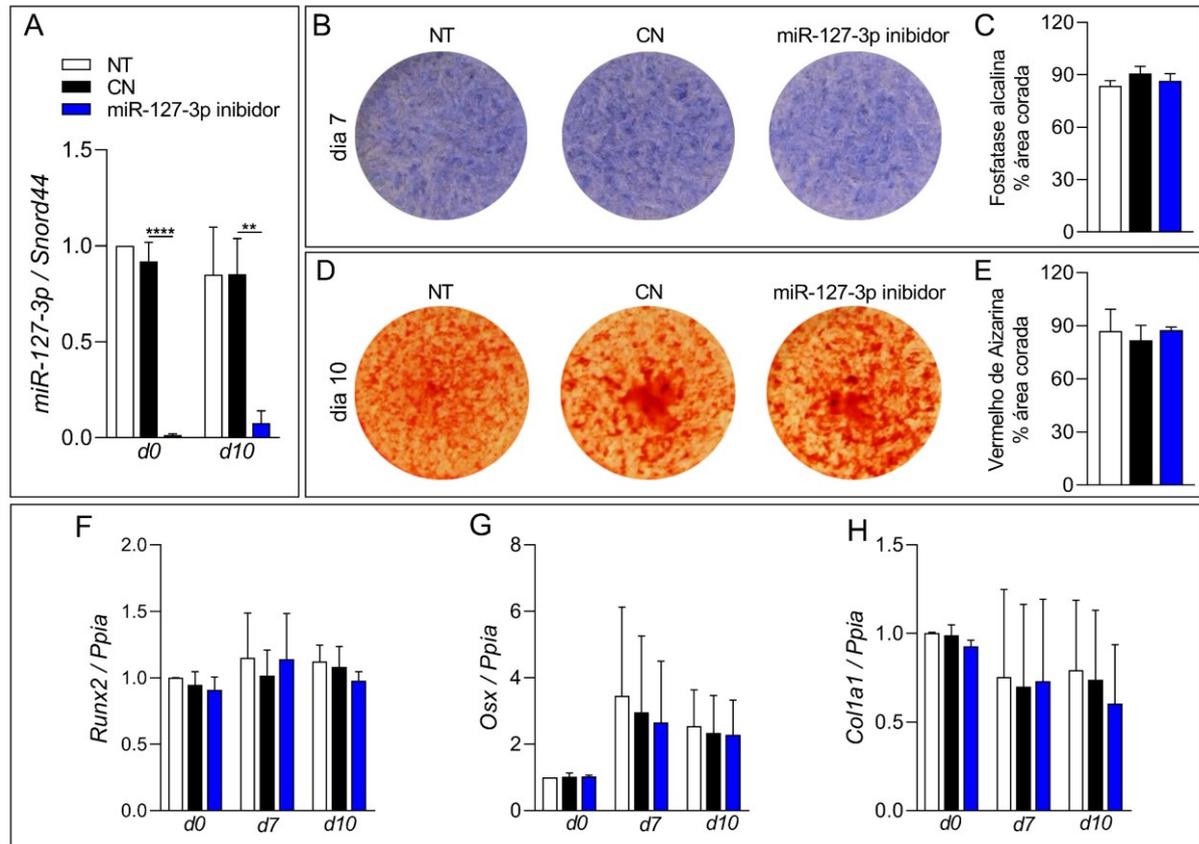
Figura 3- 1. Expressão do miR-127-3p e miR-127-5p in vitro. (A) RT-qPCR do miR-127-3p e miR-127-5p nos dias 0, 7 e 10 da diferenciação osteogênica de hCTM; gráfico representa a média±SD da abundância relativa ao Snord44 (n=3). (B-C) Silenciamento do miR-127-3p com diferentes concentrações do inibidor e imagens representativas das culturas 48 horas após a transfecção (n=1); (D-E) Superexpressão do miR-127-3p com diferentes concentrações do mímico e imagens representativas das culturas 48 horas após a transfecção (n=1).

235 **3.2. Silenciamento do miR-127-3p não afetou a osteogênese em hCTM**

236 O silenciamento do miR-127-3p foi confirmado ao longo da diferenciação
237 (Figura 3-3A), porém não observamos diferenças na coloração de fosfatase alcalina
238 (Figura 3-3B e C), ou na mineralização (Figura 3-2D e E), comparado ao controle
239 negativo (CN). A expressão gênica dos marcadores osteogênicos Runx2, Osx e
240 Col1a1 também não foi alterada pelo silenciamento do miR-127-3p (Figura 3-2F, G e
241 H). Esses dados sugerem que a inibição do miR-127-3p não afeta significativamente
242 a diferenciação osteogênica, embora não possamos descartar um possível efeito em
243 modelo *in vitro* diferente ou mesmo um possível efeito *in vivo*.

244

245



246

247

248

249 **Figura 3- 2. Silenciamento do miR-127-3p durante a osteogênese de hCTM.** (A)

250 RT-qPCR para miR-127-3p, (B-C) Coloração de fosfatase alcalina e quantificação da

251 área corada no dia 7; (D-E) Coloração de Vermelho de Alizarina e quantificação da

252 área corada no dia 10; RT-qPCR para (F) Runx2, (G) Osx e (H) Col1a1 durante a

253 osteogênese de hCTM. Gráficos representam a média \pm SD (n=3) e diferenças

254 estatísticas são indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001,

255 comparando NT (não transfectado) vs. CN (controle negativo) e NC vs. inibidor.

256

256

257 **3.3. Superexpressão do miR-127-3p inibe a mineralização de hCTM**

258 Em seguida, o miR-127-3p foi superexpresso em hCTM ao longo da
259 osteogênese (Figura 3-3A) e observamos uma redução significativa na coloração de
260 fosfatase alcalina no dia 7 (Figura 3-3B e C) e na mineralização no dia 10 (Figura 3-
261 3D e E), comparado ao CN, sugerindo um efeito inibitório na osteogênese de hCTM.

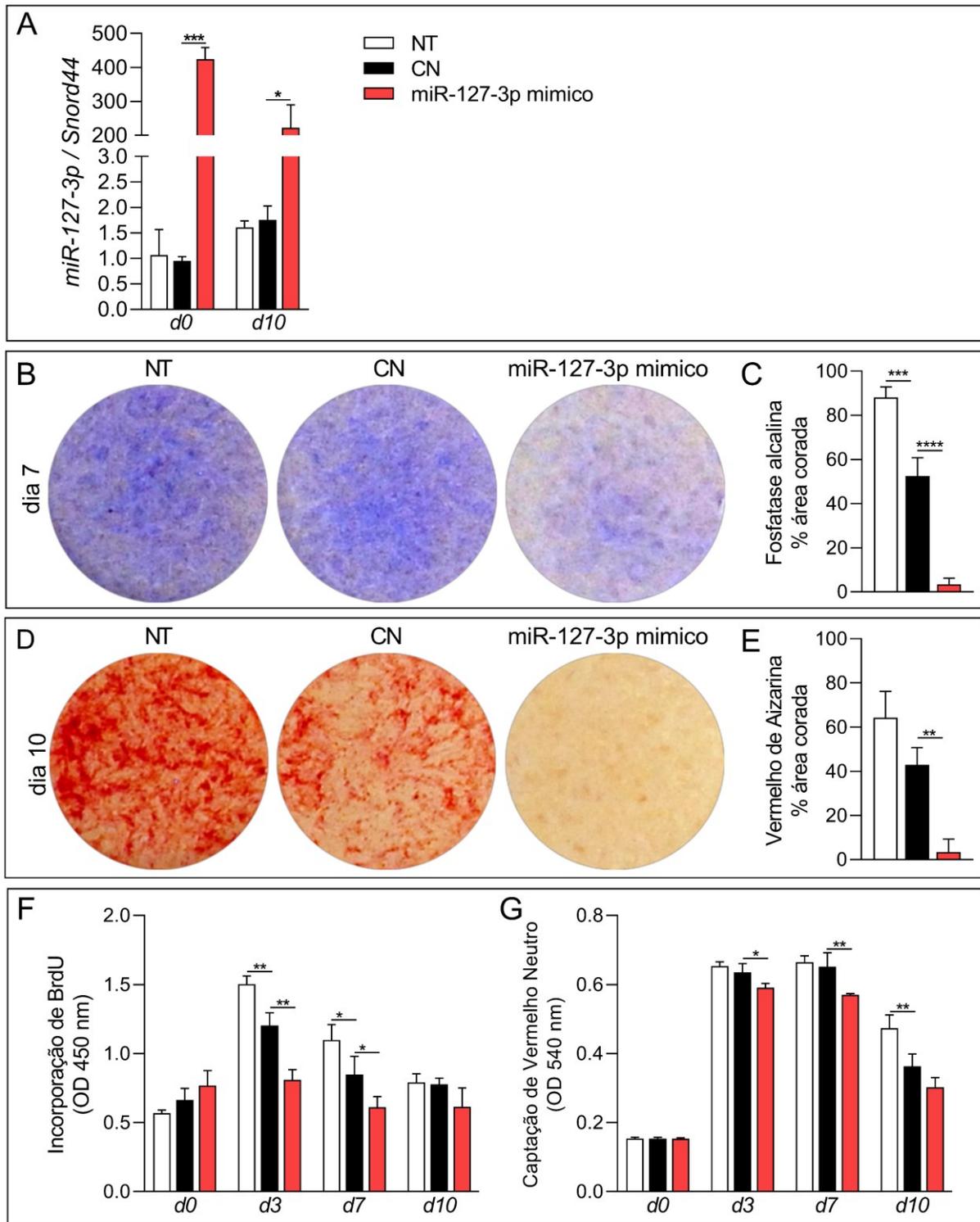
262

263 **3.4. Efeito do hsa-miR-127-3p na proliferação celular**

264 Ao observar a inibição da osteogênese, avaliamos um possível efeito do miR-
265 127-3p na proliferação e viabilidade celular, que pudesse explicar esta resposta. O
266 ensaio de incorporação de BrdU mostrou uma redução da proliferação, mais evidente
267 nos dias 3 e 7 (Figura 3-3F), o que poderia explicar, em parte, os efeitos observados
268 na fosfatase alcalina e mineralização. Também analisamos a viabilidade celular pelo
269 ensaio de captação de vermelho neutro, e que mostrou reduções significativas nos
270 dias 3 e 7 no grupo miR-1227-3p mimico, comparado ao CN (Figura 3-3G), o que
271 provavelmente reflete a menor proliferação observada neste grupo (Figura 3-3G).

272

273



274

275

276

277

278

279

280

281

282

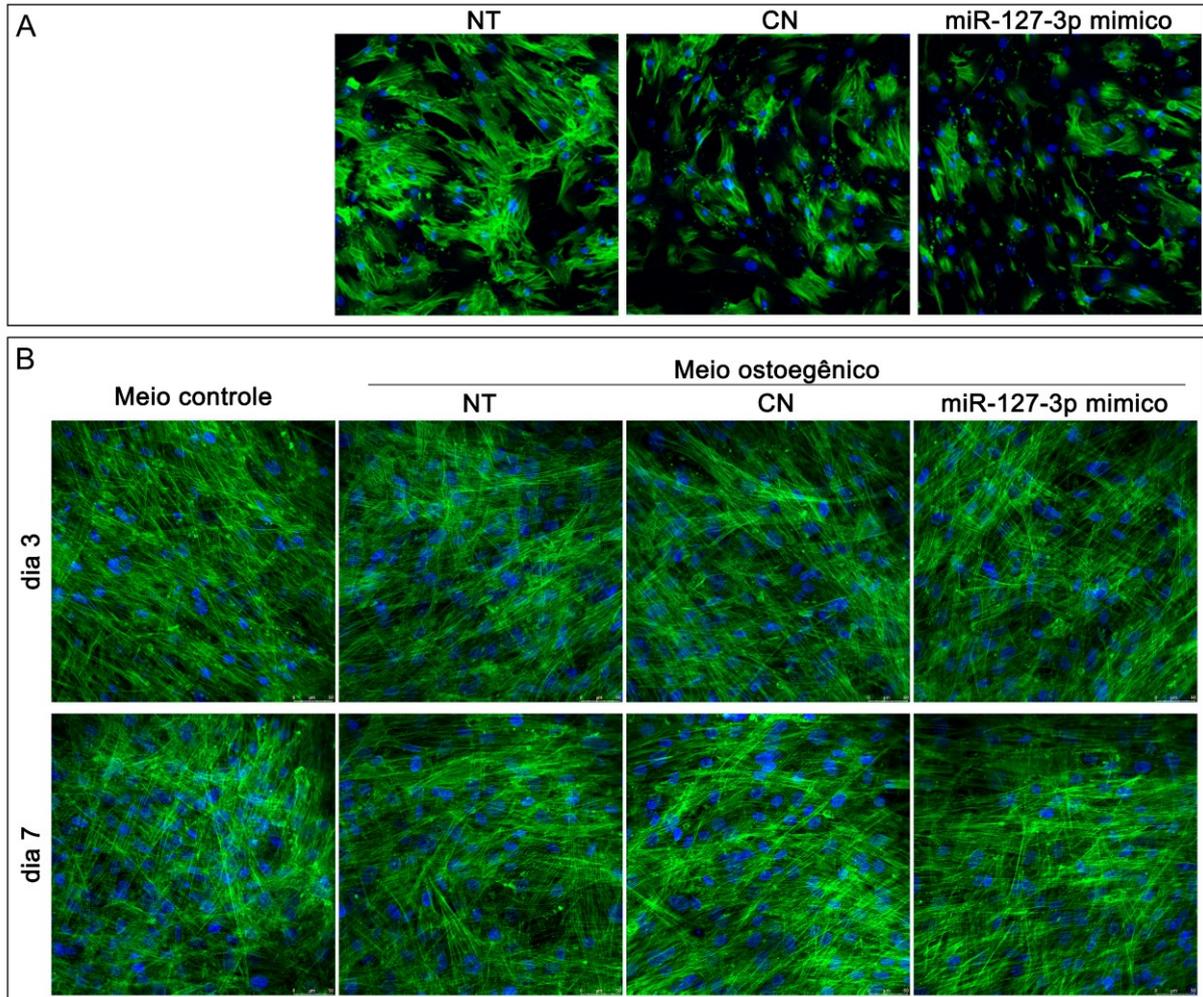
Figura 3- 3. Superexpressão do miR-127-3p durante a osteogênese de hCTM. (a) RT-qPCR para miR-127-3p, (B-C) Coloração de fosfatase alcalina e quantificação da área corada no dia 7; (D-E) Coloração de Vermelho de Alizarina e quantificação da área corada no dia 10; (F) Incorporação de BrdU e (G) captação de vermelho neutro em hCTM ao longo da diferenciação. Gráficos representam a média \pm SD (n=3) e diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, comparando NT (não transfectado) vs. CN (controle negativo) e NC vs. inibidor.

283 **3.5. Superexpressão do miR-127-3p não afeta a organização do citoesqueleto**
284 **em hCTM**

285 Para investigar o efeito do miR-127-3p na organização do citoesqueleto
286 realizamos a marcação com faloidina. Nas hCTMs em baixa densidade não
287 identificamos alterações significativas na distribuição de F-actina 72 horas pós-
288 transfecção (Figura 3-4A). Também realizamos a análise em densidade regular nos
289 dias 3 e 7, para evidenciar um possível efeito durante a osteogênese (Figura 3-4b).
290 Novamente não observamos diferenças significativas que pudessem explicar a
291 inibição na mineralização, sugerindo que, apesar de inibir a proliferação celular, o miR-
292 127-3p não altera a organização de F-actina neste modelo.

293

294



295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

Figura 3- 4. Marcação de F-actina em hCTM com superexpressão do miR-127-3p. (a) hCTM em baixa densidade em meio controle 72 horas após a transfecção. (b) hCTM em densidade regular, transfectadas com o mimico do miR-127-3p, nos dias 3 e 7 da diferenciação osteogênica. Imagens de fluorescência verde (F-actina) e azul (núcleos celulares) representativas dos grupos. NT (não transfectado), CN (controle negativo).

304

305 **3.6. Superexpressão do miR-127-3p altera a expressão de marcadores**
306 **osteogênicos**

307 Para melhor compreender os efeitos do miR-127-3p na inibição da osteogênese
308 em hCTMs, analisamos a expressão gênica de marcadores osteogênicos por RT-
309 qPCR (Figura 3-5). O miR-127-3p levou a uma pequena redução de *Runx2* nos dias
310 0 e 7, mas observamos uma redução significativa de *Osx*, nos dias 7 e 10 (Figura 3-
311 5a e 3-1b), comparado ao CN. A expressão de *Col1a1* não teve alteração significativa
312 (Figura 3-5c) e observamos um pequeno aumento na expressão de *Opn* e *Ocn* (Figura
313 3-5d e 3-1e). A expressão de *Bsp*, entretanto, foi significativamente reduzida nos dias
314 7 e 10 (Figura 3-5f).

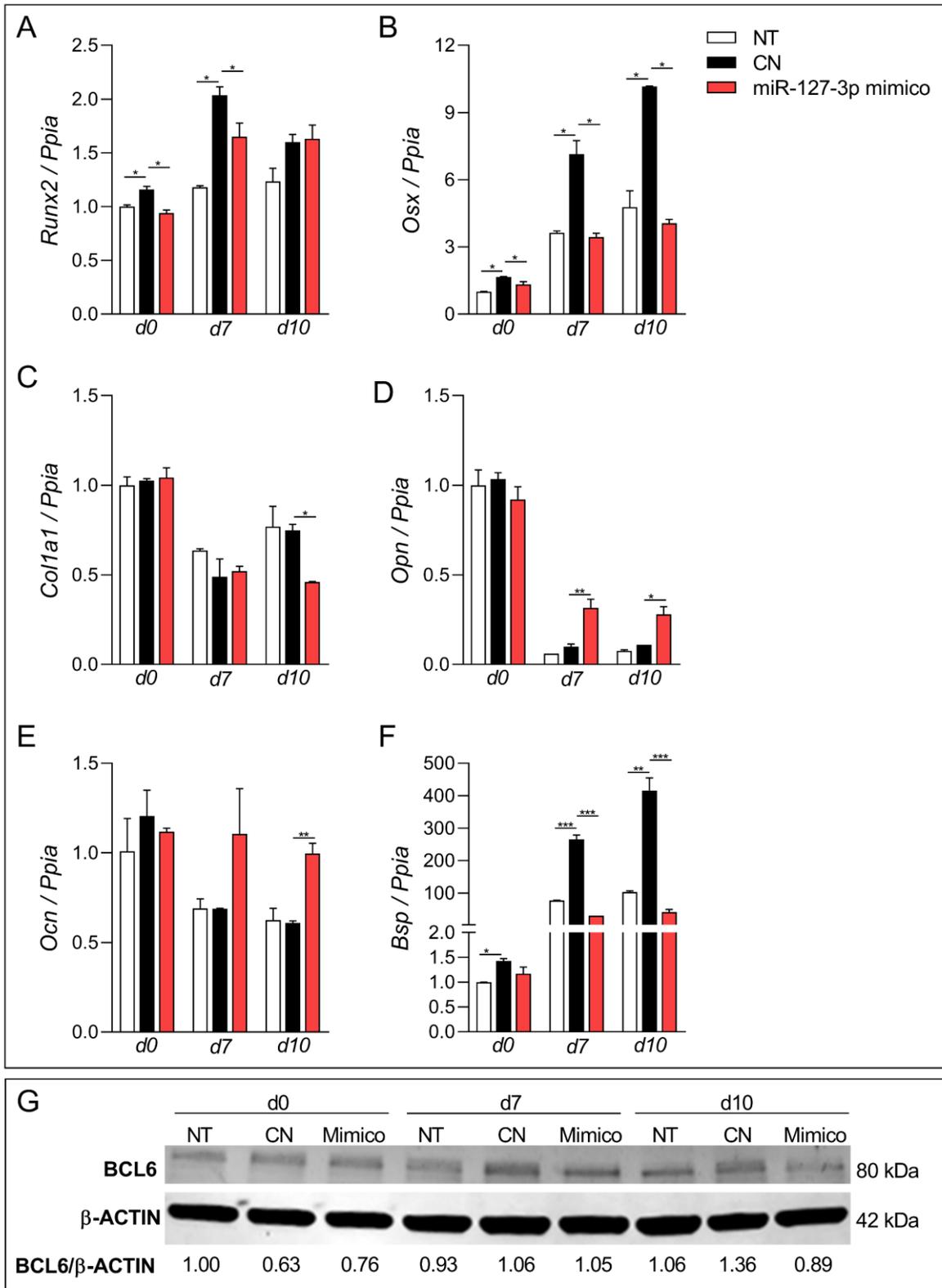
315

316 **3.7. BCL6 não está envolvida nos efeitos do miR-127-3p na osteogênese de**
317 **hCTM**

318 Avaliamos a expressão da proteína BCL6, por ser um dos alvos validados do
319 miR-127-3p, com o objetivo de identificar o mecanismo de ação deste miRNA no
320 modelo proposto. Não observamos alterações significativas na expressão de BCL6
321 durante a diferenciação de hCTM (grupo não transfectado), ou com a superexpressão
322 do miR-127-3p (Figura 3-5H). Apesar de observarmos uma pequena redução de BCL6
323 no dia 10, sua expressão se manteve inalterada nos dias 0 e 7, sugerindo não ser esta
324 a principal via regulada pelo miR-127-3p.

325

326



327
328
329
330
331
332
333

Figura 3- 5. Expressão gênica de marcadores osteogênicos e BCL6 durante osteogênese de hCTM. RT-qPCR para (A) Runx2, (B) Osx, (C) Col1a1, (D) Opn, (E) Ocn e (F) Bsp. Gráficos representam a médias ± SD (n=3) e as diferenças são indicadas como *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001, comparando NT vs. CN e CN vs. mimico. (H) BCL6 normalizado por β-actina, relativo ao d0-NT; Representativo de três experimentos independentes.

334 4. DISCUSSÃO

335 Neste estudo, nosso objetivo foi estudar o efeito do miR-127-3p na
336 osteogênese *in vitro* de hCTM, tendo este sido identificado em estudos anteriores
337 associado a alterações ósseas induzidas por inflamação (capítulo 2 desta tese), e
338 osteoporose induzida por deficiência de estrogênio (An et al., 2014), entretanto seus
339 mecanismos de ação na diferenciação osteogênica ainda não foram completamente
340 elucidados.

341 O silenciamento do miR-127-3p não teve efeitos significativos na osteogênese
342 de hCTM, mas ressaltamos que sua expressão também não apresentou alterações
343 significativas durante a diferenciação. Ainda assim, não podemos descartar a
344 possibilidade de um efeito na diferenciação osteogênica de outros precursores, como
345 pré-osteoblastos de calvária ou células do ligamento periodontal, ou em um contexto
346 *in vivo*.

347 Por outro lado, a superexpressão do miR-127-3p inibiu significativamente a
348 diferenciação osteogênica de hCTM, evidenciada pela redução da fosfatase alcalina
349 e a mineralização de matriz. A partir disso, exploramos possíveis mecanismos
350 celulares que poderiam explicar este efeito. Estudos anteriores descreveram um efeito
351 inibitório do miR-127-3p na proliferação de células neoplásicas (Bi et al., 2016; Chen
352 et al., 2013; Pan et al., 2012). Um efeito antiproliferativo também foi observado em
353 nossos resultados, o que poderia contribuir, em parte, para os efeitos inibitórios na
354 osteogênese, devido a alteração nos mecanismos de sobrevivência e ciclo celular,
355 importantes para o comprometimento fenotípico durante a diferenciação (Feng et al.,
356 2022).

357 A organização do citoesqueleto é um importante processo durante a
358 diferenciação, contribuindo com a adesão e migração celular (Rodriguez et al., 2004).

359 H. Jiang et al. (2014) demonstraram que o miR-127-3p afeta a remodelação do
360 citoesqueleto de actina em células de glioblastoma, pela modulação do SEPT7.
361 Entretanto, não foram observadas alterações significativas no citoesqueleto após a
362 superexpressão do miR-127-3p em hCTM, sugerindo que esse mecanismo não está
363 relacionado à inibição da diferenciação osteogênica em nosso modelo.

364 Marcadores osteogênicos são úteis para avaliar diferentes fases da
365 diferenciação, e nossos dados demonstraram que a superexpressão do miR-127-3p
366 resultou em uma pequena redução na expressão de Runx2, mas uma redução
367 significativa de Osx, que são fatores de transcrição essenciais para o
368 comprometimento e manutenção do fenótipo osteoblástico (Komori et al., 1997;
369 Nakashima et al., 2002). Col1a1 e Opn, desempenham funções relacionadas a
370 deposição e organização da matriz extracelular, mas estes não apresentaram
371 alterações significativas que pudessem explicar a magnitude da inibição da
372 mineralização. Por outro lado, a expressão de Bsp, que está diretamente envolvida na
373 regulação da deposição de hidroxiapatita (Hunter & Goldberg, 1993), foi
374 significativamente reduzida pela superexpressão do miR-127-3p. Esses dados
375 sugerem a participação do miR-127-3p na regulação do comprometimento fenotípico
376 osteoblástico, assim como na deposição mineral, o que em parte explica a resposta
377 observada.

378 Os miRNAs desempenham um papel importante na regulação de vários
379 mRNAs, permitindo a modulação de diferentes processos celulares. A literatura relata
380 a Bcl6, um repressor transcricional, como um dos alvos do miR-127-3p (Saito et al.,
381 2006). Além disso, a BCL6 já foi associado à proliferação celular, e diferenciação
382 osteogênica, pela modulação indireta de Runx2 (Chen et al., 2013; Fujie et al., 2015).
383 Entretanto, não observamos uma repressão significativa de Bcl6 pelo miR-127-3p em

384 nosso modelo. São necessários estudos adicionais para elucidar o exato mecanismo
385 de ação e os alvos diretos do miR-127-3p durante a osteogênese de hCTM.

386

387

388 **5. CONCLUSÃO**

389 A partir dos nossos resultados, evidenciamos o efeito inibitório do miR-127-3p
390 na diferenciação osteogênica e mineralização *in vitro* de células-tronco mesenquimais
391 derivadas da medula óssea humana (hCTM), em partes, explicado pela inibição da
392 proliferação e menor expressão gênica de *Osx* e *Bsp*. São necessários mais estudos
393 para elucidar os alvos diretos do miR-127-3p neste modelo, mas nosso trabalho
394 contribui para a compreensão dos efeitos do miR-127-3p na osteogênese.

395

396

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença periodontal (DP) é uma condição infeto-inflamatória que resulta na deterioração dos tecidos periodontais. Sua progressão pode ser agravada quando associada a comorbidades como a hipertensão, aumentando o risco de perda dentária e afetando negativamente a qualidade de vida e a saúde sistêmica dos indivíduos afetados. Embora a DP seja altamente prevalente globalmente, seus impactos são especialmente significativos em populações socioeconomicamente desfavorecidas, frequentemente relacionados a más condições de vida, desinformação e acesso precário a cuidados médicos e odontológicos básicos.

A fim de evidenciar possíveis mecanismos envolvidos na progressão da DP, nossos objetivos foram investigar a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) e dos microRNAs (miRNAs) na perda óssea alveolar induzida pela DP associada à condição hipertensiva. Para isso, utilizando como modelo os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que apresentam características similares a hipertensão essencial humana, além de prejuízos na homeostase óssea.

Os resultados apresentados no Capítulo 1 demonstraram uma participação significativa do SRA na perda óssea alveolar induzida pela DP. Observamos um efeito protetor do telmisartan na perda óssea, associado à inibição do receptor Agt1r e ao aumento do receptor Agt2r. Isso foi acompanhado pela redução da resposta inflamatória e dos marcadores de osteoclastos tanto em SHR quanto em ratos normotensos (Wistar). No entanto, a modulação do SRA na mandíbula induzida pela DP foi semelhante entre os modelos, sugerindo

que esse não é o principal mecanismo responsável pelo aumento da perda óssea nos ratos hipertensos. Apesar disso, nossos dados levantam preocupações em relação às abordagens clínicas no tratamento periodontal em pacientes hipertensos, haja visto não haver um consenso sobre o impacto da hipertensão na saúde periodontal, como já é bem estabelecido para outras doenças sistêmicas, como diabetes e osteoporose.

Em seguida, no Capítulo 2, mostramos um perfil distinto de miRNAs expressos na mandíbula dos SHR, sugerindo alterações intrínsecas possivelmente associadas a uma maior susceptibilidade à perda óssea alveolar. Além disso, observamos que muitos miRNAs foram modulados de maneira oposta pela DP nos grupos SHR e Wistar, como, por exemplo, miR-96-5p, miR-141-3p, miR-34c-3p, miR-183-5p, miR-182, miR-369-5p, miR-429 (aumentados nos SHR com DP, enquanto diminuídos nos Wistar com DP) e miR-297 (diminuído nos SHR com DP, enquanto aumentado nos Wistar com DP).

De maneira interessante, entre os miRNAs diferencialmente expressos, identificamos alguns que não haviam sido previamente associados à homeostase ou à doença periodontal, como miR-96-5p e miR-297. Esses achados reforçam a importância dos miRNAs como reguladores-chave na DP e fornecem informações que podem orientar pesquisas futuras, com potencial para novas abordagens terapêuticas ou diagnósticas para a perda óssea alveolar, bem como para outras desordens do tecido ósseo associadas à inflamação.

A aplicação dos miRNAs em investigações translacionais requer a validação funcional desses miRNAs nos tecidos-alvo. Nesse contexto, escolhemos um miRNA de interesse, o miR-127-3p, que apresentou uma expressão diminuída na mandíbula dos Wistar com DP e cujas funções na

diferenciação de células osteoprogenitoras ainda não haviam sido completamente elucidadas. No Capítulo 3, demonstramos que a superexpressão do miR-127-3p inibiu a osteogênese de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana *in vitro*. É importante ressaltar que são necessários estudos adicionais para validar os efeitos *in vivo*, e embora tenha havido avanços promissores nas tecnologias para a aplicação dos miRNAs, ainda não são uma realidade prática. A otimização dos sistemas de entrega *in vivo* ainda é um desafio, além de ser necessário um maior entendimento dos possíveis efeitos sistêmicos e *off-target* dessas moléculas. No entanto, nossos dados contribuem para a compreensão da função do miR-127-3p nos osteoblastos.

Em conclusão, os resultados deste estudo contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença periodontal no contexto da hipertensão. Ao investigar os mecanismos subjacentes à perda óssea alveolar e à interação entre a doença periodontal e a hipertensão, abrimos portas para abordagens translacionais inovadoras. A identificação de miRNAs diferencialmente expressos na mandíbula, juntamente com o entendimento de sua função no tecido ósseo, oferece oportunidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e diagnósticas direcionadas ao tratamento periodontal e sistêmico. Com base nesse trabalho, esperamos que pesquisas futuras avancem em estratégias para a manutenção e recuperação da saúde bucal e sistêmica da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M., & Quitterer, U. (2001). The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*, 276(43), 39721-39726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105253200>

Abuhashish, H. M., Ahmed, M. M., Sabry, D., Khattab, M. M., & Al-Rejaie, S. S. (2017). ACE-2/Ang1-7/Mas cascade mediates ACE inhibitor, captopril, protective effects in estrogen-deficient osteoporotic rats. *Biomed Pharmacother*, 92, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.062>

Ahmad, N., Kushwaha, P., Karvande, A., Tripathi, A. K., Kothari, P., Adhikary, S., Khedgikar, V., Mishra, V. K., & Trivedi, R. (2019). MicroRNA-672-5p Identified during Weaning Reverses Osteopenia and Sarcopenia in Ovariectomized Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 14, 536-549. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.002>

Akkouch, A., Eliason, S., Sweat, M. E., Romero-Bustillos, M., Zhu, M., Qian, F., Amendt, B. A., & Hong, L. (2019). Enhancement of MicroRNA-200c on Osteogenic Differentiation and Bone Regeneration by Targeting Sox2-Mediated Wnt Signaling and Klf4. *Hum Gene Ther*, 30(11), 1405-1418. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.019>

Akkouch, A., Zhu, M., Romero-Bustillos, M., Eliason, S., Qian, F., Salem, A. K., Amendt, B. A., & Hong, L. (2019). MicroRNA-200c Attenuates Periodontitis by Modulating Proinflammatory and Osteoclastogenic Mediators. *Stem Cells Dev*, 28(15), 1026-1036. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0027>

Al-Hezaimi, K., Javed, F., Ali, T. S., Al-Askar, M., & Al-Rasheed, A. (2012). Rapidly progressive periodontal disease associated with human immunodeficiency virus. *J Coll Physicians Surg Pak*, 22(3), 186-188. <https://doi.org/10.2012/JCPSP.186188>

Alaluusua, S., Kivittie-Kallio, S., Wolf, J., Haavio, M. L., Asikainen, S., & Pirinen, S. (1997). Periodontal findings in Cohen syndrome with chronic neutropenia. *J Periodontol*, 68(5), 473-478. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.5.473>

Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., O'Brien, C. A., & Manolagas, S. C. (2007). Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem*, 282(37), 27298-27305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702811200>

Almeida, T., Valverde, T., Martins-Junior, P., Ribeiro, H., Kitten, G., & Carvalhaes, L. (2015). Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues. *Rom J Morphol Embryol*, 56(1), 33-40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826485>

Almutlaq, M., Alamro, A. A., Alamri, H. S., Alghamdi, A. A., & Barhoumi, T. (2021). The Effect of Local Renin Angiotensin System in the Common Types of Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 736361. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.736361>

Alvarez-Garcia, I., & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132(21), 4653-4662. <https://doi.org/10.1242/dev.02073>

Ambrogini, E., Almeida, M., Martin-Millan, M., Paik, J. H., Depinho, R. A., Han, L., Goellner, J., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., O'Brien, C. A., & Manolagas, S. C. (2010). FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metab*, 11(2), 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.12.009>

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>

An, J. H., Ohn, J. H., Song, J. A., Yang, J. Y., Park, H., Choi, H. J., Kim, S. W., Kim, S. Y., Park, W. Y., & Shin, C. S. (2014). Changes of microRNA profile and microRNA-mRNA regulatory network in bones of ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*, 29(3), 644-656. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2060>

Araujo, A. A., Souza, T. O., Moura, L. M., Brito, G. A., Aragao, K. S., Araujo, L. S., Medeiros, C. A., Alves, M. S., & Araujo, R. F., Jr. (2013). Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-alpha, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol*, 40(12), 1104-1111. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12160>

Arfat, Y., Xiao, W. Z., Ahmad, M., Zhao, F., Li, D. J., Sun, Y. L., Hu, L., Zhihao, C., Zhang, G., Iftikhar, S., Shang, P., Yang, T. M., & Qian, A. R. (2015). Role of microRNAs in osteoblasts differentiation and bone disorders. *Curr Med Chem*, 22(6), 748-758. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386816>

Asaba, Y., Ito, M., Fumoto, T., Watanabe, K., Fukuhara, R., Takeshita, S., Nimura, Y., Ishida, J., Fukamizu, A., & Ikeda, K. (2009). Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *J Bone Miner Res*, 24(2), 241-250. <https://doi.org/10.1359/jbmr.081006>

Aydogan, B. I., Erarslan, E., Unluturk, U., & Gullu, S. (2019). Effects of telmisartan and losartan treatments on bone turnover markers in patients with newly diagnosed stage I hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 20(3), 1470320319862741. <https://doi.org/10.1177/1470320319862741>

Bailleul-Forestier, I., Monod-Broca, J., Benkerrou, M., Mora, F., & Picard, B. (2008). Generalized periodontitis associated with Chediak-Higashi syndrome. *J Periodontol*, 79(7), 1263-1270. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070440>

Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res*, 339(1), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

Bastos, M. F., Brilhante, F. V., Bezerra, J. P., Silva, C. A., & Duarte, P. M. (2010). Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz Oral Res*, 24(2), 170-176. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658035>

Batchelor, P. (2014). Is periodontal disease a public health problem? *Br Dent J*, 217(8), 405-409. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.912>

Bauer, D. C., Black, D. M., Garnero, P., Hochberg, M., Ott, S., Orloff, J., Thompson, D. E., Ewing, S. K., Delmas, P. D., & Fracture Intervention Trial Study, G. (2004). Change in bone turnover and hip, non-spine, and vertebral fracture in alendronate-treated women: the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res*, 19(8), 1250-1258. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040512>

Berglundh, T., Persson, L., & Klinge, B. (2002). A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol*, 29 Suppl 3, 197-212; discussion 232-193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787220>

Bergstrom, J. (2004). Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10266-004-0043-4>

Bi, L., Yang, Q., Yuan, J., Miao, Q., Duan, L., Li, F., & Wang, S. (2016). MicroRNA-127-3p acts as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer by regulating the BAG5 gene. *Oncol Rep*, 36(5), 2563-2570. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5055>

Birocale, A. M., Medeiros, A. R., Ruffoni, L. D., Takayama, L., de Oliveira, J. M., Jr., Nonaka, K. O., Pereira, R. M., & Bissoli, N. S. (2016). Bone mineral density is reduced by telmisartan in male spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Rep*, 68(6), 1149-1153. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.06.014>

Boehringer-Ingelheim. (2009). *NDA 20-850/S-022/S-023*. Department of Health and Human Services

Bonato, C. F., do-Amaral, C. C., Belini, L., Salzedas, L. M., & Oliveira, S. H. (2012). Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *J Periodontal Res*, 47(6), 783-792. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01496.x>

Bonfim Mde, L., Mattos, F. F., Ferreira e Ferreira, E., Campos, A. C., & Vargas, A. M. (2013). Social determinants of health and periodontal disease in Brazilian adults: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 13, 22. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-13-22>

Boos, C. J., & Lip, G. Y. (2006). Is hypertension an inflammatory process? *Curr Pharm Des*, 12(13), 1623-1635. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729874>

Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24(2-3), 119-124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)

Boskey, A. L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S. B., Ducey, P., & Karsenty, G. (1998). Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 23(3), 187-196. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737340>

Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Muller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, 25(7), 1468-1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>

Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>

Brito, L. C., DalBo, S., Striechen, T. M., Farias, J. M., Olchanheski, L. R., Jr., Mendes, R. T., Velloso, J. C., Favero, G. M., Sordi, R., Assreuy, J., Santos, F. A., & Fernandes, D. (2013). Experimental periodontitis promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction. *Arch Oral Biol*, 58(9), 1187-1198. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.03.009>

Brito, V. G. B., Patrocínio, M. S., de Sousa, M. C. L., Barreto, A. E. A., Frasnelli, S. C. T., Lara, V. S., Santos, C. F., & Oliveira, S. H. P. (2020). Telmisartan Prevents Alveolar Bone Loss by Decreasing the Expression of Osteoclasts Markers in Hypertensive Rats With Periodontal Disease. *Front Pharmacol*, *11*, 579926. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.579926>

Brito, V. G. B., Patrocínio, M. S., Sousa, M. C. L., Barreto, A. E. A., Frasnelli, S. C. T., Lara, V. S., Santos, C. F., & Oliveira, S. H. P. (2021). Mast cells contribute to alveolar bone loss in Spontaneously Hypertensive Rats with periodontal disease regulating cytokines production. *PLoS One*, *16*(3), e0247372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247372>

Brodsky, B., & Persikov, A. V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*, *70*, 301-339. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7)

Bukhari, S. I. A., Truesdell, S. S., Lee, S., Kollu, S., Classon, A., Boukhali, M., Jain, E., Mortensen, R. D., Yanagiya, A., Sadreyev, R. I., Haas, W., & Vasudevan, S. (2016). A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence. *Mol Cell*, *61*(5), 760-773. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.013>

Burr, D. B., & Akkus, O. (2014). Bone morphology and Organization. In D. B. Burr & M. R. Allen (Eds.), *Basic and applied bone biology* (pp. 3-25). Academic Press.

Burr, D. B., & Allen, M. R. (2019). *Basic and applied bone biology* (Second edition. ed.). Elsevier/Academic Press.

Butler, W. T., Ridall, A. L., & McKee, M. D. (1996). Osteopontin. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology* (pp. 167-181). Academic Press.

Butt, D. A., Mamdani, M., Gomes, T., Lix, L., Lu, H., Tu, K., & Hypertension Outcome, S. T. (2014). Risk of Osteoporotic Fractures With Angiotensin II Receptor Blockers Versus Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertensive Community-Dwelling Elderly. *J Bone Miner Res*, *29*(11), 2483-2488. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2271>

Caillon, A., & Schiffrin, E. L. (2016). Role of Inflammation and Immunity in Hypertension: Recent Epidemiological, Laboratory, and Clinical Evidence. *Curr Hypertens Rep*, *18*(3), 21. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0628-7>

Campbell, D. J. (2014). Clinical relevance of local Renin Angiotensin systems. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *5*, 113. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00113>

Cao, Y., Lv, Q., & Li, Y. (2021). Astragaloside IV Improves Tibial Defect in Rats and Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation of hBMSCs through MiR-124-3p.1/STAT3 Axis. *J Nat Prod*, *84*(2), 287-297. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00975>

Capettini, L. S., Montecucco, F., Mach, F., Stergiopoulos, N., Santos, R. A., & da Silva, R. F. (2012). Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr Pharm Des*, *18*(7), 963-970. <https://doi.org/10.2174/138161212799436593>

Carretero, O. A., & Oparil, S. (2000). Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, *101*(3), 329-335. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.3.329>

- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, *64*(1), 57-80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Doss, C. G. P., & Lee, S. S. (2017). Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*, *8*, 132-143. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.005>
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., & Lee, S. S. (2021). Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *J Adv Res*, *28*, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>
- Chaves Neto, A. H., Brito, V. G. B., Landim de Barros, T., do Amaral, C. C. F., Sumida, D. H., & Oliveira, S. H. P. (2018). Chronic high glucose and insulin stimulate bone-marrow stromal cells adipogenic differentiation in young spontaneously hypertensive rats. *J Cell Physiol*, *233*(9), 6853-6865. <https://doi.org/10.1002/jcp.26445>
- Chen, H., Yang, K. G., Zhang, J., Cheuk, K. Y., Nepotchatykh, E., Wang, Y., Hung, A. L., Lam, T. P., Moreau, A., & Lee, W. Y. (2022). Upregulation of microRNA-96-5p is associated with adolescent idiopathic scoliosis and low bone mass phenotype. *Sci Rep*, *12*(1), 9705. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12938-3>
- Chen, J., Wang, M., Guo, M., Xie, Y., & Cong, Y. S. (2013). miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6. *PLoS One*, *8*(11), e80266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080266>
- Chen, M. X., Zhong, Y. J., Dong, Q. Q., Wong, H. M., & Wen, Y. F. (2021a). Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *J Clin Periodontol*, *48*(9), 1165-1188. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13506>
- Chen, M. X., Zhong, Y. J., Dong, Q. Q., Wong, H. M., & Wen, Y. F. (2021b). Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *J Clin Periodontol*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13506>
- Chen, W., Gao, B., Hao, L., Zhu, G., Jules, J., MacDougall, M. J., Wang, J., Han, X., Zhou, X., & Li, Y. P. (2016). The silencing of cathepsin K used in gene therapy for periodontal disease reveals the role of cathepsin K in chronic infection and inflammation. *J Periodontal Res*, *51*(5), 647-660. <https://doi.org/10.1111/jre.12345>
- Cheng, L., Fan, Y., Cheng, J., Wang, J., Liu, Q., & Feng, Z. (2022). Long non-coding RNA ZFY-AS1 represses periodontitis tissue inflammation and oxidative damage via modulating microRNA-129-5p/DEAD-Box helicase 3 X-linked axis. *Bioengineered*, *13*(5), 12691-12705. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2019876>
- Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*, *24*, 9-27. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x>
- Collins, L. E., DeCoursey, J., Soledad di Luca, M., Rochfort, K. D., & Loscher, C. E. (2015). An Emerging Role for SNARE Proteins in Dendritic Cell Function. *Front Immunol*, *6*, 133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00133>

de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52(3), 415-472. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977869>

de Vries, F., Souverein, P. C., Cooper, C., Leufkens, H. G., & van Staa, T. P. (2007). Use of beta-blockers and the risk of hip/femur fracture in the United Kingdom and The Netherlands. *Calcif Tissue Int*, 80(2), 69-75. <https://doi.org/10.1007/s00223-006-0213-1>

Delgado-Calle, J., & Bellido, T. (2022). The osteocyte as a signaling cell. *Physiol Rev*, 102(1), 379-410. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2020>

Deng, L., Li, X., Ren, X., Lai, S., Zhu, Y., Li, J., Huang, H., & Mu, Y. (2022). A grooved porous hydroxyapatite scaffold induces osteogenic differentiation via regulation of PKA activity by upregulating miR-129-5p expression. *J Periodontal Res*, 57(6), 1238-1255. <https://doi.org/10.1111/jre.13060>

Denhardt, D. T., Giachelli, C. M., & Rittling, S. R. (2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 723-749. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.723>

Deppe, S., Boger, R. H., Weiss, J., & Benndorf, R. A. (2010). Telmisartan: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(7), 863-871. <https://doi.org/10.1517/17425255.2010.494597>

Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*, 8, 409. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>

Dionisio, T. J., Souza, G. P., Colombini-Ishikiriama, B. L., Garbieri, T. F., Parisi, V. A., Oliveira, G. M., Cano, I. P., Rodini, C. O., Oliveira, S. H. P., Greene, A. S., & Santos, C. F. (2019). AT1 receptor antagonism promotes bone loss attenuation in experimental periodontitis, block inflammatory mediators, upregulate antioxidant enzymes and bone formation markers. *J Periodontol*. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0064>

Dionisio, T. J., Souza, G. P., Colombini-Ishikiriama, B. L., Garbieri, T. F., Parisi, V. A., Oliveira, G. M., Cano, I. P., Rodini, C. O., Oliveira, S. H. P., Greene, A. S., & Santos, C. F. (2020). AT1 receptor antagonism promotes bone loss attenuation in experimental periodontitis, blocks inflammatory mediators, and upregulates antioxidant enzymes and bone formation markers. *J Periodontol*, 91(4), 533-544. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0064>

Dixon, D. L., Wohlford, G. F. t., & Abbate, A. (2020). Inflammation and Hypertension: Causal or Not? *Hypertension*, 75(2), 297-298. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14195>

Donos, N., Laurell, L., & Mardas, N. (2012). Hierarchical decisions on teeth vs. implants in the periodontitis-susceptible patient: the modern dilemma. *Periodontol 2000*, 59(1), 89-110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00433.x>

Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149(3), 515-524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005>

Eijkelenboom, A., & Burgering, B. M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(2), 83-97. <https://doi.org/10.1038/nrm3507>

El Azreq, M. A., Arseneault, C., Boisvert, M., Page, N., Allaey, I., Poubelle, P. E., Tessier, P. A., & Aoudjit, F. (2015). Cooperation between IL-7 Receptor and Integrin alpha2beta1 (CD49b) Drives Th17-Mediated Bone Loss. *J Immunol*, *195*(9), 4198-4209. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500437>

Epsley, S., Tadros, S., Farid, A., Kargilis, D., Mehta, S., & Rajapakse, C. S. (2020). The Effect of Inflammation on Bone. *Front Physiol*, *11*, 511799. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.511799>

Felding-Habermann, B., & Cheresch, D. A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol*, *5*(5), 864-868. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90036-p](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90036-p)

Feng, L., Shi, L., Lu, Y. F., Wang, B., Tang, T., Fu, W. M., He, W., Li, G., & Zhang, J. F. (2018). Linc-ROR Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Functioning as a Competing Endogenous RNA for miR-138 and miR-145. *Mol Ther Nucleic Acids*, *11*, 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.03.004>

Feng, X., Xiang, Q., Jia, J., Guo, T., Liao, Z., Yang, S., Cai, X., & Liu, X. (2022). CircHGF suppressed cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs in ONFH via inhibiting miR-25-3p binding to SMAD7. *Mol Ther Nucleic Acids*, *28*, 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.02.017>

Fernandes, F., Stringhetta-Garcia, C. T., Peres-Ueno, M. J., Fernandes, F., Nicola, A. C., Castoldi, R. C., Ozaki, G., Louzada, M. J. Q., Chaves-Neto, A. H., Ervolino, E., & Dornelles, R. C. M. (2020). Oxytocin and bone quality in the femoral neck of rats in perimenopause. *Sci Rep*, *10*(1), 7937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64683-0>

Fleisch, H. (2000). Bone and mineral metabolism. In *Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient* (4rd ed., pp. 1-26). Academic Press.

Frampton, J. E. (2011). Telmisartan: a review of its use in cardiovascular disease prevention. *Drugs*, *71*(6), 651-677. <https://doi.org/10.2165/11206710-000000000-00000>

Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, *19*(1), 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>

Fujie, A., Funayama, A., Miyauchi, Y., Sato, Y., Kobayashi, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Hao, W., Tando, T., Watanabe, R., Morita, M., Miyamoto, K., Kanaji, A., Morioka, H., Matsumoto, M., Toyama, Y., & Miyamoto, T. (2015). Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, *457*(3), 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.012>

Fujimura, A., Ushijima, K., & Ando, H. (2013). Does the PPAR-gamma-activating property of telmisartan provide a benefit in clinical practice? *Hypertens Res*, *36*(2), 183. <https://doi.org/10.1038/hr.2012.189>

Fujisawa, R., Nodasaka, Y., & Kuboki, Y. (1995). Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. *Calcif Tissue Int*, *56*(2), 140-144. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7736323>

Gabriele, L. G., Morandini, A. C., Dionisio, T. J., & Santos, C. F. (2017). Angiotensin II Type 1 Receptor Knockdown Impairs Interleukin-1beta-Induced Cytokines in Human Periodontal Fibroblasts. *J Periodontol*, *88*(1), e1-e11. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160354>

- Ganss, B., Kim, R. H., & Sodek, J. (1999). Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(1), 79-98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759428>
- Gao, B., & Zheng, L. (2013). microRNA Expression in Rat Apical Periodontitis Bone Lesion. *Bone Res*, 1(2), 170-185. <https://doi.org/10.4248/BR201302006>
- Gao, X. L., Cao, M. G., Ai, G. G., & Hu, Y. B. (2018). Mir-98 reduces the expression of HMGA2 and promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(11), 3311-3317. https://doi.org/10.26355/eurev_201806_15150
- Garcia-Testal, A., Monzo, A., Rabanaque, G., Gonzalez, A., & Romeu, A. (2006). [Evolution of the bone mass of hypertense menopausal women in treatment with fosinopril]. *Med Clin (Barc)*, 127(18), 692-694. <https://doi.org/10.1157/13095095> (Evolucion de la densidad osea de mujeres menopausicas hipertensas en tratamiento con fosinopril.)
- Ghannad, F., Nica, D., Fulle, M. I., Grenier, D., Putnins, E. E., Johnston, S., Eslami, A., Koivisto, L., Jiang, G., McKee, M. D., Hakkinen, L., & Larjava, H. (2008). Absence of alphavbeta6 integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease. *Am J Pathol*, 172(5), 1271-1286. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071068>
- Ghotloo, S., Motedayyen, H., Amani, D., Saffari, M., & Sattari, M. (2019). Assessment of microRNA-146a in generalized aggressive periodontitis and its association with disease severity. *J Periodontal Res*, 54(1), 27-32. <https://doi.org/10.1111/jre.12538>
- Giese, M. J., & Speth, R. C. (2014). The ocular renin-angiotensin system: a therapeutic target for the treatment of ocular disease. *Pharmacol Ther*, 142(1), 11-32. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.11.002>
- Gouldsborough, I., Lindop, G. B., & Ashton, N. (2003). Renal renin-angiotensin system activity in naturally reared and cross-fostered spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 16(10), 864-869. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(03\)00999-3](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(03)00999-3)
- Goyal, S. N., Bharti, S., Bhatia, J., Nag, T. C., Ray, R., & Arya, D. S. (2011). Telmisartan, a dual ARB/partial PPAR-gamma agonist, protects myocardium from ischaemic reperfusion injury in experimental diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 13(6), 533-541. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01377.x>
- Graves, D. T., Li, J., & Cochran, D. L. (2011). Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*, 90(2), 143-153. <https://doi.org/10.1177/0022034510385236>
- Gu, H., Shi, S., Xiao, F., Huang, Z., Xu, J., Chen, G., Zhou, K., Lu, L., & Yin, X. (2020). MiR-1-3p regulates the differentiation of mesenchymal stem cells to prevent osteoporosis by targeting secreted frizzled-related protein 1. *Bone*, 137, 115444. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115444>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guo, S., Gu, J., Ma, J., Xu, R., Wu, Q., Meng, L., Liu, H., Li, L., & Xu, Y. (2021). GATA4-driven miR-206-3p signatures control orofacial bone development by regulating osteogenic and osteoclastic activity. *Theranostics*, 11(17), 8379-8395. <https://doi.org/10.7150/thno.58052>

- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., & Taugner, R. (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*, *70*(4), 1067-1116. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.4.1067>
- Hadjjargyrou, M., & Komatsu, D. E. (2019). The Therapeutic Potential of MicroRNAs as Orthobiologics for Skeletal Fractures. *J Bone Miner Res*, *34*(5), 797-809. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3708>
- Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2021). Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*, *21*(7), 426-440. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>
- Halleen, J. M., Tiitinen, S. L., Ylipahkala, H., Fagerlund, K. M., & Vaananen, H. K. (2006). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab*, *52*(9-10), 499-509. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17078477>
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, *293*(5532), 1146-1150. <https://doi.org/10.1126/science.1064023>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*(24), 3016-3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Han, Y., Zhang, K., Hong, Y., Wang, J., Liu, Q., Zhang, Z., Xia, H., Tang, Y., Li, T., Li, L., Xue, Y., & Hong, W. (2018). miR-342-3p promotes osteogenic differentiation via targeting ATF3. *FEBS Lett*, *592*(24), 4051-4065. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13282>
- Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet*, *10*, 478. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00478>
- Hao, L., Li, J., Tian, Y., & Wu, J. (2016). Changes in the MicroRNA Profile of the Mandible of Ovariectomized Mice. *Cell Physiol Biochem*, *38*(4), 1267-1287. <https://doi.org/10.1159/000443074>
- Hao, W., Liu, H., Zhou, L., Sun, Y., Su, H., Ni, J., He, T., Shi, P., & Wang, X. (2018). MiR-145 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells through targeting FoxO1. *Exp Biol Med (Maywood)*, *243*(4), 386-393. <https://doi.org/10.1177/1535370217746611>
- Harrison, D. G., Coffman, T. M., & Wilcox, C. S. (2021). Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circ Res*, *128*(7), 847-863. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318082>
- Harrison, D. G., Guzik, T. J., Lob, H. E., Madhur, M. S., Marvar, P. J., Thabet, S. R., Vinh, A., & Weyand, C. M. (2011). Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, *57*(2), 132-140. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576>
- Hasan, A., & Palmer, R. M. (2014). A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *Br Dent J*, *216*(8), 457-461. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.299>
- He, W., Zhang, N., & Lin, Z. (2021). MicroRNA-125a-5p modulates macrophage polarization by targeting E26 transformation-specific variant 6 gene during orthodontic

tooth movement. *Arch Oral Biol*, 124, 105060. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105060>

Hensley, A. P., & McAlinden, A. (2021). The role of microRNAs in bone development. *Bone*, 143, 115760. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115760>

Hong, S. J., Yang, B. E., Yoo, D. M., Kim, S. J., Choi, H. G., & Byun, S. H. (2021). Analysis of the relationship between periodontitis and osteoporosis/fractures: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 21(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01496-1>

Honma, S., Taki, K., Lei, S., Niwa, H., & Wakisaka, S. (2010). Immunohistochemical localization of SNARE proteins in dental pulp and periodontal ligament of the rat incisor. *Anat Rec (Hoboken)*, 293(6), 1070-1080. <https://doi.org/10.1002/ar.21106>

Huang, C., Geng, J., & Jiang, S. (2017). MicroRNAs in regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 368(2), 229-238. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2462-2>

Huang, H. Y., Lin, Y. C., Cui, S., Huang, Y., Tang, Y., Xu, J., Bao, J., Li, Y., Wen, J., Zuo, H., Wang, W., Li, J., Ni, J., Ruan, Y., Li, L., Chen, Y., Xie, Y., Zhu, Z., Cai, X., . . . Huang, H. D. (2022). miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D222-D230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1079>

Huja, S. S., Fernandez, S. A., Hill, K. J., & Li, Y. (2006). Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 288(12), 1243-1249. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20396>

Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (1993). Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8562-8565. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8562>

Husain, K., Hernandez, W., Ansari, R. A., & Ferder, L. (2015). Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem*, 6(3), 209-217. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.209>

Ilic, K., Obradovic, N., & Vujasinovic-Stupar, N. (2013). The relationship among hypertension, antihypertensive medications, and osteoporosis: a narrative review. *Calcif Tissue Int*, 92(3), 217-227. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9671-9>

Inoue, T., Moriya, A., Goto, K., Tanaka, T., & Inazu, M. (1995). What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 22(1), S242-243. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9072374>

Irwandi, R. A., & Vacharaksa, A. (2016). The role of microRNA in periodontal tissue: A review of the literature. *Arch Oral Biol*, 72, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.014>

Izawa, Y., Sagara, K., Kadota, T., & Makita, T. (1985). Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int*, 37(6), 605-607. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3937582>

Izu, Y., Mizoguchi, F., Kawamata, A., Hayata, T., Nakamoto, T., Nakashima, K., Inagami, T., Ezura, Y., & Noda, M. (2009). Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *J Biol Chem*, 284(8), 4857-4864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807610200>

- Jackson, T. R., Blair, L. A., Marshall, J., Goedert, M., & Hanley, M. R. (1988). The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, 335(6189), 437-440. <https://doi.org/10.1038/335437a0>
- Jiang, F., Yang, J., Zhang, Y., Dong, M., Wang, S., Zhang, Q., Liu, F. F., Zhang, K., & Zhang, C. (2014). Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol*, 11(7), 413-426. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.59>
- Jiang, F., Zhou, Y., Zhang, R., & Wen, Y. (2021). miR-205 and HMGB1 expressions in chronic periodontitis patients and their associations with the inflammatory factors. *Am J Transl Res*, 13(8), 9224-9232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34540038>
- Jiang, H., Hua, D., Zhang, J., Lan, Q., Huang, Q., Yoon, J. G., Han, X., Li, L., Foltz, G., Zheng, S., & Lin, B. (2014). MicroRNA-127-3p promotes glioblastoma cell migration and invasion by targeting the tumor-suppressor gene SEPT7. *Oncol Rep*, 31(5), 2261-2269. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3055>
- Jiang, Y., Xu, X., Xiao, L., Wang, L., & Qiang, S. (2022). The Role of microRNA in the Inflammatory Response of Wound Healing. *Front Immunol*, 13, 852419. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.852419>
- Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*, 13(5), 793-802. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.5.793>
- Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S. R., Macauley, M. S., Rickert, R. C., & Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front Genet*, 6, 340. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00340>
- Jin, S. H., Zhou, J. G., Guan, X. Y., Bai, G. H., Liu, J. G., & Chen, L. W. (2020). Development of an miRNA-Array-Based Diagnostic Signature for Periodontitis. *Front Genet*, 11, 577585. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.577585>
- Jonason, J. H., Xiao, G., Zhang, M., Xing, L., & Chen, D. (2009). Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage. *J Dent Res*, 88(8), 693-703. <https://doi.org/10.1177/0022034509341629>
- Kagiya, T. (2016). MicroRNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease. *Int J Mol Sci*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081317>
- Kakuta, H., Kurosaki, E., Niimi, T., Gato, K., Kawasaki, Y., Suwa, A., Honbou, K., Yamaguchi, T., Okumura, H., Sanagi, M., Tomura, Y., Orita, M., Yonemoto, T., & Masuzaki, H. (2014). Distinct properties of telmisartan on agonistic activities for peroxisome proliferator-activated receptor gamma among clinically used angiotensin II receptor blockers: drug-target interaction analyses. *J Pharmacol Exp Ther*, 349(1), 10-20. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.211722>
- Kapferer-Seebacher, I., Pepin, M., Werner, R., Aitman, T. J., Nordgren, A., Stoiber, H., Thielens, N., Gaboriaud, C., Amberger, A., Schossig, A., Gruber, R., Giunta, C., Bamshad, M., Bjorck, E., Chen, C., Chitayat, D., Dorschner, M., Schmitt-Egenolf, M., Hale, C. J., . . . Zschocke, J. (2016). Periodontal Ehlers-Danlos Syndrome Is Caused by

Mutations in C1R and C1S, which Encode Subcomponents C1r and C1s of Complement. *Am J Hum Genet*, 99(5), 1005-1014. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.019>

Kawai, S., Michikami, I., Kitagaki, J., Hata, K., Kiyonari, H., Abe, T., Amano, A., & Wakisaka, S. (2017). Syntaxin 4a Regulates Matrix Vesicle-Mediated Bone Matrix Production by Osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 32(3), 440-448. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3056>

Kawasaki, H., & Amano, H. (2021). Anti-inflammatory role of microRNA-429 in human gingival epithelial cells-inhibition of IL-8 production through direct binding to IKKbeta mRNA. *Mol Med Rep*, 24(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12220>

Kim, V. N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, 14(4), 156-159. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.02.006>

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>

Komatsu, D. E., Duque, E., & Hadjiargyrou, M. (2021). MicroRNAs and fracture healing: Pre-clinical studies. *Bone*, 143, 115758. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115758>

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755-764. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80258-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80258-5)

Korbecki, J., Bobinski, R., & Dutka, M. (2019). Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm Res*, 68(6), 443-458. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01231-1>

Krongbamee, T., Zhu, M., Qian, Q., Zhang, Z., Eliason, S., Shu, Y., Qian, F., Akkouch, A., Su, D., Amendt, B. A., Yang, L., & Hong, L. (2021). Plasmid encoding microRNA-200c ameliorates periodontitis and systemic inflammation in obese mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 23, 1204-1216. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.01.030>

Kulkarni, C., & Kinane, D. F. (2014). Host response in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 65(1), 79-91. <https://doi.org/10.1111/prd.12017>

Kumar, V., Knowle, D., Gavini, N., & Pulakat, L. (2002). Identification of the region of AT2 receptor needed for inhibition of the AT1 receptor-mediated inositol 1,4,5-triphosphate generation. *FEBS Lett*, 532(3), 379-386. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03713-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03713-4)

Kwok, T., Leung, J., Barrett-Connor, E., & Osteoporotic Fractures in Men Research, G. (2017). ARB users exhibit a lower fracture incidence than ACE inhibitor users among older hypertensive men. *Age Ageing*, 46(1), 57-64. <https://doi.org/10.1093/ageing/afw150>

Kwok, T., Leung, J., Zhang, Y. F., Bauer, D., Ensrud, K. E., Barrett-Connor, E., Leung, P. C., & Osteoporotic Fractures in Men Research, G. (2012). Does the use of ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers affect bone loss in older men? *Osteoporos Int*, 23(8), 2159-2167. <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1831-7>

- Laghlam, D., Jozwiak, M., & Nguyen, L. S. (2021). Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Immunomodulation: A State-of-the-Art Review. *Cells*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071767>
- Lakkakorpi, P. T., Horton, M. A., Helfrich, M. H., Karhukorpi, E. K., & Vaananen, H. K. (1991). Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J Cell Biol*, *115*(4), 1179-1186. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.4.1179>
- Landim de Barros, T., Brito, V. G., do Amaral, C. C., Chaves-Neto, A. H., Campanelli, A. P., & Oliveira, S. H. (2016). Osteogenic markers are reduced in bone-marrow mesenchymal cells and femoral bone of young spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, *146*, 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.015>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, Y. (2022). Association between osteoporosis and periodontal disease among menopausal women: The 2013-2015 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*, *17*(3), e0265631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265631>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, *21*(17), 4663-4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, *23*(20), 4051-4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Li, J., Xiao, X., Wei, W., Ding, H., Yue, Y., Tian, Y., Nabar, N. R., Liu, Z., Yang, Z., & Wang, M. (2019). Inhibition of angiotensin II receptor I prevents inflammation and bone loss in periodontitis. *J Periodontol*, *90*(2), 208-216. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0753>
- Li, M., Cong, R., Yang, L., Yang, L., Zhang, Y., & Fu, Q. (2020). A novel lncRNA LNC_000052 leads to the dysfunction of osteoporotic BMSCs via the miR-96-5p-PIK3R1 axis. *Cell Death Dis*, *11*(9), 795. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03006-7>
- Li, Z., Zhang, W., & Huang, Y. (2018). MiRNA-133a is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promoting osteoclast differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *50*(3), 273-280. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy006>
- Lindhe, J., Lang, N. P., Berglundh, T., Giannobile, W. V., & Sanz, M. (2015). *Clinical periodontology and implant dentistry* (Sixth edition. ed.) [text]. Wiley.
- Liu, H., Liu, Q., Wu, X. P., He, H. B., & Fu, L. (2018). MiR-96 regulates bone metabolism by targeting osterix. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *45*(6), 602-613. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12912>

- Liu, J., Dang, L., Wu, X., Li, D., Ren, Q., Lu, A., & Zhang, G. (2019). microRNA-Mediated Regulation of Bone Remodeling: A Brief Review. *JBMR Plus*, 3(9), e10213. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10213>
- Liu, T. J., & Guo, J. L. (2020). Overexpression of microRNA-141 inhibits osteoporosis in the jawbones of ovariectomized rats by regulating the Wnt/beta-catenin pathway. *Arch Oral Biol*, 113, 104713. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104713>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lockhart, P. B., Bolger, A. F., Papapanou, P. N., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, M. E., Taubert, K. A., Newburger, J. W., Gornik, H. L., Gewitz, M. H., Wilson, W. R., Smith, S. C., Jr., Baddour, L. M., American Heart Association Rheumatic Fever, E., Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, C. o. E., Prevention, C. o. P. V. D., & Council on Clinical, C. (2012). Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 125(20), 2520-2544. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31825719f3>
- Long, F. (2011). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(1), 27-38. <https://doi.org/10.1038/nrm3254>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Lozano, C., Duroux-Richard, I., Firat, H., Schordan, E., & Apparailly, F. (2019). MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation? *Front Immunol*, 10, 375. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00375>
- Lu, H., Cassis, L. A., Kooi, C. W., & Daugherty, A. (2016). Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens Res*, 39(7), 492-500. <https://doi.org/10.1038/hr.2016.17>
- Lu, J., Wu, L., Jiang, T., Wang, Y., Zhao, H., Gao, Q., Pan, Y., Tian, Y., & Zhang, Y. (2015). Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells. *Neurotoxicol Teratol*, 47, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.11.004>
- Lund, E., Guttlinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), 95-98. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>
- Luo, Y., Da, D., Weng, Q., Yao, S., Zhang, H., Han, X., & Zhang, Y. (2022). miR-296-5p promotes autophagy in mouse LS8 cells under excessive fluoride via AMPK/ULK1 pathways. *Ecotoxicol Environ Saf*, 235, 113362. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113362>
- Ma, L., Ji, J. L., Ji, H., Yu, X., Ding, L. J., Liu, K., & Li, Y. Q. (2010). Telmisartan alleviates rosiglitazone-induced bone loss in ovariectomized spontaneous hypertensive rats. *Bone*, 47(1), 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.03.016>

- Macedo Paizan, M. L., & Vilela-Martin, J. F. (2014). Is there an association between periodontitis and hypertension? *Curr Cardiol Rev*, 10(4), 355-361. <https://doi.org/10.2174/1573403x10666140416094901>
- Manrique, N., Pereira, C. C., Garcia, L. M., Micaroni, S., Carvalho, A. A., Perri, S. H., Okamoto, R., Sumida, D. H., & Antoniali, C. (2012). Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study. *J Appl Oral Sci*, 20(2), 222-227. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666841>
- McAlinden, A., & Im, G. I. (2018). MicroRNAs in orthopaedic research: Disease associations, potential therapeutic applications, and perspectives. *J Orthop Res*, 36(1), 33-51. <https://doi.org/10.1002/jor.23822>
- Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 12(3), e1627. <https://doi.org/10.1002/wrna.1627>
- Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*, 42(4), 1135-1140. <https://doi.org/10.1042/BST20140142>
- Merico, D., Isserlin, R., Stueker, O., Emili, A., & Bader, G. D. (2010). Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One*, 5(11), e13984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013984>
- Mico-Martinez, P., Alminana-Pastor, P. J., Alpiste-Illueca, F., & Lopez-Roldan, A. (2021). MicroRNAs and periodontal disease: a qualitative systematic review of human studies. *J Periodontal Implant Sci*, 51(6), 386-397. <https://doi.org/10.5051/jpis.2007540377>
- Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M., & Jee, W. S. (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*, 3(3), 953-960; discussion 960-951. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694361>
- Mills, K. T., Stefanescu, A., & He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol*, 16(4), 223-237. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>
- Mirhafez, S. R., Mohebbati, M., Feiz Disfani, M., Saberi Karimian, M., Ebrahimi, M., Avan, A., Eslami, S., Pasdar, A., Rooki, H., Esmaeili, H., Ferns, G. A., & Ghayour-Mobarhan, M. (2014). An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension. *J Am Soc Hypertens*, 8(9), 614-623. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2014.05.007>
- Miyoshi, K., Miyoshi, T., & Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, 284(2), 95-103. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0556-1>
- Mo, C., Ke, J., Zhao, D., & Zhang, B. (2020). Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in bone metabolism. *J Bone Miner Metab*, 38(6), 772-779. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01132-y>
- Motedayyen, H., Ghotloo, S., Saffari, M., Sattari, M., & Amid, R. (2015). Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol*, 86(12), 1380-1385. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150319>
- Nakai, K., Kawato, T., Morita, T., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tonogi, M., Oki, H., & Maeno, M. (2015). Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized

nodule formation via AT1 receptor in ROS17/2.8 cells. *Arch Med Sci*, 11(3), 628-637. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.52369>

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & Crombrugge, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00622-5)

Namsolleck, P., Recarti, C., Foulquier, S., Steckelings, U. M., & Unger, T. (2014). AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep*, 16(2), 416. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0416-6>

Naylor, K., & Eastell, R. (2012). Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol*, 8(7), 379-389. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.86>

Nemeth, K., Schoppet, M., Al-Fakhri, N., Helas, S., Jessberger, R., Hofbauer, L. C., & Goettsch, C. (2011). The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology. *J Immunol*, 186(1), 13-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002483>

Newman, M. G., Takei, H. H., & Carranza, F. n. A. (2006). *Carranza's clinical periodontology* (10th ed.). Saunders/Elsevier.

Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. n. A. (2014). *Carranza's clinical periodontology* (12th ed.). Elsevier/Saunders.

Nogueira, A. V., de Souza, J. A., de Molon, R. S., Pereira Eda, S., de Aquino, S. G., Giannobile, W. V., & Cirelli, J. A. (2014). HMGB1 localization during experimental periodontitis. *Mediators Inflamm*, 2014, 816320. <https://doi.org/10.1155/2014/816320>

Ohki, T., Itabashi, Y., Kohno, T., Yoshizawa, A., Nishikubo, S., Watanabe, S., Yamane, G., & Ishihara, K. (2012). Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am Heart J*, 163(2), 164-167. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2011.10.012>

Ohta, K., Kim, S., & Iwao, H. (1996). Role of angiotensin-converting enzyme, adrenergic receptors, and blood pressure in cardiac gene expression of spontaneously hypertensive rats during development. *Hypertension*, 28(4), 627-634. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.28.4.627>

Ohuchi, N., Hayashi, K., Koike, K., Kizawa, Y., Kusama, T., Ohsawa, M., Taniguchi, Y., Iwamoto, K., Sano, M., & Murakami, H. (2004). Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 137(3), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.02.003>

Okada, H., Inoue, T., Kikuta, T., Watanabe, Y., Kanno, Y., Ban, S., Sugaya, T., Horiuchi, M., & Suzuki, H. (2006). A possible anti-inflammatory role of angiotensin II type 2 receptor in immune-mediated glomerulonephritis during type 1 receptor blockade. *Am J Pathol*, 169(5), 1577-1589. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060178>

Okada, M., Harada, T., Kikuzuki, R., Yamawaki, H., & Hara, Y. (2009). Effects of telmisartan on right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats. *J Pharmacol Sci*, 111(2), 193-200. <https://doi.org/10.1254/jphs.09112fp>

Okada, M., Kosaka, N., Hoshino, Y., Yamawaki, H., & Hara, Y. (2010). Effects of captopril and telmisartan on matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions and

development of left ventricular fibrosis induced by isoprenaline in rats. *Biol Pharm Bull*, 33(9), 1517-1521. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1517>

Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27, 282-293. <https://doi.org/10.1253/jcj.27.282>

Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.028>

Oliveira, S. H. P., Brito, V. G. B., Frasnelli, S. C. T., Ribeiro, B. D. S., Ferreira, M. N., Queiroz, D. P., Beltan, C. T., Lara, V. S., & Santos, C. F. (2019). Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice With Periodontal Disease. *Front Pharmacol*, 10, 708. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00708>

Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifkova, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., & Whelton, P. K. (2018). Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 18014. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>

Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, 77(1), 4-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154452>

Pan, C., Chen, H., Wang, L., Yang, S., Fu, H., Zheng, Y., Miao, M., & Jiao, B. (2012). Down-regulation of MiR-127 facilitates hepatocyte proliferation during rat liver regeneration. *PLoS One*, 7(6), e39151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039151>

Paraskevas, S., Huizinga, J. D., & Loos, B. G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, 35(4), 277-290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01173.x>

Patel, M. N., Bernard, W. G., Milev, N. B., Cawthorn, W. P., Figg, N., Hart, D., Prieur, X., Virtue, S., Hegyi, K., Bonnafous, S., Bailly-Maitre, B., Chu, Y., Griffin, J. L., Mallat, Z., Considine, R. V., Tran, A., Gual, P., Takeuchi, O., Akira, S., . . . Sethi, J. K. (2015). Hematopoietic IKBKE limits the chronicity of inflammasome priming and metaflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 506-511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414536112>

Paul, M., Poyan Mehr, A., & Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86(3), 747-803. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2005>

Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., Garcia, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., & Lavandero, S. (2020). Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 17(2), 116-129. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>

Peng, W., Zhu, S., Li, X., Weng, J., & Chen, S. (2017). miR-27b-3p Suppressed Osteogenic Differentiation of Maxillary Sinus Membrane Stem Cells by Targeting Sp7. *Implant Dent*, 26(4), 492-499. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000637>

Perez-Castrillon, J. L., Silva, J., Justo, I., Sanz, A., Martin-Luquero, M., Igea, R., Escudero, P., Pueyo, C., Diaz, C., Hernandez, G., & Duenas, A. (2003). Effect of quinapril, quinapril-hydrochlorothiazide, and enalapril on the bone mass of hypertensive subjects: relationship with angiotensin converting enzyme polymorphisms. *Am J Hypertens*, 16(6), 453-459. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(03\)00845-8](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(03)00845-8)

- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499), 1809-1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- Pizauro, J. M., Ciancaglini, P., & Leone, F. A. (1995). Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. *Mol Cell Biochem*, 152(2), 121-129. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751158>
- Plessas, A. (2014). Nonsurgical periodontal treatment: review of the evidence. *Oral Health Dent Manag*, 13(1), 71-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603920>
- Potje, S. R., Munhoz, F. C., Perassa, L. A., Graton, M. E., Pereira, A. A., Nakamune, A. C., da Silva, R. S., Bendhack, L. M., Sumida, D. H., & Antoniali, C. (2014). Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO₃⁺, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 741, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.008>
- Prele, C. M., Horton, M. A., Caterina, P., & Stenbeck, G. (2003). Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp Cell Res*, 282(1), 24-34. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5668>
- Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., & Taylor, R. (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1), 21-31. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2342-y>
- Puttnam, R., Davis, B. R., Pressel, S. L., Whelton, P. K., Cushman, W. C., Louis, G. T., Margolis, K. L., Oparil, S., Williamson, J., Ghosh, A., Einhorn, P. T., Barzilay, J. I., Antihypertensive, & Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial Collaborative Research, G. (2017). Association of 3 Different Antihypertensive Medications With Hip and Pelvic Fracture Risk in Older Adults: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*, 177(1), 67-76. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.6821>
- Rai, R., Thiagarajan, S., Mohandas, S., Natarajan, K., Shanmuga Sekar, C., & Ramalingam, S. (2010). Haim Munk syndrome and Papillon Lefevre syndrome--allelic mutations in cathepsin C with variation in phenotype. *Int J Dermatol*, 49(5), 541-543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04300.x>
- Ramchandran, R., & Chaluvally-Raghavan, P. (2017). miRNA-Mediated RNA Activation in Mammalian Cells. *Adv Exp Med Biol*, 983, 81-89. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9_6
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W191-W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- Redlich, K., & Smolen, J. S. (2012). Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*, 11(3), 234-250. <https://doi.org/10.1038/nrd3669>
- Reimand, J., Isserlin, R., Voisin, V., Kucera, M., Tannus-Lopes, C., Rostamianfar, A., Wadi, L., Meyer, M., Wong, J., Xu, C., Merico, D., & Bader, G. D. (2019). Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape

and EnrichmentMap. *Nat Protoc*, 14(2), 482-517. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0103-9>

Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., & Heinegard, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), 4473-4475. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1693772>

Rianon, N., Ambrose, C. G., Pervin, H., Garcia, M., Mama, S. K., Schwartz, A. V., Lee, B., & Harris, T. (2017). Long-term use of angiotensin-converting enzyme inhibitors protects against bone loss in African-American elderly men. *Arch Osteoporos*, 12(1), 94. <https://doi.org/10.1007/s11657-017-0387-3>

Riolo, G., Cantara, S., Marzocchi, C., & Ricci, C. (2020). miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation. *Methods Protoc*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/mps4010001>

Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol*, 82, 485-506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>

Robson, J. E., Eaton, S. A., Underhill, P., Williams, D., & Peters, J. (2012). MicroRNAs 296 and 298 are imprinted and part of the GNAS/Gnas cluster and miR-296 targets IKBKE and Tmed9. *RNA*, 18(1), 135-144. <https://doi.org/10.1261/rna.029561.111>

Rodan, G. A., & Martin, T. J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 289(5484), 1508-1514. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10968781>

Rodriguez, J. P., Gonzalez, M., Rios, S., & Cambiazo, V. (2004). Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J Cell Biochem*, 93(4), 721-731. <https://doi.org/10.1002/jcb.20234>

Ross, F. P., Chappel, J., Alvarez, J. I., Sander, D., Butler, W. T., Farach-Carson, M. C., Mintz, K. A., Robey, P. G., Teitelbaum, S. L., & Cheresch, D. A. (1993). Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, 268(13), 9901-9907. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486670>

Rothman, A. M., MacFadyen, J., Thuren, T., Webb, A., Harrison, D. G., Guzik, T. J., Libby, P., Glynn, R. J., & Ridker, P. M. (2020). Effects of Interleukin-1beta Inhibition on Blood Pressure, Incident Hypertension, and Residual Inflammatory Risk: A Secondary Analysis of CANTOS. *Hypertension*, 75(2), 477-482. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13642>

Roy, M., Gastaldi, G., Courvoisier, D. S., Mombelli, A., & Giannopoulou, C. (2019). Periodontal health in a cohort of subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Exp Dent Res*, 5(3), 243-249. <https://doi.org/10.1002/cre2.178>

Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A., & Jones, P. A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 9(6), 435-443. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.020>

Saiyed, A. N., Vasavada, A. R., & Johar, S. R. K. (2022). Recent trends in miRNA therapeutics and the application of plant miRNA for prevention and treatment of human diseases. *Futur J Pharm Sci*, 8(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s43094-022-00413-9>

Santos, C. F., Akashi, A. E., Dionisio, T. J., Sipert, C. R., Didier, D. N., Greene, A. S., Oliveira, S. H., Pereira, H. J., Becari, C., Oliveira, E. B., & Salgado, M. C. (2009). Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol*, *80*(1), 130-139. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080264>

Santos, C. F., Morandini, A. C., Dionisio, T. J., Faria, F. A., Lima, M. C., Figueiredo, C. M., Colombini-Ishikiriama, B. L., Sipert, C. R., Maciel, R. P., Akashi, A. P., Souza, G. P., Garlet, G. P., Rodini, C. O., Amaral, S. L., Becari, C., Salgado, M. C., Oliveira, E. B., Matus, I., Didier, D. N., & Greene, A. S. (2015). Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One*, *10*(8), e0134601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134601>

Saravi, B., Li, Z., Lang, C. N., Schmid, B., Lang, F. K., Grad, S., Alini, M., Richards, R. G., Schmal, H., Sudkamp, N., & Lang, G. M. (2021). The Tissue Renin-Angiotensin System and Its Role in the Pathogenesis of Major Human Diseases: Quo Vadis? *Cells*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/cells10030650>

Schiffrin, E. L., Thome, F. S., & Genest, J. (1984). Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension*, *6*(5), 682-688. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.6.5.682>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, *9*(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schou, S., Holmstrup, P., Worthington, H. V., & Esposito, M. (2006). Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clin Oral Implants Res*, *17 Suppl 2*, 104-123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01347.x>

Shahveisi, K., Mousavi, S. H., Hosseini, M., Rad, A. K., Jalali, S. A., Rajaei, Z., Sadeghnia, H. R., & Hadjzadeh, M. A. (2014). The role of local renin-angiotensin system on high glucose-induced cell toxicity, apoptosis and reactive oxygen species production in PC12 cells. *Iran J Basic Med Sci*, *17*(8), 613-621. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422756>

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, *13*(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>

Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, M. K., Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T., & Morishita, R. (2008). Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J*, *22*(7), 2465-2475. <https://doi.org/10.1096/fj.07-098954>

Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, M. K., Nakagami, F., Kunugiza, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Rakugi, H., Ogihara, T., & Morishita, R. (2009). Prevention of osteoporosis by angiotensin-converting enzyme inhibitor in spontaneous hypertensive rats. *Hypertens Res*, *32*(9), 786-790. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.99>

Siddiqui, J. A., & Partridge, N. C. (2016). Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*, *31*(3), 233-245. <https://doi.org/10.1152/physiol.00061.2014>

Simao, A. M., Beloti, M. M., Cezarino, R. M., Rosa, A. L., Pizauro, J. M., & Ciancaglini, P. (2007). Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146(4), 679-687. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.05.008>

Simoes e Silva, A. C., Silveira, K. D., Ferreira, A. J., & Teixeira, M. M. (2013). ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*, 169(3), 477-492. <https://doi.org/10.1111/bph.12159>

Simonson, B., & Das, S. (2015). MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini Rev Med Chem*, 15(6), 467-474. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150324123208>

Slany, A., Haudek-Prinz, V., Meshcheryakova, A., Bileck, A., Lamm, W., Zielinski, C., Gerner, C., & Drach, J. (2014). Extracellular matrix remodeling by bone marrow fibroblast-like cells correlates with disease progression in multiple myeloma. *J Proteome Res*, 13(2), 844-854. <https://doi.org/10.1021/pr400881p>

Soler, M. J., Ye, M., Wysocki, J., William, J., Lloveras, J., & Batlle, D. (2009). Localization of ACE2 in the renal vasculature: amplification by angiotensin II type 1 receptor blockade using telmisartan. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296(2), F398-405. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90488.2008>

Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2009). microRNAs in inflammation. *Int Rev Immunol*, 28(6), 535-561. <https://doi.org/10.3109/08830180903208303>

Soubrier, F., Hubert, C., Testut, P., Nadaud, S., Alhenc-Gelas, F., & Corvol, P. (1993). Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J Hypertens*, 11(5), 471-476. <https://doi.org/10.1097/00004872-199305000-00001>

Souza, P. P., Fukada, S. Y., Cunha, F. Q., Costa, C. A., & Costa-Neto, C. M. (2007). Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regul Pept*, 140(1-2), 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.11.008>

Souza, P. P., & Lerner, U. H. (2013). The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest*, 42(7), 555-622. <https://doi.org/10.3109/08820139.2013.822766>

Steffensen, B., Duong, A. H., Milam, S. B., Potempa, C. L., Winborn, W. B., Magnuson, V. L., Chen, D., Zardeneta, G., & Klebe, R. J. (1992). Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol*, 63(7), 584-592. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.7.584>

Stein, G. S., & Lian, J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 14(4), 424-442. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-424>

Stoecklin-Wasmer, C., Guarnieri, P., Celenti, R., Demmer, R. T., Kerschull, M., & Papananou, P. N. (2012). MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res*, 91(10), 934-940. <https://doi.org/10.1177/0022034512456551>

Stohr, J., Barbaresko, J., Neuenschwander, M., & Schlesinger, S. (2021). Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Sci Rep*, 11(1), 13686. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93062-6>

Strovas, T. J., Rosenberg, A. B., Kuypers, B. E., Muscat, R. A., & Seelig, G. (2014). MicroRNA-based single-gene circuits buffer protein synthesis rates against perturbations. *ACS Synth Biol*, 3(5), 324-331. <https://doi.org/10.1021/sb4001867>

Sukumaran, V., Veeraveedu, P. T., Gurusamy, N., Lakshmanan, A. P., Yamaguchi, K., Ma, M., Suzuki, K., Kodama, M., & Watanabe, K. (2012). Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci*, 90(7-8), 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.11.018>

Sun, L., Lian, J. X., & Meng, S. (2019). MiR-125a-5p promotes osteoclastogenesis by targeting TNFRSF1B. *Cell Mol Biol Lett*, 24, 23. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0146-0>

Tada, A., Tano, R., & Miura, H. (2022). The relationship between tooth loss and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 12(1), 13311. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17363-0>

Tan, K., Peng, Y. T., & Guo, P. (2018). MiR-29a promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via targeting HDAC4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(11), 3318-3326. https://doi.org/10.26355/eurev_201806_15151

Tan, P., Guan, H., Xie, L., Mi, B., Fang, Z., Li, J., & Li, F. (2015). FOXO1 inhibits osteoclastogenesis partially by antagonizing MYC. *Sci Rep*, 5, 16835. <https://doi.org/10.1038/srep16835>

Terenzi, R., Manetti, M., Rosa, I., Romano, E., Galluccio, F., Guiducci, S., Ibbamanneschi, L., & Matucci-Cerinic, M. (2017). Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) as a novel modulator of inflammation in rheumatoid arthritis synovium. *Sci Rep*, 7(1), 13293. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13746-w>

Teughels, W., Dhondt, R., Dekeyser, C., & Quirynen, M. (2014). Treatment of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 65(1), 107-133. <https://doi.org/10.1111/prd.12020>

Tezal, M., Grossi, S. G., Ho, A. W., & Genco, R. J. (2001). The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol*, 72(2), 183-189. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.2.183>

Tiyasatkulkovit, W., Promruk, W., Rojviriyaa, C., Pakawanit, P., Chaimongkolnukul, K., Kengkoom, K., Teerapornpantakit, J., Panupinthu, N., & Charoenphandhu, N. (2019). Impairment of bone microstructure and upregulation of osteoclastogenic markers in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep*, 9(1), 12293. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48797-8>

Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost*, 107(4), 605-610. <https://doi.org/10.1160/TH11-12-0836>

Truesdell, S. S., Mortensen, R. D., Seo, M., Schroeder, J. C., Lee, J. H., LeTonqueze, O., & Vasudevan, S. (2012). MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. *Sci Rep*, 2, 842. <https://doi.org/10.1038/srep00842>

Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>

- Veis, D. J., & O'Brien, C. A. (2023). Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annu Rev Pathol*, 18, 257-281. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-040919>
- Vejnar, C. E., Blum, M., & Zdobnov, E. M. (2013). miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res*, 41(Web Server issue), W165-168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt430>
- Wan, Y. (2010). PPARgamma in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, 21(12), 722-728. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.006>
- Wang, C. J., & McCauley, L. K. (2016). Osteoporosis and Periodontitis. *Curr Osteoporos Rep*, 14(6), 284-291. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0330-3>
- Wang, J., Liu, S., Li, J., Zhao, S., & Yi, Z. (2019). Roles for miRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 197. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1309-7>
- Wang, J., Xia, Y., Li, J., & Wang, W. (2021). miR-129-5p in exosomes inhibits diabetes-associated osteogenesis in the jaw via targeting FZD4. *Biochem Biophys Res Commun*, 566, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.05.072>
- Wang, L., You, X., Zhang, L., Zhang, C., & Zou, W. (2022). Mechanical regulation of bone remodeling. *Bone Res*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00190-4>
- Wang, S., & Duan, Y. (2022). LncRNA OIP5-AS1 inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response and promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by sponging miR-92a-3p. *Bioengineered*, 13(5), 12055-12066. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2067291>
- Wang, T., Mo, L., Ou, J., Fang, Q., Wu, H., Wu, Y., & Nandakumar, K. S. (2022). Proteus mirabilis Vesicles Induce Mitochondrial Apoptosis by Regulating miR96-5p/Abca1 to Inhibit Osteoclastogenesis and Bone Loss. *Front Immunol*, 13, 833040. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833040>
- Wang, T., Xu, Y., Liu, X., Zeng, Y., & Liu, L. (2021). miR-96-5p is the tumor suppressor in osteosarcoma via targeting SYK. *Biochem Biophys Res Commun*, 572, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.069>
- Wang, Y., Del Borgo, M., Lee, H. W., Baraldi, D., Hirmiz, B., Gaspari, T. A., Denton, K. M., Aguilar, M. I., Samuel, C. S., & Widdop, R. E. (2017). Anti-fibrotic Potential of AT2 Receptor Agonists. *Front Pharmacol*, 8, 564. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00564>
- Weivoda, M. M., Lee, S. K., & Monroe, D. G. (2021). miRNAs in osteoclast biology. *Bone*, 143, 115757. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115757>
- Wiebe, C. B., Petricca, G., Hakkinen, L., Jiang, G., Wu, C., & Larjava, H. S. (2008). Kindler syndrome and periodontal disease: review of the literature and a 12-year follow-up case. *J Periodontol*, 79(5), 961-966. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070167>
- Wienen, W., Richard, S., Champeroux, P., & Audeval-Gerard, C. (2001). Comparative antihypertensive and renoprotective effects of telmisartan and lisinopril after long-term treatment in hypertensive diabetic rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2(1), 31-36. <https://doi.org/10.3317/jraas.2001.005>
- Wilczynska, A., & Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ*, 22(1), 22-33. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.112>

Woska, J. R., Jr., & Gillespie, M. E. (2012). SNARE complex-mediated degranulation in mast cells. *J Cell Mol Med*, 16(4), 649-656. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01443.x>

Wu, Z., Zhang, Z., Wang, Z., Zhu, H., & Li, M. (2022). MiR-181a-5p Alleviates the Inflammatory Response of PC12 Cells by Inhibiting High-Mobility Group Box-1 Protein Expression. *World Neurosurg*, 162, e427-e435. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2022.03.025>

Xiao, N., Zhang, J., Chen, C., Wan, Y., Wang, N., & Yang, J. (2019). miR-129-5p improves cardiac function in rats with chronic heart failure through targeting HMGB1. *Mamm Genome*, 30(9-10), 276-288. <https://doi.org/10.1007/s00335-019-09817-0>

Xie, Y. F., Shu, R., Jiang, S. Y., Liu, D. L., & Zhang, X. L. (2011). Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *Int J Oral Sci*, 3(3), 125-134. <https://doi.org/10.4248/IJOS11046>

Xu, Y., Ren, C., Zhao, X., Wang, W., & Zhang, N. (2019). microRNA-132 inhibits osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via GDF5 and the NF-kappaB signaling pathway. *Pathol Res Pract*, 215(12), 152722. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152722>

Yamori, Y. J. D. S. (1994). *The spontaneously hypertensive rat In Textbook of Hypertension*. Blackwell Scientific Publications.

Yang, J., Chen, C., Ren, H., Han, Y., He, D., Zhou, L., Hopfer, U., Jose, P. A., & Zeng, C. (2012). Angiotensin II AT(2) receptor decreases AT(1) receptor expression and function via nitric oxide/cGMP/Sp1 in renal proximal tubule cells from Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens*, 30(6), 1176-1184. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3283532099>

Yang, M., Pan, Y., & Zhou, Y. (2014). miR-96 promotes osteogenic differentiation by suppressing HBEGF-EGFR signaling in osteoblastic cells. *FEBS Lett*, 588(24), 4761-4768. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.008>

Yang, Z., Yu, X., Cheng, L., Miao, L. Y., Li, H. X., Han, L. H., & Jiang, W. P. (2013). Effects of enalapril on the expression of cardiac angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 in spontaneously hypertensive rats. *Arch Cardiovasc Dis*, 106(4), 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2013.01.004>

Ye, Y., Liu, Q., Li, C., & He, P. (2021). miR-125a-5p Regulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells under Oxidative Stress. *Biomed Res Int*, 2021, 6684709. <https://doi.org/10.1155/2021/6684709>

Ye, Z., Lu, H., & Liu, P. (2017). Association between essential hypertension and bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(40), 68916-68927. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20325>

Yi, E. T., Liu, R. X., Wen, Y., & Yin, C. H. (2012). Telmisartan attenuates hepatic fibrosis in bile duct-ligated rats. *Acta Pharmacol Sin*, 33(12), 1518-1524. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.115>

Yongtao, Z., Kunzheng, W., Jingjing, Z., Hu, S., Jianqiang, K., Ruiyu, L., & Chunsheng, W. (2014). Glucocorticoids activate the local renin-angiotensin system in bone: possible mechanism for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrine*, 47(2), 598-608. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0196-z>

Yu, S., Luan, J., Liu, Y., Su, Y., & Li, X. (2020). MiR-296 Promotes Osteoblast Differentiation by Upregulating Cbfa1. *Pharmacology*, 105(3-4), 190-201. <https://doi.org/10.1159/000503362>

Yu, Y., Jiang, H., Niu, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Liu, X. I., Qi, T., & Yu, C. (2019). Candesartan inhibits inflammation through an angiotensin II type 1 receptor independent way in human embryonic kidney epithelial cells. *An Acad Bras Cienc*, 91(2), e20180699. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180699>

Yuan, Y., Zhang, H., & Huang, H. (2021). microRNAs in inflammatory alveolar bone defect: A review. *J Periodontal Res*, 56(2), 219-225. <https://doi.org/10.1111/jre.12819>

Zhang, Y., Li, S., Yuan, S., Zhang, H., & Liu, J. (2019). MicroRNA-23a inhibits osteogenesis of periodontal mesenchymal stem cells by targeting bone morphogenetic protein signaling. *Arch Oral Biol*, 102, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.04.001>

Zhang, Y., Wang, K., Song, Q., Liu, R., Ji, W., Ji, L., & Wang, C. (2014). Role of the local bone reninangiotensin system in steroidinduced osteonecrosis in rabbits. *Mol Med Rep*, 9(4), 1128-1134. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1978>

Zhang, Y., Wang, L., Song, Y., Zhao, X., Wong, M. S., & Zhang, W. (2016). Renin inhibitor aliskiren exerts beneficial effect on trabecular bone by regulating skeletal renin-angiotensin system and kallikrein-kinin system in ovariectomized mice. *Osteoporos Int*, 27(3), 1083-1092. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3348-y>

Zhang, Y., Wei, Q. S., Ding, W. B., Zhang, L. L., Wang, H. C., Zhu, Y. J., He, W., Chai, Y. N., & Liu, Y. W. (2017). Increased microRNA-93-5p inhibits osteogenic differentiation by targeting bone morphogenetic protein-2. *PLoS One*, 12(8), e0182678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182678>

Zhang, Y., Xie, R. L., Croce, C. M., Stein, J. L., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. (2011). A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(24), 9863-9868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018493108>

Zhao, H., Ito, Y., Chappel, J., Andrews, N. W., Teitelbaum, S. L., & Ross, F. P. (2008). Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion. *Dev Cell*, 14(6), 914-925. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.022>

Zhao, J., Yang, H., Chen, B., & Zhang, R. (2019). The skeletal renin-angiotensin system: A potential therapeutic target for the treatment of osteoarticular diseases. *Int Immunopharmacol*, 72, 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.023>

Zhou, S., Zhang, G., Wang, K., Yang, Z., & Tan, Y. (2023). miR-141-3p Targeted SIRT1 to Inhibit Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2023, 9094092. <https://doi.org/10.1155/2023/9094092>

Zhou, Y., Chen, X., Zhu, Z., Bi, D., & Ma, S. (2021). MiR-133a delivery to osteoblasts ameliorates mechanical unloading-triggered osteopenia progression in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol*, 97, 107613. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107613>

Zhou, Z., Li, C., Bao, T., Zhao, X., Xiong, W., Luo, C., Yin, G., & Fan, J. (2022). Exosome-Shuttled miR-672-5p from Anti-Inflammatory Microglia Repair Traumatic Spinal Cord Injury by Inhibiting AIM2/ASC/Caspase-1 Signaling Pathway Mediated Neuronal

Pyroptosis. *J Neurotrauma*, 39(15-16), 1057-1074.
<https://doi.org/10.1089/neu.2021.0464>

Zhu, L., Tang, Y., Li, X. Y., Kerk, S. A., Lyssiotis, C. A., Feng, W., Sun, X., Hespe, G. E., Wang, Z., Stemmler, M. P., Brabletz, S., Brabletz, T., Keller, E. T., Ma, J., Cho, J. S., Yang, J., & Weiss, S. J. (2023). A Zeb1/MtCK1 metabolic axis controls osteoclast activation and skeletal remodeling. *EMBO J*, 42(7), e111148.
<https://doi.org/10.15252/emj.2022111148>

Zhu, Z., & Xiong, J. (2022). miR-141-3p Regulates EZH2 to Attenuate Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide-Caused Inflammation and Inhibition of Osteogenic Differentiation in Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Comput Math Methods Med*, 2022, 4634925. <https://doi.org/10.1155/2022/4634925>

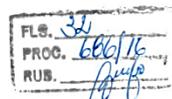
Zou, W., Kitaura, H., Reeve, J., Long, F., Tybulewicz, V. L., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Ross, F. P., & Teitelbaum, S. L. (2007). Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol*, 176(6), 877-888. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611083>

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Papel dos mastócitos e via adrenérgica no metabolismo ósseo e sistêmico em ratos normotensos e hipertensos submetidos a doença periodontal experimental**", Processo FOA nº 00686-2016, sob responsabilidade de Sandra Helena Penha de Oliveira apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 04 de Outubro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 20 de Fevereiro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Março de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Mast cell and adrenergic pathway roles on local and systemic bone metabolism on normotensive and hypertensive rats with experimental periodontal disease**", Protocol FOA nº 00686-2016, under the supervision of Sandra Helena Penha de Oliveira presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 04, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 20, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 20, 2018.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faveram
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO 2 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Participação dos microRNAs nas alterações ósseas locais induzidas pela doença periodontal e pelo sistema resina-angiotensina local em ratos espontaneamente hipertensos**", Processo FOA nº 00383-2020, sob responsabilidade de Sandra Helena Penha de Oliveira apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de Dezembro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 04 de Janeiro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Fevereiro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Participation of microRNAs in local bone alterations induced by periodontal disease and the local renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats**", Protocol FOA nº 00353-2020, under the supervision of Sandra Helena Penha de Oliveira presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 01, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 04, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 04, 2022.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO 3 - RESULTADO DA PROVA DE DEFESA PÚBLICA DE TESE DE DOUTORADO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



PROVA DE DEFESA DE TESE

Programa.....: Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas
Curso.....: Doutorado
Candidato.....: **VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO**
Local.....: Formato Híbrido – no Anfiteatro do CAOE

COMISSÃO EXAMINADORA

- 1.º EXAMINADOR: FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Secretária), Pesquisadora do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária do Câmpus de Araçatuba/UNESP.
- 2.º EXAMINADOR: WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI, Professor Associado do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Disciplina de Bioquímica, do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu/UNESP;
- 3.º EXAMINADOR: JONI AUGUSTO CIRELLI, Professor Associado do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Periodontia, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara/UNESP;
- 4.º EXAMINADOR: CARLOS FERREIRA DOS SANTOS, Professor Titular do Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Farmacologia, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Bauru, da Universidade de São Paulo/USP;
- 5.º EXAMINADOR: SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Presidente), Professora Titular do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba/UNESP.

Araçatuba, 23 de junho de 2023.


FLÁVIA LOMBARDI LOPES
1.º Examinador

por videoconferência
WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI
2.º Examinador

por videoconferência
JONI AUGUSTO CIRELLI
3.º Examinador

por videoconferência
CARLOS FERREIRA DOS SANTOS
4.º Examinador


SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA
5.º Examinador

/crlm

ANEXO 4 - ATA DE DEFESA PÚBLICA DE TESE DE DOUTORADO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

ATA Nº 20

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 23 dias do mês de junho do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO, intitulada **Mecanismos envolvidos na perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal em ratos espontaneamente hipertensos: Papel do sistema renina-angiotensina e microRNAs**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Titular SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial) do(a) Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Prof.Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. CARLOS FERREIRA DOS SANTOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru-USP. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Profa. Titular SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA