

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

**EDUARDO DA CUNHA BOMBARDI**

**ANGIOTENSINA II AUMENTA A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE**  
**CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE RATOS**  
**VIA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1**

**ARAÇATUBA**

**2024**

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

**EDUARDO DA CUNHA BOMBARDI**

**ANGIOTENSINA II AUMENTA A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE  
CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE RATOS  
VIA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1**

Dissertação 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  
Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Titular Sandra Helena Penha de Oliveira

**ARAÇATUBA**  
**2024**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Bombardi, Eduardo da Cunha.

B695a      Angiotensina II aumenta a diferenciação osteogênica  
de células mesenquimais do ligamento periodontal de  
ratos via ativação do receptor de Angiotensina II tipo 1 /  
Eduardo da Cunha Bombardi. - Araçatuba, 2024  
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba  
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Ligamento periodontal 2. Angiotensina II 3. Osteo-  
blastos 4. Sistema Renina-Angiotensina I. T.

CDD 612

## **DADOS CURRICULARES**

**Nascimento:** 11.02.1999, Araçatuba-SP

**Filiação:** João Roberto Bombardi

Rosangela Fátima da Cunha Bombardi

**2017/2020:** Curso de Graduação em Biomedicina, Universidade Paulista de Araçatuba.

**2021/2024:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Modalidade Mestrado Acadêmico, pelo programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, pela Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -UNESP.

*Dedico esse trabalho aos meus pais, João e Rosângela, por todo o apoio fornecido durante minha jornada. Por sempre me permitirem confiar em meus sonhos e por todo o incentivo diante de todas as adversidades e dificuldades que enfrentei no processo. Não teria sido possível sem vocês.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira, por todo o apoio intelectual e acadêmico, pelo conhecimento transmitido e pela estrutura cedida para eu realizar meu projeto, bem como os recursos financeiros disponibilizados.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF) da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), na pessoa de sua coordenação geral, Professora Dra. Rita de Cássia Menegati Dornelles, por tornar possível essa pós-graduação acontecer.

Ao conselho local do programa e seus devidos membros, por colaborarem com a construção e progresso do nosso programa de pós-graduação.

Ao CNPq pela bolsa concedida a mim, sob processo nº 130445/2021-5.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2021/10042-9) e do auxílio pesquisa (nº 2015/03965-2), que financiaram a realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA, em especial aos professores Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto e Dra. Cristina Antoniali Silva, pelos protocolos e técnicas ensinados e pelos reagentes emprestados, sempre presentes apoiando toda a minha trajetória acadêmica.

Aos amigos e colegas de laboratório: Juliane Mendonça, Mariana Quirino, Bianca Ribeiro, Victor Balera, Beatriz Travalon, Tayná Rodrigues e Sabrina Franeli, obrigado desde os momentos de risada até o auxílio em técnicas e protocolos, além de toda a ajuda concedida.

Em especial a Mariana, Victor e Tayná, pela amizade e pelo amparo durante as atividades do dia a dia, pelas risadas em momentos de descontração quando era necessário um alívio diante de situações difíceis, mas também por toda a ajuda acadêmica em discussões de técnicas e resultados, sem vocês três teria sido muito mais difícil a rotina do mestrado durante esses anos.

Aos colegas que a FOA me trouxe, Bianca Ribeiro, Mariana Quirino, Bianca Belardi, Victor Balera, Débora Cavalcante, Thainá Esperança, Beatriz Stringhetta,

Sabrina Frasnelli, Juliane Mendonça, Livia Vilas, Tayná Rodrigues, Renan Barzotti, Mariana Mel, Beatriz Travalon e Yasmin Martins.

Aos funcionários da UNESP/FOA, Cristiane, Valéria e Lucas pelo apoio necessário na secretaria de pós-graduação, a Eliseide pelo apoio como secretária do departamento, ao Sr. João do Biotério Central, e em especial a Sra. Célia do setor da limpeza, por estar sempre presente no dia a dia.

Ao meu companheiro, Giovanni Santos da Conceição, por todo o amparo e parceria durante esse trajeto, por todo o esforço que fez por mim e, principalmente, por todo o apoio emocional nesses anos de pós-graduação, você tornou e torna a minha vida mais leve. Sem você meu mestrado teria sido muito mais desafiador.

Aos meus familiares, principalmente meu pai João Roberto Bombardi, minha mãe Rosângela Fátima da Cunha Bombardi, meu irmão Lucas Bombardi, minha irmã Mariana Bombardi e minha cunhada Ana Claudia Merloto, vocês foram pilares que me apoiaram, me elevaram e tornaram possível a realização do sonho que era eu fazer o mestrado. Todo o apoio financeiro, psicológico e emocional foi primordial para que eu pudesse iniciar e concluir essa jornada com êxito, e em meio as dificuldades vocês trouxeram a esperança. Muito obrigado!

Agradeço também ao Eduardo do passado, por não ter desistido em meio a tantos problemas e tantas adversidade que, no fundo, só eu mesmo sei pelo que passei e pela superação conquistada.

Por fim, agradeço a todos que estiveram presentes e me ajudaram direta ou indiretamente, amigos e familiares, obrigado por todo o apoio, seja de perto ou a distância, obrigado por todo o suporte e estímulo a mim concedido.

“Antes de julgar a minha vida, calce os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri, viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias. Percorra os anos que eu percorri, tropece onde eu tropecei e levante-se assim como eu fiz.”

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

**- Clarice Lispector**



BOMBARDI E. C., **Angiotensina II aumenta a diferenciação osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal de ratos via ativação do receptor de angiotensina II tipo 1**. 2024. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024

## RESUMO

O ligamento periodontal é um tecido mole localizado entre o cemento e o osso alveolar responsável pelo amortecimento da força exercida na mastigação, movimento ortodôntico e pela regeneração do periodonto quando lesionado por patologias. A capacidade de regeneração periodontal se deve pela presença nesse tecido de células tronco, que possuem a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em várias linhagens, sendo denominadas como células-tronco do ligamento periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells*, PDLSc), devido a isso, tais células podem formar inúmeros tecidos. Esse tecido pode controlar o reparo dos tecidos lesionados e é capaz de secretar citocinas e substâncias que controlam a resposta inflamatória, como a angiotensina II (Ang II). Há um sistema renina-angiotensina (SRA) local evidenciado no ligamento periodontal e que pode influenciar na regeneração óssea além de controlar a resposta inflamatória e os danos causados pela mesma, mas sua influência no metabolismo ósseo permanece incerta e não sabemos sua influência na diferenciação osteogênica de PDLSc. O estudo teve como objetivo investigar o papel da Ang II sobre a diferenciação osteogênica das células PDLSc de ratos Wistar e os mecanismos envolvidos no processo. As células PDLSc foram cultivadas em meio controle ou meio osteogênico e estimuladas com Ang II (1000 nM), com ou sem bloqueio do receptor AT1 usando Losartana (2 µM). Durante a diferenciação osteogênica das PDLSc avaliamos a proliferação e/ou viabilidade das células pelo método do MTT nos dias 0, 7 e 10. A atividade da fosfatase alcalina das células foi determinada por kit comercial nos dias 0 e 7. A mineralização das células foi detectada pelo corante vermelho de Alizarina no 14º dia. No sétimo dia avaliamos a expressão dos marcadores de formação óssea (Osteocalcina, Osteopontina, Colágeno tipo I, Sialoproteína óssea) e dos fatores de transcrição (Runx-2, Osterix, β-catenina), por qRT-PCR. Além disso, avaliamos a expressão dos receptores da Ang II do tipo I (AT1) e do tipo II (AT2) por qRT-PCR. Os resultados mostraram que a Ang II nas concentrações de 1000 e 10000 nM potencializaram a diferenciação osteogênica, aumentando a atividade de fosfatase alcalina e a mineralização biológica. O tratamento com Losartana inibiu a mineralização e diminuiu a expressão de genes relacionados à formação óssea. Concluiu-se que a Ang II induziu aumento na diferenciação e mineralização das PDLSc, possivelmente através da ativação do receptor AT1.

**Palavras-chaves:** Ligamento periodontal, Angiotensina II, Osteoblastos, Sistema Renina-angiotensina.

BOMBARDI E. C., **Angiotensin II increases osteogenic differentiation of rat periodontal ligament mesenchymal cells via activating the angiotensin II type 1 receptor**. Dissertation (master's degree). School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), 2024.

### ABSTRACT

The periodontal ligament is a soft tissue between the cementum and the alveolar bone responsible for dampening the force exerted during chewing and orthodontic movement and regenerating the periodontium when injured by pathologies. The capacity for periodontal regeneration is due to the presence in this tissue of stem cells, which can self-renew and differentiate into several lineages, being called periodontal ligament stem cells (Periodontal Ligament Stem Cells, PDLSc). This tissue can control the repair of injured tissues and can secrete cytokines and substances that control the inflammatory response, such as angiotensin II (Ang II). A local renin-angiotensin system (RAS) is evident in the periodontal ligament, which can influence bone regeneration and control the inflammatory response and the damage caused by it. of PDLSc. The study aimed to investigate the role of Ang II on the osteogenic differentiation of PDLSc cells from Wistar rats and the mechanisms involved in the process. PDLSc cells were cultured in a control or osteogenic medium and stimulated with Ang II (1000 nM), with or without AT1 receptor blockade using Losartan (2  $\mu$ M). During the osteogenic differentiation of PDLSc, we evaluated the proliferation and viability of the cells using the MTT method on days 0, 7, and 10. The alkaline phosphatase activity of the cells was determined using a commercial kit on days 0 and 7. Alizarin red dye detected the cells' mineralization on the 14th day. On the seventh day, we evaluated the expression of bone formation markers (Osteocalcin, Osteopontin, Type I Collagen, Bone Sialoprotein) and transcription factors (Runx-2, Osterix,  $\beta$ -catenin) by qRT-PCR. Furthermore, we evaluated the expression of type I (AT1) and type II (AT2) Ang II receptors by qRT-PCR. The results showed that Ang II at concentrations of 1000 and 10000 nM enhanced osteogenic differentiation, increasing alkaline phosphatase activity and biological mineralization. Losartan treatment inhibited mineralization and decreased the expression of genes related to bone formation. It was concluded that Ang II increased the differentiation and mineralization of PDLSc, possibly through the activation of the AT1 receptor.

**Keywords:** Periodontal ligament, Angiotensin II, Osteoblasts, Renin-angiotensin System.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{g/mL}$  – microgramas por mililitro

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{M}$  – micromolar

Agt – angiotensinogênio

Ang I – angiotensina I

Ang II – angiotensina II

AT1 – receptor de angiotensina II tipo 1

AT2 – receptor de angiotensina II tipo 2

Bsp – sialoproteína óssea

cDNA – DNA complementar

$\text{cm}^2$  – centímetro quadrado

Col1a1 – Colágeno tipo 1 subtipo a 1

DEPC – dietilpirocarbonato

DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco, *Dulbecco's Modified Eagle medium*

DNA - ácido desoxirribonucleico

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECA2 – enzima conversora de angiotensina tipo 2

FAL – fosfatase alcalina

$\text{g/L}$  – gramas por litro

$\text{g/mL}$  – gramas por mililitro

MC – meio controle

$\text{mg}$  – miligrama

$\text{mg/mL}$  – miligrama por mililitro

$\text{mL}$  – mililitro

$\text{mM}$  – milimolar

MO – meio osteogênico

MSC – *Mesenchymal stem cell*, células-tronco mesenquimais

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

$\text{nM}$  – nanomolar

Ocn – osteocalcina

OPG – osteoprotegerina

Opn – osteopontina

Osx – osterix

PBS – tampão fosfato-salino, *Phosphate Buffered saline*

PDLSc – células tronco do ligamento periodontal, *Periodontal ligament stem cells*

pH - potencial hidrogeniônico

Pi – pirofosfato

PPi - pirofosfato inorgânico

qRT-PCR - Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa quantitativa em tempo real

rpm – rotações por minuto

Runx2 - fator de transcrição 2 relacionado a runt

SRA – sistema Renina-angiotensina

TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformador beta

U/mL – unidades por mililitro

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Ilustração representativa do periodonto. TC: coroa dentária; TR: raiz do dente; GE: epitélio gengival; TCG: tecido conjuntivo gengival; PDL: ligamento periodontal; AB: osso alveolar, HUGHES, 2015.....16
- Figura 02.** Ilustração esquemática do sistema renina-angiotensina demonstrando as conversões até a obtenção de Angiotensina II e Angiotensina 1-7 e ativação dos respectivos receptores. Imagem feita através do Biorender.com.....20
- Figura 03.** Esquema ilustrativo da técnica de extração dos dentes e obtenção das células empregada. Imagem feita através do Biorender.com.....30
- Figura 04.** 1 - PDLSc de Wistar em cultura, (A) celular na passagem 2 com  $\cong 70\%$  confluência; (B) PDLSc plaqueadas, coloração com *Instant Prov Kit*, Newprov® para demonstrar a morfologia celular. As fotos foram tiradas sob um microscópio óptico com uma câmera digital acoplada (Olympus®) com ampliação de 10x (A) e 4x (B). 2 - Gráfico *Dotplot* dos dados de citometria de fluxo avaliados durante a quarta passagem das células. (A) CD90, (B) CD54, (C) CD31. Os resultados são expressos na porcentagem de células positivas.....36
- Figura 05.** Viabilidade celular e dose-resposta de Ang II em diferentes concentrações em PDLSc de Wistar. 1 - Ensaio MTT nos dias 0 e 7 de PDLSc de Wistar tratado com Ang II em diferentes concentrações (100, 1000 e 10000 nM); 2 – Imagens representativas macroscópicas de culturas coradas com Alizarina vermelha no 14º dia da diferenciação; 3 - quantificação da coloração (As barras representam a média  $\pm$  DP. Os resultados estatísticos são apresentados como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . MC = Meio controle; MO = meio osteogênico.....37
- Figura 06.** Parâmetros bioquímicos de PDLSc de Wistar tratados com Ang II 1000nM durante a diferenciação osteogênica in vitro. Ensaio MTT dos dias 0 e 7 (A) e atividade específica da fosfatase alcalina no dia 7 (B). As barras representam a média  $\pm$  DP. Os resultados estatísticos são apresentados como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . MC

= Meio Controle, MO = Meio Osteogênico.....39

**Figura 07.** qRT-PCR para análise da expressão gênica nas células do ligamento periodontal no dia 7 do tratamento, as comparações foram consideradas significativas quando  $p > 0,05$  (A = Osterix, *Osx*; B = Fator de transcrição 2 relacionado a runt, *Runx2*; C =  $\beta$ -catenina, *Ctnnb1*; D = Osteopontina, *OPN*; E = Sialoproteína óssea, *Bsp*; F = Osteocalcina, *OCN*; G = Colágeno tipo 1 a 1, *Coll1a1*; H = receptor de Angiotensina tipo 1 subtipo a, *Agtr1a*).....40

**Figura 08.** Ensaio do antagonista de AT1 na mineralização in vitro, PDLSc tratado com Ang II e Losartana. Atividade específica da fosfatase alcalina (A), imagens microscópicas representativas (B) de culturas coradas com alizarina vermelha com ampliação de 10x e quantificação da coloração (C). As barras representam a média  $\pm$  DP. Os resultados estatísticos são apresentados como  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $****p < 0,0001$ . MC = Meio controle; MO = Meio Osteogênico.....41

**Figura 09.** Expressão gênica de marcadores ósseos nos dias 7 e 10 de PDLSc de Wistar tratado com Ang II + Losartana, durante diferenciação osteogênica in vitro. Análise qRT-PCR de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Ctnnb1*(C), *Cola1a1* (D), *Bsp* (E), *Opn* (F), *Ocn* (G). As barras representam a média  $\pm$  DP. os resultados estatísticos são apresentados como  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $****p < 0,0001$ , representando uma comparação entre o grupo OM e AngII 1000nM, e o grupo Ang II com o grupo AngII + Los.....42

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	16
1.1 O Ligamento Periodontal.....	16
1.2. Citologia do ligamento periodontal.....	17
1.3. Células tronco do ligamento periodontal (PDLSc).....	17
1.4. Ligamento periodontal e resposta inflamatória.....	18
1.5. Sistema renina-angiotensina.....	19
1.6. Sistema renina-angiotensina e metabolismo ósseo .....	20
2.HIPÓTESE.....	25
3.OBJETIVOS .....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos .....	27
4.MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1. Animais e aspectos éticos .....	29
4.2. Cultura de células tronco do ligamento periodontal de ratos Wistar.....	29
4.3 Caracterização da cultura de células do ligamento periodontal .....	30
4.4. Indução da diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> .....	31
4.5. Ensaio de citotoxicidade da angiotensina II em cultura de células tronco do ligamento periodontal de Wistar .....	31
4.6. Efeito dos receptores na mineralização <i>in vitro</i> .....	32
4.7. Efeito dos receptores sobre a diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal de ratos Wistar .....	32
4.7.1. Proliferação celular .....	33
4.7.2. Atividade da fosfatase alcalina e conteúdo total de proteínas.....	33
4.7.3. Mineralização <i>in vitro</i> .....	33
4.8. Análise de expressão gênica .....	33
4.9. Análises estatísticas .....	34
5. RESULTADOS .....	36

<b>5.1. As células tronco do ligamento periodontal foram positivas para a caracterização como células mesenquimais. ....</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Angiotensina II aumentou a mineralização óssea em células do ligamento periodontal de Ratos Wistar .....</b>	<b>37</b>
<b>5.3. Angiotensina II aumentou atividade de fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica.....</b>	<b>39</b>
<b>5.4. Angiotensina II promove aumento na expressão do receptor tipo 1, de osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5 O tratamento com Losartana reverteu o aumento da atividade da fosfatase alcalina e da mineralização na presença de angiotensina II.....</b>	<b>40</b>
<b>5.6 O tratamento com losartana reduziu a expressão do receptor de angiotensina II do tipo 1 e dos marcadores de formação óssea .....</b>	<b>41</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>8.REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>



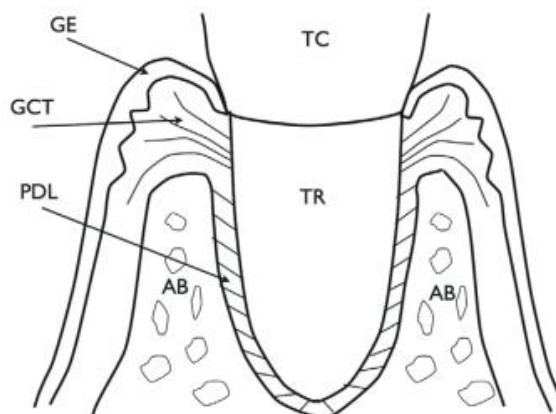
# ***INTRODUÇÃO***

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 O Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo mole que está localizado entre o cemento que cobre a raiz do dente e o osso que forma a parede alveolar. É um tecido conjuntivo bem adaptado para a sua principal função que é dar sustentação aos dentes no osso alveolar, atuando no amortecimento necessário durante a mastigação, evitando danos ao osso alveolar e desempenhando a tração necessária para que a mastigação dos alimentos ocorra corretamente. O ligamento periodontal, além de articular o dente ao osso, atua como um receptor sensorial indispensável para o posicionamento adequado dos ossos gnáticos durante a função normal (BEERTSEN; MCCULLOCH; SODEK, 1997).

O ligamento periodontal contribui para a nutrição dos dentes e exerce um papel-chave na movimentação dentária ortodôntica. Vem sendo destacada sua importante função na remodelação do osso alveolar e tecido periodontal. (BEERTSEN; MCCULLOCH; SODEK, 1997). Sua representação e localização está ilustrada na figura 1, adaptada de HUGHES, 2015.



**Figura 1.** Ilustração representativa do periodonto. TC: coroa dentária; TR: raiz do dente; GE: epitélio gengival; TCG: tecido conjuntivo gengival; PDL: ligamento periodontal; AB: osso alveolar, HUGHES, 2015.

## **1.2. Citologia do ligamento periodontal**

As células que compõem o ligamento periodontal incluem osteoblastos e osteoclastos, fibroblastos, células dos restos epiteliais de Malassez, macrófagos e cementoblastos. Além dessas, células do ligamento periodontal abrigam uma população de células progenitoras que migraram de locais próximos a vasos sanguíneos e espaços endosteais (NSERHAN, 2005). Em 2004, a população de células-tronco mesenquimais (MSCs) foi identificada pela primeira vez em células derivadas do tecido humano da PDL (FINLAY; MEDZHITOV, 2007). Depois disso, muitos pesquisadores também conseguiram isolar células-tronco do ligamento periodontal (*Periodontal ligament stem cells*, PDLSc) não apenas de humanos, mas também de animais, e as caracterizaram em detalhes (AGNIESZKA KRUYNSKA-FREJTAG *et al.*, 2004).

Essas células mesenquimais indiferenciadas possuem propriedades de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens, sendo estas células denominadas de células-tronco do ligamento periodontal (PDLSc, *Periodontal ligament Stem Cells*) (SEO *et al.*, 2004). Além disso, essas células são responsáveis por produzir e secretar periostina, uma importante proteína da matriz extracelular envolvida na homeostase do tecido periodontal e remodelação óssea local (AGNIESZKA KRUYNSKA-FREJTAG *et al.*, 2004).

## **1.3. Células tronco do ligamento periodontal (PDLSc)**

As PDLSc apresentam alta disponibilidade, boa expansão em cultura e forte capacidade de diferenciação celular em múltiplas linhagens, incluindo diferenciação osteogênica e, devido a isso, essas células vêm sendo consideradas como ótimas candidatas para regeneração óssea no reparo do tecido periodontal lesionado por eventuais patologias (YU; ZHOU; WANG, 2014; TSUMANUMA *et al.*, 2011). E condizente com essas características, tais células já demonstraram forte capacidade de

formar estruturas semelhantes ao cimento, tecidos ósseos, novos ligamentos periodontais, e *in vivo* promoveram ainda a formação de nervos periféricos e vasos sanguíneos (PARK; JEON; CHOUNG, 2011; MENICANIN *et al.*, 2014), graças a essas características, esse grupo celular vem alcançando mais visibilidade e relevância. Em estudos recentes, como o estudo de ZHAO *et al* em 2023 foi evidenciado *in vivo* a capacidade regenerativa das PDLSc ao regenerar tecido ósseo da calota craniana mediante lesão induzida, gerando novo tecido ósseo para regenerar a área lesionada, mostrando um potencial clínico muito interessante para esse grupo celular, principalmente no âmbito da medicina regenerativa (ZHAO *et al* 2023).

#### **1.4. Ligamento periodontal e resposta inflamatória**

Além de ter papel importante na regeneração óssea após o processo inflamatório, as células do ligamento periodontal são capazes de, após a estimulação, liberar alguns fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, entre os quais citocinas e quimiocinas que podem controlar a resposta inflamatória. Isso mostra um papel importante dessas células em respostas fisiológicas frente a danos teciduais (AGNIESZKA KRUYNSKA-FREJTAG *et al.*, 2004; YAMADA *et al.*, 2014; KONERMANN *et al.*, 2012).

Em uma revisão de literatura recente, Behm *et al.* (2022) destacaram a relação entre o tecido periodontal, inclusive de PDLSc isoladas e o sistema imunológico, evidenciando que tais células, sob estimulação, modulam significativamente a resposta imune local, afetando várias células do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos, células NK (*Natural Killers*) e linfócitos T. As PDLSc também realizam suas funções imunomoduladoras através da produção e expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . (BEHM; ZHAO; ANDRUKHOV, 2022).

Esses resultados destacam a importância das células PDLSc na resposta imunológica e estabelecem uma conexão direta entre o ligamento periodontal e sua

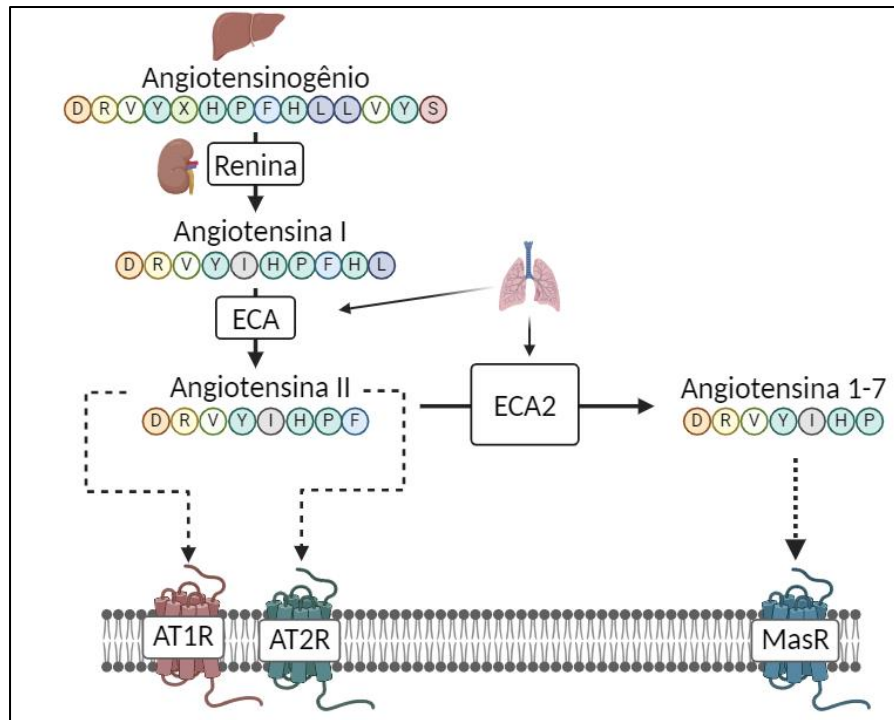
capacidade de modular a inflamação no periodonto, especialmente quando afetado por agentes infecciosos.

### **1.5. Sistema renina-angiotensina**

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções fisiológicas do organismo, como: pressão arterial, equilíbrio hidroeletrolítico, inflamação e liberação de vários hormônios peptídicos. Peptídeos como a vasopressina e o angiotensinogênio (AGT) são liberados e regulados por esse sistema e transportados pelo sistema circulatório como parte do SRA, influenciando a inflamação, o estresse oxidativo, a fibrose e a proliferação celular (PEACH, 1977).

A angiotensina II (Ang II) é um dos principais componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) que está envolvida na regulação de inúmeras funções fisiológicas, como a pressão arterial e equilíbrio hidroeletrolítico, possui ainda um papel importante na inflamação. Resumidamente, a Ang II é formada a partir da renina liberada no sistema circulatório que cliva o angiotensinogênio (AGT) em angiotensina I (1-10, Ang I). Em seguida a Ang I é então clivada pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) e forma angiotensina II (Ang II). (SANTOS *et al.*, 2009)

Esses peptídicos circulantes medeiam suas ações, estimulando vários receptores. A Ang II se liga ao receptor AT1 estimulando o estresse oxidativo, fibrose, proliferação celular e liberação de citocinas e quimiocinas que, por sua vez, medeiam a inflamação do tecido. A ativação do AT2 por Ang II contraria alguns dos efeitos da ativação do AT1, nomeadamente diminuindo a fibrose e a proliferação celular (SANTOS *et al.*, 2009; OHUCHI *et al.*, 2002). Todo esse sistema pode ser observado esquematicamente na figura 2, que ilustra o eixo principal do SRA e a cascata de conversões que levam finalmente a ativação dos receptores.



**Figura 2.** Ilustração esquemática do sistema renina-angiotensina demonstrando as conversões até a obtenção de Angiotensina II e Angiotensina 1-7 e ativação dos respectivos receptores. Imagem feita através do Biorender.com

A mudança na percepção do SRA foi a introdução do conceito de sistemas renina-angiotensina locais ou teciduais. Este conceito foi baseado em descobertas de componentes do SRA em locais improváveis (como a evidência de renina no cérebro), local onde as ações endócrinas do sistema não poderiam explicar a detecção dos componentes em tais tecidos. Isto, por sua vez, levou a novas hipóteses e conceitos funcionais de ações locais de SRA baseadas em sínteses teciduais de ANG II. Atualmente já foi evidenciado SRA local em diversos tecidos, incluindo tecidos orais como tecido gengival e o próprio ligamento periodontal em humanos (PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2015).

### 1.6. Sistema renina-angiotensina e metabolismo ósseo

Por muito tempo foi descrito a importância da angiotensina II e outros componentes do SRA na hipertensão, porém recentemente alguns estudos mostraram que alguns dos bloqueadores do SRA são capazes de reduzir a resposta inflamatória

exercendo influência no equilíbrio do metabolismo ósseo em modelos de ratos com doença periodontal. Isso demonstra parte dos efeitos dos componentes locais do SRA no metabolismo ósseo, principalmente da angiotensina II e a renina no quadro inflamatório, reparo tecidual e na perda óssea alveolar, incluindo trabalhos do nosso grupo de pesquisa. Notavelmente, é uma área de estudo recente e que está em constante progresso (OHUCHI *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2013; FORRESTER *et al.*, 2018; WILKINSON-BERKA *et al.*, 2019).

Alguns desses estudos demonstraram a existência de componentes SRA locais no tecido oral de porquinho-da-índia, fibroblastos gengivais de coelho, gengiva de furão e tecido gengival de ratos (OHUCHI *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2013; FORRESTER *et al.*, 2018; WILKINSON-BERKA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2009; OHUCHI *et al.*, 2002). Em 2007 Souza *et al.* evidenciaram receptores de Ang II em tecido pulpar de ratos; eles investigaram a presença de receptores AT1 e AT2 nesse tecido, fisiologicamente e sob condição de periodontite induzida (SOUZA *et al.*, 2007). Uma descoberta interessante foi o trabalho de Santos *et al.* em 2009 quando descobriram e demonstraram os componentes de SRA local em gengiva de rato, evidenciando receptores AT1, AT2, e descobriram ainda que este sistema foi capaz de gerar angiotensina II, angiotensinogênio e outros peptídeos vasoativos *in vitro*. Além disso, observaram essas expressões sob condições fisiológicas e patológicas por meio da indução de periodontite (SANTOS *et al.*, 2009).

Em outro estudo, Santos *et al.* (2015) evidenciaram SRA local funcional em vários tecidos orais, como tecido gengival e células do ligamento periodontal de humanos *in vitro*, notando a capacidade de tais células em gerar peptídeos e expressar receptores locais para exercer funções no tecido, demonstrando papel em vários mecanismos fisiológicos dessas células (SANTOS *et al.*, 2015).

Em 2019, Oliveira e colaboradores evidenciaram a existência de componentes do SRA locais em tecido gengival de camundongos com doença periodontal. Demonstraram que ao antagonizar a renina, foi possível prevenir significativamente a perda óssea causada pela indução da doença periodontal em camundongos diabéticos e não diabéticos. Estes estudos comprovam o envolvimento desses componentes do SRA local na regulação das proteínas da matriz extracelular após a doença periodontal, e também o efeito pró-inflamatório da ativação de tais componentes (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Vários estudos sugerem o papel dos componentes do SRA na fisiologia óssea. Brito *et al* em 2020 evidenciaram um efeito osteoprotetor ao bloquear o receptor AT1, notando diminuição da perda e da reabsorção óssea (BRITO *et al.*, 2020). Os resultados foram evidenciados ao notar que a angiotensina aumentou a expressão de RANK/RANKL, o que aumenta a atividade de osteoclastos e diminui o eixo OPG que atua na diferenciação osteogênica e na geração de osteoblastos (BRITO *et al.*, 2020).

Adicionalmente, outros estudos mostram os efeitos dos receptores de Ang II na diferenciação osteogênica das células mesenquimais de outros tecidos e origens. Matsushita *et al* (2015) observaram o efeito estimulante do receptor AT2 na diferenciação osteogênica de células mesenquimais humanas (MATSUSHITA *et al.*, 2015). Brito *et al* em 2021 observaram que o Telmisartam promoveu aumento na diferenciação osteogênica *in vitro* de células-tronco mesenquimais estromais de ratos espontaneamente hipertensos ao bloquear o receptor AT1 (BRITO *et al.*, 2021). Lima e colaboradores em 2021 observaram que animais nocaute para o receptor AT1 tiveram alterações na densidade óssea (LIMA *et al.*, 2021).

Em contrapartida, achados anteriores de Querques e colaboradores em 2015 mostraram que o receptor AT1 estimulou um aumento na proliferação de células osteoprogenitoras através de ativação da via do TGF- $\beta$ , e que o bloqueio do AT1 com uso



de Losartana reduziu a diferenciação osteogênica em células mesenquimais provenientes de camundongos (QUERQUES *et al.*, 2015).

Apesar da importância do ligamento periodontal em inúmeras funções fisiológicas e protetoras, como as listadas aqui, não há na literatura uma caracterização adequada das células-tronco do ligamento periodontal de ratos evidenciando sua diferenciação osteogênica, tampouco trabalhos que correlacionem o papel do SRA local na diferenciação osteogênica *in vitro* dessa população celular.

# ***HIPÓTESE***

## **2.HIPÓTESE**

Nossa hipótese é que os receptores AT1 e AT2 modulam a diferenciação osteogênica *in vitro* induzida pela Ang II em células mesenquimais do ligamento periodontal de ratos.

# ***OBJETIVOS***

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar o papel da angiotensina II (Ang II) sobre a diferenciação osteogênica das células mesenquimais do ligamento periodontal (PDLSc) de ratos e os mecanismos envolvidos no processo.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- a) Estabelecer cultura de células mesenquimais do ligamento periodontal de ratos Wistar;
- b) Caracterizar a cultura de células mesenquimais do ligamento periodontal por citometria de fluxo;
- c) Avaliar a viabilidade celular das concentrações de Ang II sobre a diferenciação osteogênica *in vitro* (dia 7), pelo ensaio de MTT, para seleção de concentrações subtóxicas;
- d) Avaliar os parâmetros bioquímicos durante a diferenciação osteogênica *in vitro* da cultura de células do ligamento periodontal estimuladas por Ang II:
  - d.1) Avaliar a proliferação celular, nos dias 0, 7 e 10 (ensaio de MTT);
  - d.2) Dosar o conteúdo total de proteína e atividade da fosfatase alcalina, nos dias 0, 7 e 10 (método colorimétrico e enzimático colorimétrico, respectivamente);
  - d.3) Avaliar a mineralização *in vitro*, no dia 14 (coloração com vermelho de alizarina).
- e) Avaliar a expressão gênica dos marcadores osteogênicos e de matriz óssea (Runx2, Osx,  $\beta$ -catenina, Ocn, Opn, Bsp, Col1a1), nos dias 7 e 10, por RT-PCR em tempo real.
- f) Avaliar a expressão gênica dos receptores AT1 e AT2 nos dias 7 e 10, por RT-PCR em tempo real;
- g) Avaliar o efeito da inibição do receptor AT1 e AT2 utilizando antagonistas específicos (Losartana e PD123319) sobre a diferenciação osteogênica, induzidos pela Ang II utilizando todos os parâmetros descritos acima.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **4.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais e aspectos éticos**

Foram utilizados 10 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), 10-12 semanas, oriundos do Biotério Central, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, com peso médio variando entre 250-300g. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada (22-25°C), ciclo claro/escuro de 12/12 horas, 3 - 4 animais por caixa plástica, recebendo ração padrão e água potável *ad libitum*.

Todos os procedimentos e protocolos experimentais realizados neste estudo foram submetidos e previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia, Campus Araçatuba, UNESP (Processo CEUA FOA 0479/2021)

### **4.2. Cultura de células tronco do ligamento periodontal de ratos Wistar**

Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico inalatório (câmara hermeticamente fechada saturada com Isoflurano; *Isoforine*®, Cristália, Itapina, SP, BR) e borrifados com solução de álcool 70% externamente e na cavidade oral, para fins assépticos.

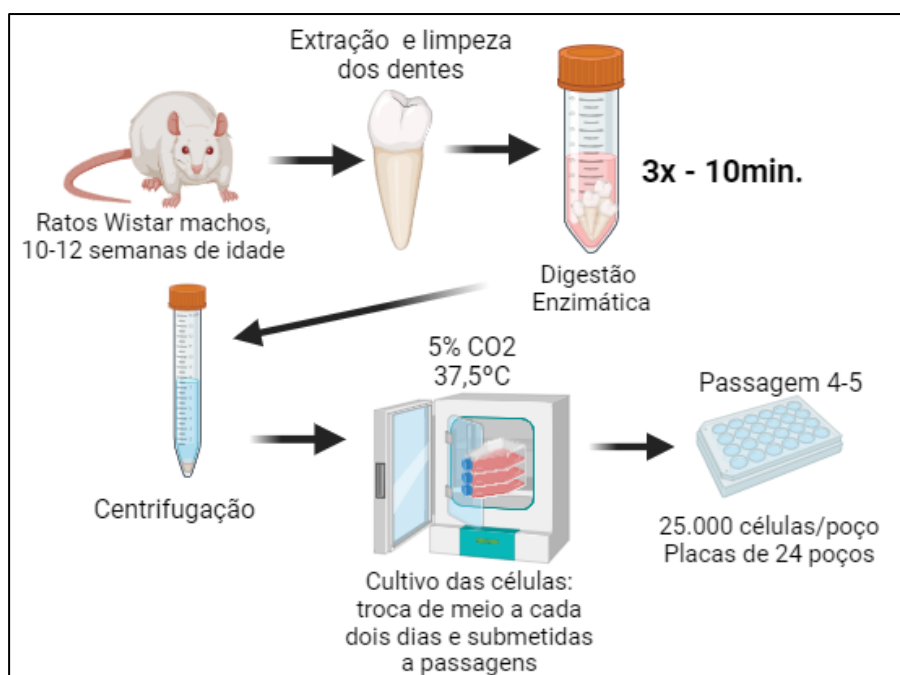
Os dentes incisivos superiores e inferiores foram cuidadosamente extraídos e coletados em meio de cultura gelado, suplementado com 10 vezes a concentração normal de antibióticos afim de prevenir possíveis contaminações oriundas da coleta (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM [Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA], suplementado com L-glutamina 2,0 mM, bicarbonato de sódio 3,7 g/mL, HEPES 2,6 g/L [Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA], 10% de soro fetal bovino e antibióticos [penicilina/estreptomicina 100 U/mL, anfotericina B 0,125 µg/mL e gentamicina 10µg/mL][Gibco]). Brevemente, o tecido gengival e mucosas foram descolados e rebatidos com um bisturi, os dentes luxados do alvéolo com um micro formão e então cuidadosamente extraídos com um porta-agulha.

Os dentes foram levados ao fluxo laminar, onde são limpos dos fragmentos residuais de gengiva e/ou osso alveolar com um bisturi, e internamente com uma lima endodôntica, para total remoção da polpa dental. Os espécimes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS, phosphate-buffered saline, pH 7.4) e em seguida, submetidos juntos em um *pool* a três digestões enzimáticas (tripsina 0,25% com EDTA 1 mM; Gibco) por 10 minutos cada a 37 °C. Os sobrenadantes das digestões foram coletados em tubo limpo contendo o mesmo volume de meio de cultura para inativar a reação enzimática, e

então submetidos à centrifugação (8 min. 1500rpm). Após centrifugação, o pellet obtido é ressuspensionado em 6 mL de meio de cultura e mantidos em placas de 6 poços (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA), sob atmosfera e temperatura controlada (CO<sup>2</sup> 5%, 37,5 °C) com troca do meio de cultura a cada dois dias.

Ao atingir a subconfluência (80-90%) as culturas foram lavadas com PBS e tratadas com solução de tripsina 0,25%/EDTA 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão celular que foi transferida para garrafas de cultura (passagem 1). As culturas foram expandidas até a passagem 4-5, para obtenção da quantidade de células suficientes para realizar os experimentos seguintes.

As culturas em passagem 4 ou 5, em subconfluência (80-90%), foram plaqueadas em placas de 24 poços (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA), na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/poço e submetida aos experimentos seguintes. A técnica de extração e coleta das células está ilustrada na figura 2.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo da técnica de extração dos dentes e obtenção das células empregada. Imagem feita através do Biorender.com

### 4.3 Caracterização da cultura de células do ligamento periodontal

Para caracterizar a população celular e garantir a ausência de contaminação de outros tipos de células realizamos ensaio de citometria de fluxo. Para isso, as culturas na quarta passagem foram lavadas com PBS e tratadas com solução de tripsina 0,25%/EDTA



1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão celular que foi dividida em e em seguida fixadas em paraformaldeído tamponado a 4%, com aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por tubo e incubadas por 30 minutos. Depois, as células foram incubadas por mais 30 min com 10mg/ml de anticorpo monoclonal de rato para diferentes alvos (CD90:RPE; CD54:FITC; e CD31:FITC AbDSerotec, Kidlington, Oxford, OX5 1 GE, UK). Após este tempo, as células foram centrifugadas, o meio sobrenadante foi removido e 1mL de PBS foi adicionado para ressuspensão celular e logo em seguida foi realizado o protocolo de Citometria de fluxo utilizando-se o aparelho e sistema Attune™ focusing cytometer system seguindo as instruções do fabricante (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), e um grupo com IgG controle foi utilizado para excluir a autofluorescência e determinar o *Gate* a ser utilizado.

#### **4.4. Indução da diferenciação osteogênica *in vitro***

Após 24 horas, ou ao atingir 70-80% de confluência, a diferenciação osteogênica foi induzida pela adição do meio osteogênico [MO; meio de cultura suplementado com ácido ascórbico 50 µg/mL, β-glicerofosfato 10 mM e dexametasona 10mM (Sigma-Aldrich)] nos grupos dos quais ele faz parte do tratamento.

#### **4.5. Ensaio de citotoxicidade da angiotensina II em cultura de células tronco do ligamento periodontal de Wistar**

Para eleger concentrações subtóxicas das drogas propostas, as culturas (placa de 24 poços, densidade  $2,5 \times 10^4$  células/poço) serão divididas em 4 grupos experimentais para ser determinada a concentração ideal de Angiotensina II (Sigma-Aldrich):

- Grupo MC: células tratadas apenas com o meio proliferativo (DMEM, meio controle);
- Grupo MO: células tratadas com o meio osteogênico ([MO; meio de cultura suplementado com ácido ascórbico 50 µg/mL, β-glicerofosfato 10 mM e dexametasona 10 mM (Sigma-Aldrich)].
- Grupo 100: células tratadas com o MO + Ang II na concentração de 100 nM.
- Grupo 1000: células tratadas com o MO + Ang II na concentração de 1000 nM.
- Grupo 10000: células tratadas com o MO + Ang II na concentração de 10000 nM.

Concentrações determinadas a partir de dados em literatura e experimentos do próprio grupo de pesquisa (HIRUMA *et al.*, 1997; PIZZATTO *et al.*, 2020; SHIMIZU *et al.*, 2008).

A citotoxicidade da Ang II nas doses estudadas foi avaliada em culturas cultivadas e tratadas por 14 dias, e a viabilidade determinada por ensaio de MTT no dia 7 do tratamento. Brevemente, o meio de cultura foi substituído por 500 µL de solução de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 0,5 mg/mL em meio de cultura sem soro fetal bovino), seguido de incubação de 2 horas (37,5 °C, 5% CO<sup>2</sup>). Posteriormente, a solução de MTT foi removida e o formazan intracelular solubilizado com 0,5 mL de isopropanol e lida a sua absorbância em espectrofotômetro de placas a 570 nm.

Após termos a concentração adequada de Ang II definida, iniciamos o tratamento também junto do antagonista AT1 (Losartan, Sigma-Aldrich), e neste utilizamos a dose já padronizada anteriormente no nosso laboratório para propósitos semelhantes, sendo a concentração de 2µM.

#### **4.6. Efeito dos receptores na mineralização *in vitro***

Para eleger concentrações com efeito sobre a mineralização *in vitro*, as culturas de PDLSC (placa de 24 poços, densidade 2,5 x 10<sup>4</sup> cel. /poço) em meio osteogênico foram expostas a diferentes concentrações de angiotensina II, por 14 dias, e a mineralização foi avaliada pela coloração com alizarina vermelha. Brevemente, as culturas foram lavadas com PBS e fixadas com solução tamponada de formaldeído 4%, por 30 minutos, em seguida, as culturas foram coradas com vermelho de alizarina por 30 minutos (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich; 0,02 g/mL, pH 4.2), o excesso de corante removido por lavagens com água destilada.

Os poços foram examinados e foto documentados em microscópio invertido com câmera digital acoplada. Para análise semiquantitativa, o corante foi extraído com 0,5 mL de hidróxido de amônio 10% sob agitação constante, e a absorbância lida em espectrofotômetro de placas a 405 nm.

#### **4.7. Efeito dos receptores sobre a diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal de ratos Wistar**

Após escolhas das concentrações de trabalho da angiotensina II, a diferenciação osteogênica foi avaliada pelos parâmetros de proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (FAL), mineralização e expressão gênica de fatores de transcrição osteogênicos, de marcadores de formação óssea e dos receptores AT1 e AT2.

#### **4.7.1. Proliferação celular**

A proliferação celular foi determinada nos dias 0 e 7 da diferenciação osteogênica, pelo ensaio de MTT, como descrito no item 4.5.

#### **4.7.2. Atividade da fosfatase alcalina e conteúdo total de proteínas**

A atividade da fosfatase alcalina foi mensurada no dia 7, por método bioquímico colorimétrico, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A Lagoa santa, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, as culturas serão colocadas sobre o gelo e lavadas 3 vezes com PBS gelado. Posteriormente, as culturas são lisadas com tampão de lise gelado (solução de sódio dodecil sulfato 1 mg/mL) e o lisado utilizado para determinação da atividade enzimática e posterior dosagem de proteínas totais. A atividade da fosfatase alcalina foi calculada a partir da medida do tubo padrão e normalizada pelo conteúdo de proteína total que foram determinadas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

#### **4.7.3. Mineralização *in vitro***

A mineralização foi determinada no dia 14, pela coloração com Alizarina Vermelha, como descrito no item 4.6.

#### **4.8. Análise de expressão gênica**

A fim de verificar o efeito da Angiotensina sob a expressão gênica realizamos a análise por RT-qPCR, avaliando a expressão de genes que caracterizam a diferenciação osteogênica: Runx2, Osx, Col1a1, Bsp e dos receptores de Angiotensina Agtr1 e Agtr2. As culturas foram coletadas em 1 mL de Trizol LS (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) e o RNA total extraído seguindo as recomendações do fabricante e dissolvido em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Logo após o RNA total foi quantificado por espectrofotômetro de microplacas Epoch (Biotek®, Winooski, Vermont, EUA) em equipamento Nanodrop Take3 (Biotek), seguindo as recomendações do fabricante e a razão 260/280 nm (indicador de contaminação por proteínas) foi utilizada para análise da qualidade das amostras. Para eliminar possível contaminação por DNA genômico as amostras foram tratadas com kit DNase I (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante e o DNA complementar (cDNA) sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por transcrição reversa, utilizando kit High Capacity Kit RNA-to-cDNA (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), também seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação relativa da expressão gênica dos alvos propostos foi realizada por reações em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) em aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientifics), utilizando sistema TaqMan (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems), com sonda conjugada a fluoróforo FAM e quencher não fluorescente MGB, seguindo as instruções do fabricante.

Os ensaios foram então conduzidos com as amostras na diluição com melhor eficiência de reação, com os reagentes TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems™) e ensaio inventariado, seguindo as etapas de reação como determinado pelo fabricante.

Ensaio inventariado: Runx2 (Runt-related transcription factor 2; Rn01512298\_m1), Osx (Osterix/Sp7 transcription factor, Rn02769744\_s1), Bsp (Bone sialoprotein / integrin-binding sialoprotein, Rn00561414\_m1), Agt1r (Angiotensin II receptor, type 1, Rn02758772\_s1), Agt2r (Angiotensin II receptor type 2, Rn00560677\_s1), Colla1 (Collagen type 1 alpha, Rn01463848\_m1) e Gapdh (Gapdh, Rn01775763\_g1). Os níveis de expressão dos genes alvos foram determinados por método de Ct comparativo, com a equação Quantificação Relativa (RQ) =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e o gene Gapdh foi utilizado como gene endógeno.

#### **4.9. Análises estatísticas**

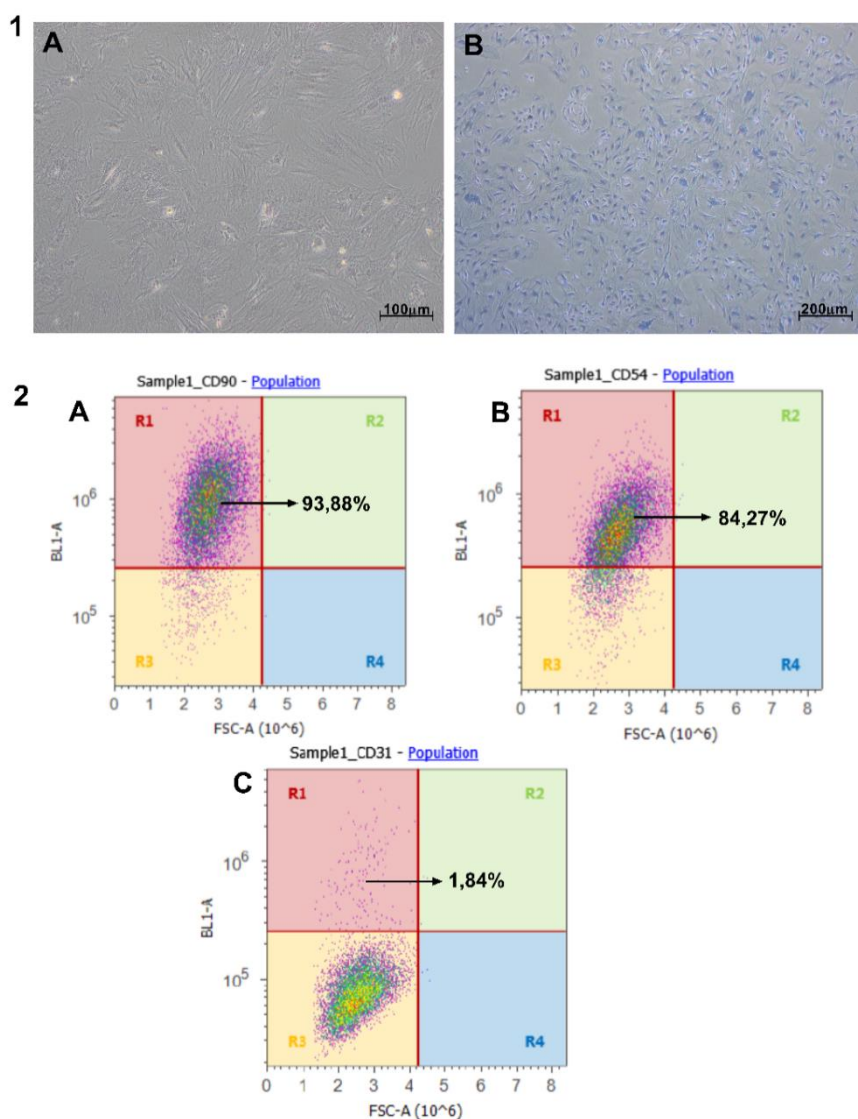
Os dados foram testados para normalidade de distribuição e homoscedasticidade, para validar o uso de testes estatísticos paramétricos. Foi então utilizado a Análise de Variância de um Fator (one-way ANOVA), com teste post-hoc de Tukey, para múltiplas comparações, consideração como diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas em software estatístico GraphPad Prism® versão 8.00 para Windows (GraphPad Software 322 Inc., La Jolla, CA, EUA).

# ***RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

### 5.1. As células tronco do ligamento periodontal foram positivas para a caracterização como células mesenquimais.

As células obtidas apresentaram um bom desenvolvimento em cultura, com adequado espraio, conseguindo se proliferar e atingir a quantidade de células necessárias para realização dos experimentos (Figura 4, painel 1). Ao realizarmos o protocolo de citometria de fluxo conseguimos notar que não houve contaminação por diferentes tipos celulares durante a coleta e obtenção das células. As células obtidas foram positivas na detecção com marcadores de membrana específicos de células mesenquimais (CD90 com 93,88% e CD54 com 84,27%) e não houve presença para os marcadores que podem indicar presença células da linhagem hematopoiética (CD31 com 1,84%) (figura 4, painel 2).

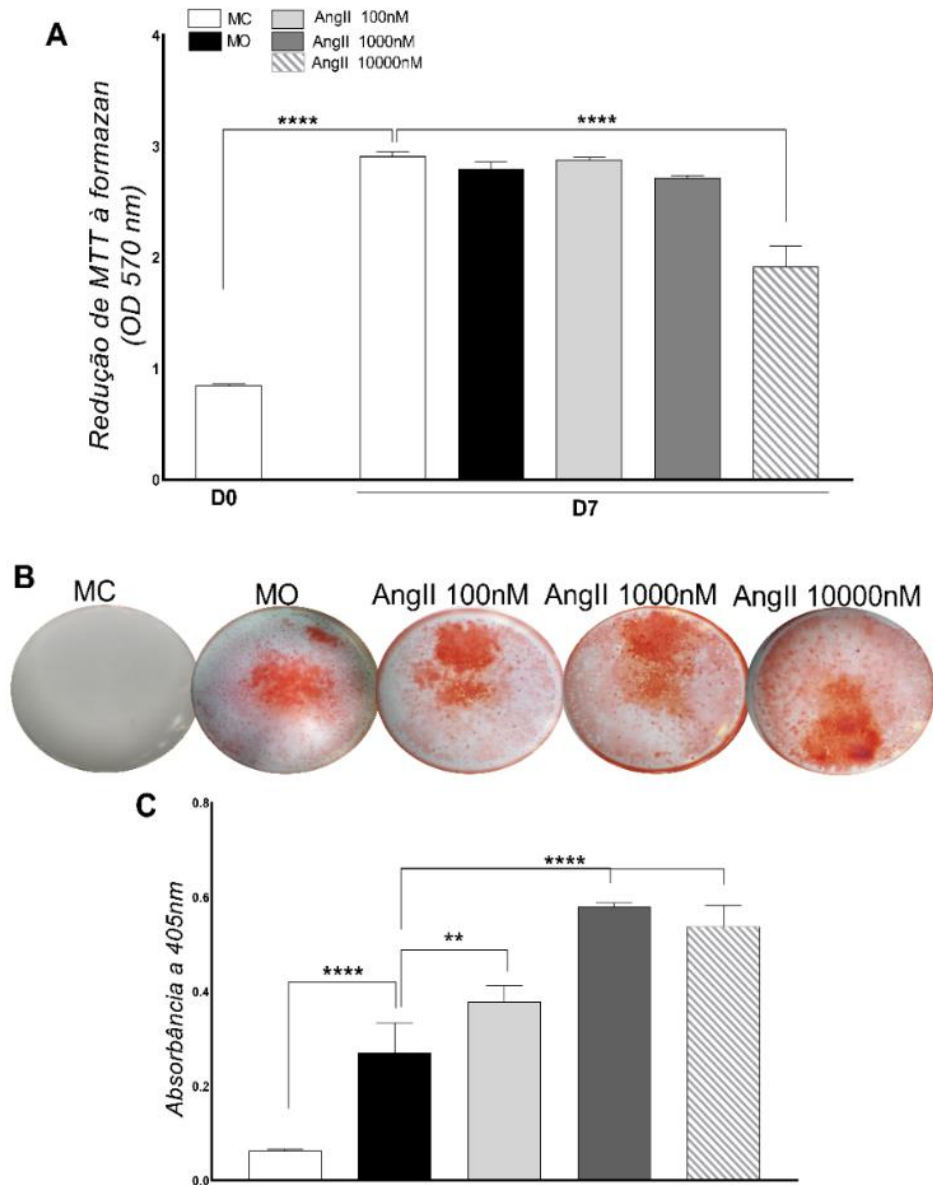


**Figura 4.** 1 - PDLSc de Wistar em cultura, (A) celular na passagem 2 com  $\cong 70\%$  confluência; (B) PDLSc plaqueadas, coloração com *Instant Prov Kit*, Newprov® para demonstrar a morfologia celular. As fotos foram tiradas sob um microscópio óptico com uma câmera digital acoplada (Olympus®) com ampliação de 10x (A) e 4x (B). 2 - Gráfico *Dotplot* dos dados de citometria de fluxo avaliados durante a quarta passagem das células. (A) CD90, (B) CD54, (C) CD31. Os resultados são expressos na percentagem de células positivas.

## **5.2. Angiotensina II aumentou a mineralização óssea em células do ligamento periodontal de Ratos Wistar**

Ao realizamos o ensaio de MTT nos dias 0 e 7 da indução osteogênica notamos que as concentrações escolhidas de Ang II em geral não apresentaram efeitos citotóxicos quando comparados ao MO, exceto a concentração de 10000 nM que pareceu ser tóxica por reduzir a população celular de maneira estatisticamente significativa (Fig. 5-A). Ao observar os efeitos da Ang II na mineralização notamos que a angiotensina II promoveu aumento da mineralização em todas as concentrações utilizadas (100, 1000 e 10000 nM).

No ensaio de concentração-resposta da Ang II em relação a mineralização óssea, notamos aumento na deposição mineral ao corarmos com o vermelho de alizarina nos grupos tratados com MO + Ang II quando comparados ao grupo controle MO. Este aumento foi significativo nas maiores concentrações de Ang II utilizadas, 1000 e 10000nM, como podemos observar na figura 5C. No entanto, como a concentração de 10000 nM foi citotóxica, optamos então por usar a concentração de 1000 nM que aumentou significativamente a mineralização conforme observado na figura 5, B-C.



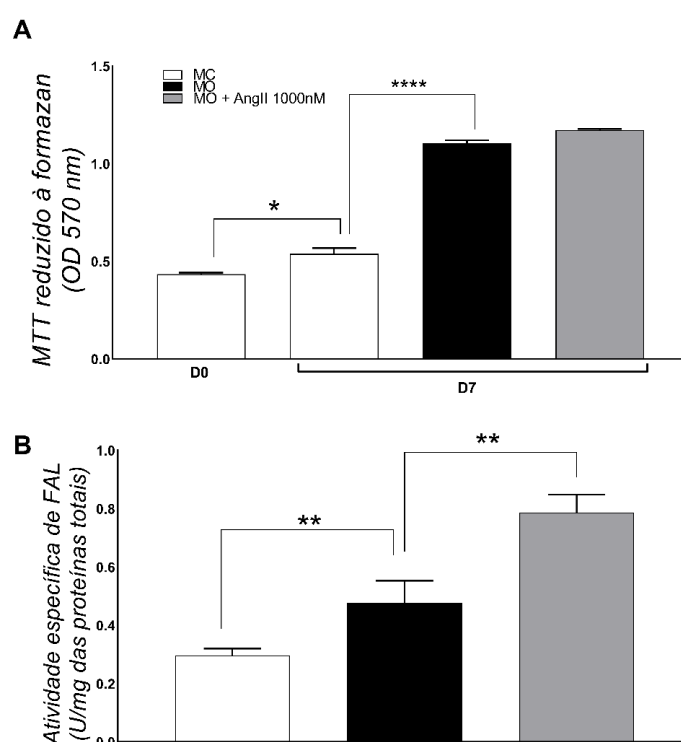
**Figura 5.** Viabilidade celular e dose-resposta de Ang II em diferentes concentrações em PDLSc de Wistar. A - Ensaio MTT nos dias 0 e 7 de PDLSc de Wistar tratado com Ang II em diferentes concentrações (100, 1000 e 10000 nM); B – Imagens representativas macroscópicas de culturas coradas com Alizarina vermelha no 14º dia da diferenciação; C - quantificação da coloração (As barras representam a média  $\pm$  DP. As análises estatísticas são apresentadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . MC = Meio controle; MO = meio osteogênico. (n = 3).



### 5.3. Angiotensina II aumentou atividade de fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica

A viabilidade celular no grupo MO mostrou um perfil crescente ao longo da diferenciação em comparação ao grupo MC, que não foi alterado pela Ang II a 1000 nM no dia 7 (Fig. 6-A).

O aumento da atividade FAL induzido pelo MO foi potencializado pela Ang II a 1000 nM, aumentando significativamente a atividade de FAL no dia 7 de diferenciação (Fig. 6-B).

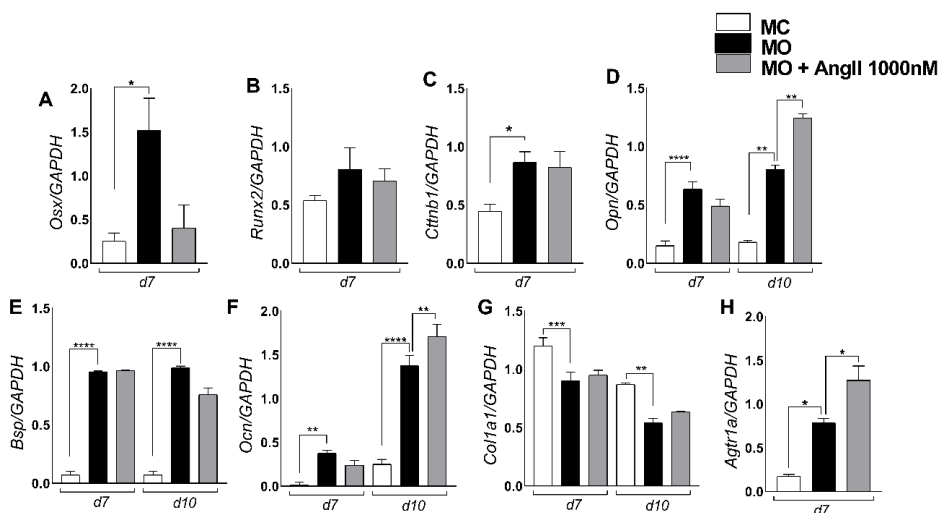


**Figura 6.** Parâmetros bioquímicos de PDLSc de Wistar tratados com Ang II 1000nM durante a diferenciação osteogênica *in vitro*. Ensaio MTT dos dias 0 e 7 (A) e atividade específica da fosfatase alcalina no dia 7 (B). As barras representam a média  $\pm$  DP. As análises estatísticas são apresentadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . MC = Meio Controle, MO = Meio Osteogênico. (n = 3)

### 5.4. Angiotensina II promove aumento na expressão do receptor tipo 1, de osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina

Para avaliar se a Ang II estimula os fatores de transcrição e marcadores de formação óssea, realizamos qRT-PCR. Observamos um aumento na expressão de Osx (Fig. 7-A) e Ctnnb1 (Fig.7-C) no grupo MO em comparação ao grupo MC (Fig. 7-A) no dia 7. No entanto, a Ang II não alterou significativamente esta expressão. Em relação à

expressão dos marcadores de formação óssea, o grupo MO aumentou *Opn* (Fig. 7-D), *Bsp* (Fig. 7-E) e *Ocn* (Fig. 7-F), e diminuiu *Coll1a1* (Fig. 7-G) no dia 7 e 10. A Ang II não apresentou efeito na expressão desses marcadores no dia 7 em comparação ao grupo MO, mas no dia 10 promoveu aumento na expressão de *Opn*, *Bsp* e *Ocn*. A expressão de *Agtr1a* teve aumento significativo no grupo MO e foi potencializada quando tratada com Ang II (Fig. 7-C). A expressão de *Agtr2* não foi detectada em nenhuma das amostras grupo no dia 7, apesar das amostras terem expressado o gene endógeno GAPDH.

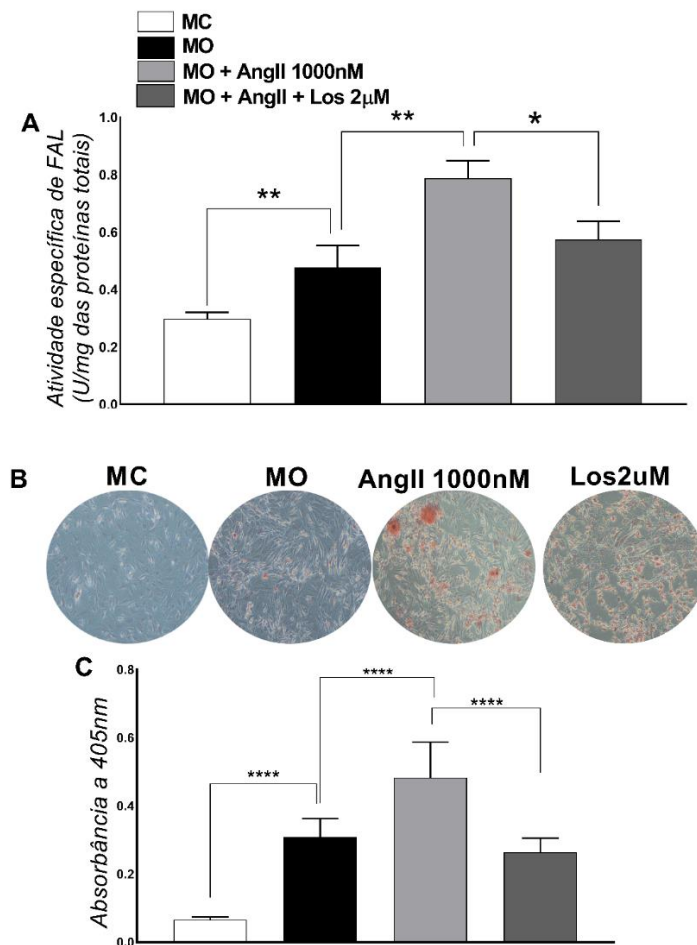


**Figura 7.** qRT-PCR para análise da expressão gênica nas células do ligamento periodontal no dia 7 do tratamento. As comparações foram consideradas significativas quando  $p > 0,05$  (A = Osterix, *Osx*; B = Fator de transcrição 2 relacionado a runt, *Runx2*; C =  $\beta$ -catenina, *Ctnnb1*; D = Osteopontina, *OPN*; E = Sialoproteína óssea, *Bsp*; F = Osteocalcina, *OCN*; G = Colágeno tipo 1 a 1, *Coll1a1*; H = receptor de Ang II tipo 1, *Agtr1a*).

## 5.5 O tratamento com Losartana reverteu o aumento da atividade da fosfatase alcalina e da mineralização na presença de angiotensina II

A atividade específica da FAL foi avaliada no 7º dia de diferenciação osteogênica. Observamos que o MO aumentou a FAL quando comparado ao grupo MC. A Ang II foi capaz de potencializar o aumento da FAL induzido pelo MO. A Losartana reverteu esse aumento retornando aos níveis do grupo MO (Fig. 8-A). Para investigar se o aumento da mineralização induzida pela Ang II dependia da ativação do receptor AT1, realizamos os ensaios, com o antagonista do receptor AT1, Losartana. Como observado anteriormente, o grupo MO induziu a formação de nódulos de deposição de cálcio que foram corados por vermelho de alizarina no dia 14. A Ang II promoveu um aumento na mineralização em comparação ao grupo MO. Losartana (2  $\mu$ M) reverteu significativamente o aumento

da mineralização induzida pela Ang II retornando aos níveis da mineralização induzida pelo MO (Fig. 8 B-C).



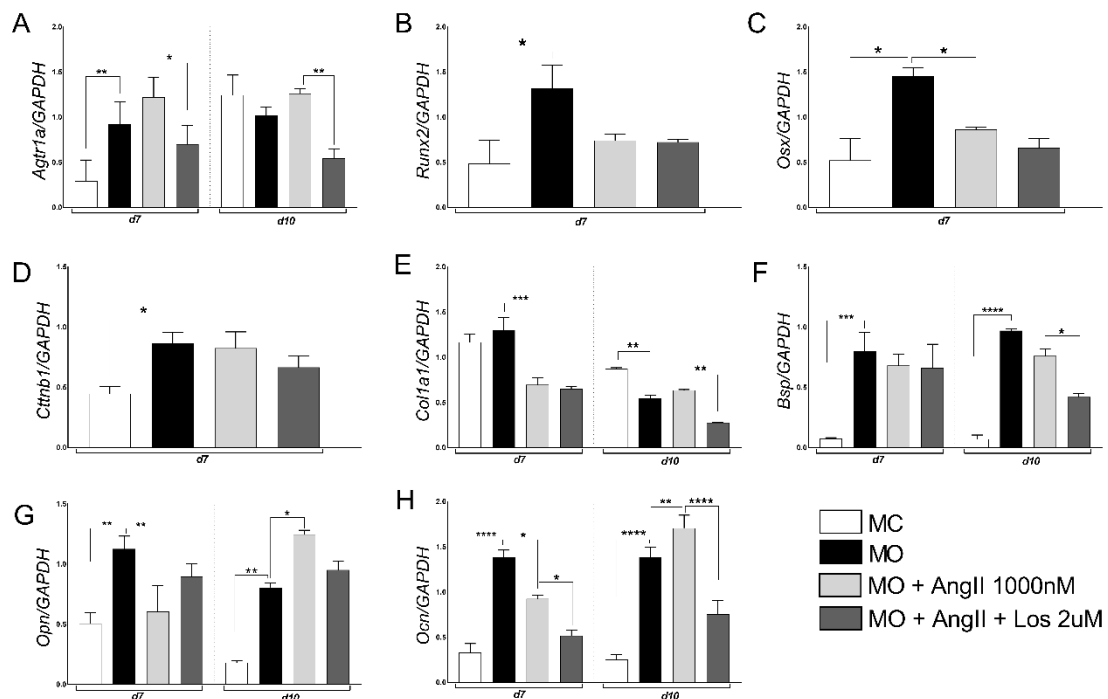
**Figura 8.** Ensaio do antagonista de AT1 na mineralização *in vitro*, PDLSc tratado com Ang II e Losartana. Atividade específica da fosfatase alcalina no dia 07 (A), imagens microscópicas representativas (B) de culturas coradas com alizarina vermelha com ampliação de 10x e quantificação da coloração no dia 14 (C). As barras representam a média  $\pm$  DP. As análises estatísticas são apresentadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . MC = Meio controle; MO = Meio Osteogênico.

## 5.6 O tratamento com losartana reduziu a expressão do receptor de angiotensina II do tipo 1 e dos marcadores de formação óssea

Para avaliar o efeito do bloqueio do receptor AT1 pela losartana sobre o receptor de Ang II do tipo 1 e os marcadores de formação óssea, realizamos qRT-PCR. Observamos uma diminuição da expressão do AT1R no dia 7 em comparação ao grupo controle, entretanto há um aumento na expressão de Agtr1a no dia 10, que é revertido com o tratamento do losartana. Em relação a expressão dos fatores de transcrição, observamos que a expressão de Runx2, Osx e Ctnb1 foi aumentada no grupo MO em

comparação ao grupo MC (Fig. 9 A-C) no dia 7. A adição de Ang II ao MO, observamos uma tendência de diminuição de Runx2, mas não estatisticamente significativa quando comparada ao grupo MO. Quanto a expressão de Osx ocorreu uma inibição na presença de Ang II que foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo MO. Já a expressão de Ctnnb1 não observamos alteração quando da adição de Ang II quando comparada ao grupo MO. A losartana não alterou a expressão desses fatores de transcrição avaliado no 7º dia de diferenciação.

Quanto aos marcadores de formação óssea notamos que o MO aumentou a expressão de Bsp, Opn e Ocn no dia 7 e 10, enquanto a expressão de Colla1 não foi alterada no dia 7 e diminuiu quando comparado ao grupo MC (Fig. 9 F-H) no dia 10. A Ang II aumentou a expressão de Colla1, Opn e Ocn, com relação ao grupo MO e não alterou a expressão de Bsp. O tratamento com a losartana reduziu significativamente a expressão de Colla1, Bsp, Opn e Ocn em comparação ao grupo Ang II (figura 9).



**Figura 9.** Expressão gênica por qRT-PCR nos dias 7 e 10 de PDLSc de Wistar tratado com Ang II + Losartana, durante diferenciação osteogênica *in vitro*. Análise qRT-PCR de Agtr1a(A), Runx2 (B), Osx (C), Ctnnb1(D), Cola1a1 (E), Bsp (F), Opn (G), Ocn (H). As barras representam a média  $\pm$  DP. A análise estatística foi apresentada como  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,0001$ , representando uma comparação entre o grupo OM e Ang II 1000nM, e o grupo Ang II com o grupo Ang II + Los. (n = 1)

# ***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que as PDLSc podem se diferenciar em osteoblastos e a Ang II potencializou a mineralização via ativação do receptor AT1, visto que o tratamento com losartana inibiu essa diferenciação por inibir os marcadores de formação óssea.

Como as PDLSc podem se autorrenovar e se diferenciar em outros tecidos, um ponto importante foi avaliar a presença de células-tronco na cultura de células do ligamento periodontal e a ausência de outras populações celulares. A cultura celular foi caracterizada e observamos marcação positiva de células com marcadores de membrana específicos para células-tronco (CD90 (93,88%) e CD54 (84,27%)) e não notamos detecção significativa para marcadores de células hematopoiéticas (CD31 com 1,84%). Apesar de observarmos 1,84% de células da linhagem hematopoiética como a cultura é longa, dura 14 dias este tipo celular vai entrando em apoptose e assim sendo descartada na troca de meio que ocorre a cada 2 dias. Dessa forma, podemos excluir que tivéssemos uma elevada contaminação por este tipo celular proveniente da técnica de coleta empregada. Corroborando com nossos dados, Banavar e colaboradores (2021) também realizou a caracterização de células obtidas do ligamento periodontal humano ao estabelecer essa cultura e comprovar sua diferenciação em múltiplas linhagens. A caracterização de células-tronco de diferentes tecidos também foi observada pelos mesmos marcadores de membrana (BANAVAR *et al.*, 2021; MUNISWAMI; KANAKASABAPATHY; THARION, 2017)

Quanto à diferenciação osteogênica, PDLSc conseguiram se diferenciar em osteoblastos, como observamos em nosso estudo, onde notamos aumento na proliferação, atividade de FAL e deposição mineral quando comparamos o grupo MO ao grupo MC. Corroborando com nossos dados, Di Wu e Lan Ma (2020) observaram o mesmo perfil durante o processo de diferenciação osteogênica: aumento da proliferação celular, deposição mineral e FAL em células do ligamento periodontal humano no dia 7 (WU; MA, 2020). Notavelmente, a proliferação celular é esperada durante o início da diferenciação osteogênica, conforme descrito por Toshihisa Komori em 2019, pois a proliferação é ativada por uma série de fatores de transcrição, como Runx2 e Osterix. Além disso, a FAL desempenha um papel crucial na mineralização e deposição mineral, hidrolisando o PPI em Pi, que será utilizado pela célula juntamente com o cálcio na

formação e secreção de cristais de hidroxiapatita na formação da matriz óssea extracelular. (KOMORI, 2019)

Nosso estudo mostrou que a Ang II aumentou a mineralização óssea no dia 14 nas concentrações de 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM. Além disso, definimos a melhor dose por meio de testes de citotoxicidade e concentração-resposta, onde observamos que a concentração de 10.000 nM foi citotóxica. A concentração de Ang II utilizada em nosso estudo foi baseada em estudos da literatura que utilizaram Ang II, como o estudo de Zhang *et al* (ZHANG *et al.*, 2020). Apesar das concentrações de 100 e 1000 nM aumentarem a mineralização, a de 1000 nM apresentou um aumento mais considerável, por isso optamos por utilizá-la nos estudos seguintes.

Quanto à influência da Ang II no metabolismo ósseo, não há consenso entre os dados descritos na literatura. Em nosso estudo observamos que a Ang II nas concentrações de 100 e 1000 nM foi capaz de aumentar a mineralização, possivelmente via ativação do receptor AT1, já que o tratamento com losartana diminuiu. Consistente com isso, Querques *et al.* (2015) notaram uma diminuição na diferenciação osteogênica na linhagem celular murina W20-17 com a administração de losartana (QUERQUES *et al.*, 2015). O mesmo foi observado com o silenciamento do AT1, enquanto o receptor AT2 não apresentou influência na diferenciação osteogênica. E nosso estudo experimental o receptor AT2 também não apresentou expressão durante a diferenciação das PDLSc.

Controversamente, Zhang *et al.* (2020) notaram uma diminuição considerável na diferenciação osteogênica de sinoviócitos humanos tratados com 1000 nM de Ang II por meio da elevação de DKK-1 que foi revertida com o uso de um inibidor de DKK-1, WAY262611 (ZHANG *et al.*, 2020). Essa divergência pode ser explicada pelo fato de tais estudos abordarem diferentes tipos celulares, como os sinoviócitos e diferentes vias estudadas, como a via da DKK-1. Poucos estudos relacionam diretamente a Ang II ao metabolismo ósseo, mesmo em outros tipos de células.

Nosso estudo foi o primeiro a relacionar a Ang II com a diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal de ratos. O estudo requer atenção aos dados obtidos em nossa pesquisa que mostram que Ang II foi capaz de aumentando a atividade da FAL no dia 7 e no dia 14 ocorreu o aumento de deposição mineral nos promovendo a mineralização dos osteoblastos derivados das PDLSc. Possivelmente a atividade da Ang

II deverá ser via indução dos fatores de transcrição e marcadores de formação óssea por ativação do receptor AT1.

Runx2 é um importante fator de transcrição necessário para o início da diferenciação dos osteoblastos a partir de células tronco mesenquimais e assim iniciar a formação óssea (Duce P *et al.*, 1997; Zubaidah, N *et al.*, 2022). A via de sinalização de Runx2 influencia a expressão de *Osx*, a qual é o último estágio do processo osteogênico (Ren *et al.*, 2022). As PDLSc mostraram capacidade de diferenciação em osteoblastos, o que ocorreu através da ativação dos fatores de transcrição Runx2, Osterix e *Ctnnb1* como observado no dia 7. Não menos importante, a via de sinalização Wnt/ $\beta$ catenin tem um papel regulador importante na proliferação e diferenciação das células troncos e tem sido descrita sua ativação em osteoblastos (Wang *et al.*, 2014), aumentando a qualidade da formação óssea (Wagner *et al.*, 2011). Estudo tem encontrado que a via de sinalização da Wnt/ $\beta$ -catenin está intimamente relacionada a manutenção da homeostase periodontal (Yin *et al.*, 2015), a qual pode promover a diferenciação osteogênica de PDLScs (Song *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2021). Wang e colaboradores (2023) observaram que a diferenciação osteogênica do PDLSc humano também ocorreu pela via Runx2 e *Osx* no dia 14. Em nossos resultados avaliamos no dia 7, visto que é o início da diferenciação e conseqüentemente a ativação dessas vias.

A adição de Ang II não alterou a ativação da expressão de Runx2 e *Ctnnb1* induzida pelo MO no dia 7 nas PDLSc. Isso mostra que a adição de Ang II não modificou a sinalização mantendo o parâmetro de ativação induzido pelo MO.

Com relação aos marcadores de formação óssea, observamos diferenças entre o grupo MC e MO onde verificamos um aumento da expressão de *Opn*, *Bsp* e *Ocn* nos dias 7 e 10 fortalecendo o resultado final da mineralização óssea no dia 14. Entre as proteínas envolvidas na formação óssea, foram avaliadas a OCN, a qual liga-se ao cálcio e promove a calcificação da matriz óssea; BSP, um nucleador de hidroxiapatita, associado a ligação celular a matriz e o *Col1a1* (BOLAMPERTI; VILLA; RUBINACCI, 2022; SALHOTRA *et al.*, 2020). Essas proteínas são os principais componentes da matriz extracelular que dão o suporte para a proliferação, formação da matriz e mineralização óssea conforme observamos após a diferenciação das PDLSc. De acordo com dados de literatura a OPN e OCN são genes essenciais envolvidos no desenvolvimento ósseo, conforme observado nos estudos de Oka *et al.* e Fabre *et al.* em células MC3T3 e células primárias de calvária de camundongo. Neste, a expressão da OPN e OCN estavam aumentados nos grupos da



diferenciação osteogênica em humanos e se mostraram essenciais para a diferenciação osteogênica (OKA *et al.*, 2021). A participação desses componentes também pode ser observada em PDLSc de humanos onde ocorreu um aumento na expressão de Opn e Ocn no grupo que apresentou aumento na mineralização celular (GE *et al.*, 2012). De acordo com o observado em literatura, nota-se que a expressão de Bsp é essencial para a diferenciação osteogênica das células. No estudo de GE *et al.* em 2012 observaram que o grupo celular com maior deposição mineral, e conseqüentemente, o grupo com a mineralização celular mais bem sucedida apresentou aumento significativo na expressão de Bsp com relação ao grupo com menor mineralização. A detecção proteica de Bsp *in vivo* conduzida por outro estudo mostrou que os animais que apresentaram melhor desenvolvimento e reparo ósseo foi o grupo com maior detecção de Bsp por imunohistoquímica (GE *et al.* 2012; ALVES *et al.* 2022). Esses achados confirmam a importância da presença da expressão dessas proteínas de formação óssea para a mineralização final do osso.

Com relação a expressão de Colla1 observamos uma diminuição tanto no dia 7, quanto no dia 10 comparando o grupo MC e MO. Isto pode estar acontecendo porque a sua expressão provavelmente já está em declínio durante a fase de diferenciação. Semelhantes aos nossos resultados, Kannan *et al.*, não observaram diferença significativa na expressão de Colla1 em células-tronco mesenquimais da medula óssea, incluindo diminuição dessa expressão nos estágios da diferenciação. (FABRE *et al.*, 2023; KANNAN; GHOSH; DHARA, 2020).

Observamos que o tratamento com Ang II não alterou a expressão dos genes de formação óssea no dia 07 da diferenciação osteogênica quando comparado ao grupo MO, entretanto, no dia 10, promoveu aumento na expressão de Opn e Ocn, mas não de Bsp. Esse dado mostra que, possivelmente, no dia 7, início da diferenciação osteogênica, a ação da Ang II não é fundamental para potencial o desenvolvimento osteogênico, o que vamos observar no dia 10, onde a Ang II foi capaz de potencial os marcadores de formação óssea que são produzidos mais tardiamente.

Devemos destacar que o nosso trabalho foi o primeiro a avaliar o papel direto da Ang II na diferenciação osteogênica em PDLSc, avaliando de forma conjunta: a influência na expressão dos fatores de transcrição osteogênicos, genes marcadores de formação óssea e na mineralização biológica das células.

Conforme observado em nossos dados o papel da Ang II na potencialização da mineralização osteogênica e conseqüentemente dos marcadores de formação óssea Opn e Ocn, fomos investigar se esse fenômeno foi devido a ativação do receptor da Ang II, receptor AT1 e/ou AT2. Observamos que no grupo MO ocorreu um aumento na expressão do receptor AT1, e que a Ang II potencializou este aumento em comparação ao grupo MO. Querques e colaboradores (2015) observaram que o receptor AT1 aumentou consideravelmente durante a diferenciação osteogênica de células da linhagem W20-17 e que o bloqueio de tal receptor promoveu diminuição da diferenciação osteogênica, no entanto, observaram isso em outro tipo celular. Em PDLSc, não há na literatura nenhum outro estudo que tenha investigado o papel do AT1 na diferenciação osteogênica. Nosso estudo é o pioneiro e precisamos explorar em maiores detalhes o efeito do AT1 no tecido periodontal e no controle do metabolismo ósseo tecidual (QUERQUES *et al.*, 2015).

Com relação ao receptor AT2, não observamos expressão em nossas células. Estes resultados vão de acordo com os dados da literatura onde o PDLSc humano não expressou o receptor AT2 *in vitro*; ainda assim, foi observado *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2015). O mesmo padrão de resposta foi observado por Santos *et al.* no tecido gengival quando comparado ao fibroblasto gengival *in vitro* sob condições fisiológicas (SANTOS *et al.*, 2009). Conforme comentam os autores, destacamos a hipótese de que a expressão tecidual do receptor AT2 está ligada a componentes sistêmicos e a outras células presentes no tecido, como células epiteliais e mastócitos, entre outras. Quando isolamos o PDLSc de ratos *in vitro*, esses fatores sistêmicos são descartados e a expressão não ocorre. Em outros tipos células podemos observar o papel desse receptor durante a diferenciação osteogênica receptor, por exemplo, o estudo que evidenciaram o efeito do AT2 na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de humano e notaram que o seu bloqueio levou a uma diminuição da diferenciação osteogênica destas células (MATSUSHITA *et al.* 2015).

No sentido de melhor avaliar o mecanismo envolvido durante a participação do receptor AT1 na diferenciação osteogênica das PDLSc, utilizamos o antagonista desse receptor, a Losartana. Observamos que o tratamento com losartana inibiu a mineralização óssea e a atividade de FAL induzida pela Ang II, confirmando a participação do receptor AT1 no processo do aumento da diferenciação osteogênica. Quanto a expressão dos fatores de transcrição e marcadores de formação óssea observamos que o losartana não alterou a expressão dos fatores de transcrição osteogênicos, mas reduziu

significativamente a expressão de Ocn no dia 7 e Col1a1, e Bsp e Ocn no dia 10. A expressão de Bsp e Ocn foi observado por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores, onde demonstramos que a expressão desses marcadores foi visualizada no dia 10 (ZHAO *et al.*, 2023; Brito *et al.* 2020). Diante dos achados, podemos sugerir que o aumento da mineralização induzida pela Ang II é mediado sua ação no receptor AT1 induzindo o aumento dos genes de formação óssea. Possivelmente, nem todos os genes marcadores de formação óssea estão sendo mediados diretamente pela ativação deste receptor, visto que a expressão de Ocn não foi reduzida pelo antagonista do receptor AT1. Sabe-se que a Ocn além de estar envolvida na formação óssea também atua como um mediador do processo inflamatório, tendo participação na inflamação juntamente com citocinas inflamatórias (Arif Icer & Gezmen-Karadag, 2018). Consistente com nossos resultados, Querques *et al* também observaram a influência do losartana na inibição da diferenciação osteogênica de células W20-17, revertendo a estimulação causada pela Ang II e demonstrando o papel do receptor AT1 na diferenciação osteogênica (QUERQUES *et al.* 2015).

Este estudo foi o primeiro ao avaliar a expressão dos genes de formação óssea Ocn, Ocn, Bsp e Col1a1 em células PLDSc induzida por Ang II em diferentes períodos da diferenciação osteogênica culminando com a indução da mineralização óssea. Além disso, sugere um papel importante para as células do PDLSc na regeneração óssea, assim como o estudo recente de Zhao e colaboradores que notaram formação óssea e regeneração de defeitos induzidos em calvária de camundongos através do implante de *scaffolds* com células tronco provenientes do ligamento periodontal, demonstrando forte capacidade e importância dessas células na engenharia e reparo tecidual (ZHAO *et al.* 2023). Os achados acima discutidos nos mostram um bom ponto de partida para fundamentar estudos clínicos envolvendo regeneração periodontal aliado à terapias farmacológicas, no entanto, mais estudos são necessários para fundamentar a pesquisa e determinar se podemos utilizá-la como terapia farmacológica para reparo tecidual na região periodontal.

Na área de medicina regenerativa, sabe-se o quão se faz necessário melhores respostas acerca de reparo tecidual, dessa forma a sugestão do uso das PDLSc se mostram células promissoras (Zhao *et al.*, 2023), para descoberta de novas soluções e terapêuticas envolvendo regeneração de tecido ósseo através de implantes impregnados com células-tronco provenientes do ligamento periodontal. Dentro das limitações do nosso estudo,

esperamos que os resultados encontrados possam colaborar para futuras pesquisas clínicas e que traga clareza para atuais problemas enfrentados na área da periodontologia.

Em conclusão, sumariamente, nossos resultados demonstram que PDLSc apresenta a capacidade de diferenciação osteogênica, e que a Ang II apresenta um papel importante na indução da formação dos genes de formação óssea via ativação do receptor AT1.

# ***CONCLUSÃO***

## **7. CONCLUSÃO**

As PDLSc podem se diferenciar em osteoblastos, e a Ang II potencializa essa mineralização, possivelmente via ativação do receptor AT1.

## ***REFERÊNCIAS***

## 8.REFERÊNCIAS

AGNIESZKA KRUYNSKA-FREJTAG *et al.* Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction. **Developmental Dynamics**, v. 229, n. 4, p. 857–868, 1 abr. 2004 KONERMANN *et al.*, 2012.

ALVES, T. *et al.* Osteogenesis in human periodontal ligament stem cell sheets is enhanced by the protease-activated receptor 1 (PAR1) in vivo. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 18 set. 2022.

ARAÚJO, A. A. *et al.* 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. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 12, p. 1104–1111, 10 out. 2013.

ARIF ICER M, GEZMEN-KARADAG M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. **Clin Bioch**, v.59, p.17-24, 2018.

BANAVAR, S. R. *et al.* Establishing a technique for isolation and characterization of human periodontal ligament derived mesenchymal stem cells. **The Saudi Dental Journal**, v. 33, n. 7, p. 693–701, nov. 2021.

BEERTSEN, W.; MCCULLOCH, C. A.; SODEK, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. **Periodontology 2000**, v. 13, p. 20–40, 1 Fev. 1997.

BEHM, C.; ZHAO, Z.; ANDRUKHOV, O. Immunomodulatory Activities of Periodontal Ligament Stem Cells in Orthodontic Forces-Induced Inflammatory Processes: Current Views and Future Perspectives. **Frontiers in Oral Health**, v. 3, 4 maio 2022.

BOLAMPERTI, S.; VILLA, I.; RUBINACCI, A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. **Bone Research**, v. 10, n. 1, 18 jul. 2022.

BRITO, V. G. B. *et al.* Telmisartan Prevents Alveolar Bone Loss by Decreasing the Expression of Osteoclasts Markers in Hypertensive Rats with Periodontal Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 579926, 2020.

DUCY P, ZHANG R, GEOFFROY V, RIDALL AL, KARSENTY G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, **Cell** 89 (5) (1997) 747–754.

FABRE, S. *et al.* Lrp5 p. Val667Met Variant Compromises Bone Mineral Density and Matrix Properties in Osteoporosis. **JBMR plus**, v. 7, n. 6, p. e10741, 1 jun. 2023.

FINLAY, B. B.; MEDZHITOV, R. Host-Microbe Interactions: Fulfilling a Niche. **Cell Host & Microbe**, v. 1, n. 1, p. 3–4, mar. 2007.



FORRESTER, S. J. *et al.* Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1627–1738, 1 Jul. 2018.

GE *et al.* Bone repair by periodontal ligament stem cell-seeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5405, out. 2012.

HIRUMA, Y. *et al.* Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 230, n. 1, p. 176–178, 3 Jan. 1997.

HUGHES, Francis J. Periodontium and periodontal disease. In: **Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences**. Academic Press, 2015. p. 433-444.

KANEDA-IKEDA, E. *et al.* Periodontal ligament cells regulate osteogenesis via miR-299-5p in mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v. 112, p. 47–57, mar. 2020.

KANNAN, S.; GHOSH, J.; DHARA, S. K. Osteogenic differentiation potential of porcine bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations selected in different basal media. **Biology Open**, 1 jan. 2020.

KOMORI, T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1694, 4 abr. 2019.

KONERMANN, A. *et al.* Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. **Cellular Immunology**, v. 272, n. 2, p. 137–143, 2012.

L. Song, M. Liu, N. Ono, F.R. Bringhurst, H.M. Kronenberg, J. Guo. Loss of wnt/ $\beta$ -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes **Journal of Bone and Mineral Research**, 27 (11) (2012), pp. 2344-2358.

LIMA, M. L. DE S. *et al.* AT1 and AT2 Receptor Knockout Changed Osteonectin and Bone Density in Mice in Periodontal Inflammation Experimental Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, p. 5217, 14 Maio 2021.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1 Nov. 1951.

MATSUSHITA, K. *et al.* Blockade of angiotensin II type 2 receptor by PD123319 inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells via inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling. **Journal of the American Society of Hypertension: JASH**, v. 9, n. 7, p. 517–525, 1 Jul. 2015.

MENICANIN, D. *et al.* Periodontal-Ligament-Derived Stem Cells Exhibit the Capacity for Long-Term Survival, Self-Renewal, and Regeneration of Multiple Tissue Types in Vivo. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 9, p. 1001–1011, Maio 2014.

MUNISWAMI, D.; KANAKASABAPATHY, I.; THARION, G. Globose basal cells for spinal cord regeneration. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 11, p. 1895, 2017.

NSERHAN, C. Novel omega-3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, n. 1, p. 7–21, jan. 2005.

OHUCHI, N. *et al.* Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 137, n. 3, p. 281–289, 1 mar. 2004.

OHUCHI, N. *et al.* Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 132, n. 4, p. 451–460, 1 ago. 2002.

OKA, S. *et al.* MicroRNA-21 facilitates osteoblast activity. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 100894, mar. 2021.

OLIVEIRA, S. *et al.* Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice with Periodontal Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 4 Jul. 2019.

PARK, J.-Y.; JEON, S. H.; CHOUNG, P.-H. Efficacy of Periodontal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Advanced Periodontitis. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 2, p. 271–286, mar. 2011.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 313–370, abr. 1977.

PIZZATTO, L. N. *et al.* Angiotensin II Regulates Proliferation and Function of Stem Cells of Apical Papilla. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 6, p. 810–817, 1 jun. 2020.

Ren, C *et al.* Effects of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) on the autophagy of rapamycin-treated osteoblasts. **Bioengineered** 2022, 13, 5262–5276.

SALHOTRA, A. *et al.* Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 11, p. 696–711, 1 nov. 2020.

SANTOS, C. F. *et al.* Characterization of a Local Renin-Angiotensin System in Rat Gingival Tissue. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 1, p. 130–139, Jan. 2009.

SANTOS, C. F. *et al.* Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0134601, 2015.

SEO, B.-M. *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **The Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149–155, Jul. 2004.

SHIMIZU, H. *et al.* Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 7, p. 2465–2475, 6 Feb. 2008.

SOUZA, P. P. C. *et al.* Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. **Regulatory Peptides**, v. 140, n. 1-2, p. 27–31, 5 abr. 2007.

TSUMANUMA, Y. *et al.* Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. **Biomaterials**, v. 32, n. 25, p. 5819–5825, set. 2011.

Wagner ER *et al.* .The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders. **Curr Mol Pharmacol** 2011; 4(1):14-25.

Wang Y *et al.* Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. **Front Biosci** 2014;19:379-407.

WILKINSON-BERKA, J. L. *et al.* Angiotensin II and aldosterone in retinal vasculopathy and inflammation. **Experimental Eye Research**, v. 187, p. 107766–107766, 1 out. 2019.

WU, D.; MA, L. Downregulating microRNA-152-3p promotes the viability and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via targeting integrin alpha 5. **Archives of Oral Biology**, v. 120, p. 104930, Dez. 2020.

X. Yin *et al.* Wnt signaling and its contribution to craniofacial tissue homeostasis. **Journal of Dental Research**, 94 (11) (2015), pp. 1487-1494.

YAMADA, S. *et al.* Characterization of a novel periodontal ligament-specific periostin isoform. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 9, p. 891–897, 1 set. 2014.

YU, B.-H.; ZHOU, Q.; WANG, Z.-L. Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and in situ bone formation: A comparative study in the rat. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 2, p. 243–253, 1 ago. 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Angiotensin II inhibits osteogenic differentiation of isolated synoviocytes by increasing DKK-1 expression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 121, p. 105703, 1 abr. 2020.

ZHAO, Z. *et al.* Calvaria defect regeneration via human periodontal ligament stem cells and prevascularized scaffolds in athymic rats. **Journal of Dentistry**, v. 138, p. 104690, 1 nov. 2023.

ZUBAIDAH, N. *et al.* The Osteogenesis Mechanisms of Dental Alveolar Bone Socket Post Induction with Hydroxyapatite Bovine Tooth Graft: An Animal Experimental in *Rattus norvegicus* Strain Wistar. **Eur. J. Dent.** 2022.