



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

BIANCA DA SILVA RIBEIRO

**ALISQUIRENO MODULA O METABOLISMO ÓSSEO EM
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

**ARAÇATUBA
2022**

BIANCA DA SILVA RIBEIRO

**ALISQUIRENO MODULA O METABOLISMO ÓSSEO EM
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação 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.^a Tít. Sandra Helena Penha de Oliveira

**ARAÇATUBA
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R484a Ribeiro, Bianca da Silva.
 Alisquireno modula o metabolismo ósseo em camun-
 dongos diabéticos com doença periodontal / Bianca da
 Silva Ribeiro. - Araçatuba, 2022
 71 f. : il. ; tab.

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

 1. Doenças periodontais 2. *Diabetes mellitus* 3. Sis-
 tema renina-angiotensina I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

Á minha base,
meus pais, **José Jonas** e **Ivani** e ao meu irmão, **Alisson**.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, nas pessoas de sua direção Professor Titular Glauco Issamu Miyahara e Professor Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem, por oferecer a oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), nas pessoas de sua coordenação geral, Professora Rita de Cássia Menegati Dornelles e presidente da SBFis, Professora Patrícia Rieken Macedo Rocco (UFRJ).

Ao Conselho Local do Programa, na pessoa de sua coordenação, Professora Titular Sandra Helena Penha de Oliveira e demais membros, pelo trabalho e esforços realizados para o crescimento, visibilidade e reconhecimento deste Programa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de mestrado e financiamento desta pesquisa (processo FAPESP: 2020/03068-9).

À Pró-reitora de pós-graduação da UNESP (PROPG/UNESP), pelo apoio financeiro nas viagens para realização das disciplinas.

Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO) (Convênio FINEP 01.12.0530.00 - PROINFRA 01/2011) da Foa/Unesp, onde foram realizadas as análises de microtomografia.

À Seção Técnica de Pós-Graduação desta instituição, e seus servidores a Diretora técnica acadêmica Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e a técnica-administrativa Cristiane Regina Lui Matos pela eficiência e cordialidade nas ocasiões de necessidade.

A todos os demais funcionários da FOA/Unesp, cujos trabalhos são essenciais para o bom funcionamento desta universidade. Aos servidores da Seção de Conservação e Manutenção, por nos salvar nos momentos de imprevisto; A Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), por todo o suporte solicitado; Aos servidores da limpeza, por seu trabalho, bom humor e carinho com todos do departamento.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas desta instituição, por sua contribuição científica, além do carinho e cuidado não apenas comigo, mas com todos os alunos.

Aos amigos discentes e egressos do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas desta instituição, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da Farmaco A, Murilo Eduardo Graton e Mariana Quirino da Silva pela ótima convivência, deixando os dias de trabalho muito mais agradáveis.

Aos amigos do laboratório, a Farmaco B, Eduardo da Cunha Bombardi, Marcos Fernando Sobrinho e Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli pela colaboração e boa vontade diária, conselhos e muitas risadas que fizeram desse mestrado muito mais leve. Em especial ao Victor Gustavo Balera Brito, por todos os ensinamentos, paciência, pelo seu tempo dedicado a ajudar, que fizeram dele uma peça fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, além de se tornarem verdadeiros amigos.

Á minha família, que foi fundamental para a finalização deste ciclo, aos meus amigos, por todo apoio e incentivo, ao meu amor por todo companheirismo e por último, porém o mais importante, á Deus por ter me sustentando todos os dias até aqui.

Á minha orientadora, Professora Sandra Helena Penha de Oliveira, pela oportunidade que me deu em 2017, abrindo as portas de seu laboratório, por todas as experiências, cobranças e puxões de orelha, que sem dúvida contribuíram para o meu crescimento e formação.

EPÍGRAFE

Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina, não perguntar o que se ignora.”

São Beda

RESUMO

RIBEIRO, B. S. Alisquireno modula o metabolismo ósseo em camundongos diabéticos com doença periodontal. 2022. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2022.

RESUMO

O sistema renina-angiotensina (SRA), além da inflamação, está associado à remodelação óssea pela ação da angiotensina. No presente estudo avaliamos o papel da renina no metabolismo ósseo mandibular em camundongos normais (N) e diabéticos (D) com Doença Periodontal (DP). Usamos camundongos Balb/c machos e o diabetes foi induzido por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). A DP foi induzida pela inserção de uma ligadura bilateral nos primeiros molares inferiores. O tratamento foi administrado concomitantemente por 15 dias na dose de 50 mg/kg de Alisquireno (Alisk). Os animais foram eutanasiados e as mandíbulas coletadas para análise morfológica, expressão gênica, marcação tecidual e produção de citocinas pró-inflamatórias. A análise morfológica mostrou perda óssea acentuada em ambos os grupos, com piora da perda óssea no grupo D tratado com Alisk (DALisk+PD). A produção de citocinas pró-inflamatórias teve um aumento na expressão de IL1- β em ambos os grupos com DP (NPD e DPD), um aumento na expressão de IL-6 apenas em camundongos D com DP (DPD), e um aumento na expressão de TNF- α em camundongos N, mas não em camundongos D. O tratamento com Alisk diminuiu significativamente a produção de IL-6 em camundongos D e IL-1 β em ambos os grupos. A expressão gênica dos fatores de formação óssea mostrou diminuição de Alp, Col1a1 e Ocn, e aumento de Bmp2 e Opn no grupo DPD. O tratamento com Alisk não alterou Alp, Col1a1 e Ocn, mas diminuiu Opn. No grupo N com DP (NPD) houve aumento na expressão de Col1a1 e Bsp. O tratamento com Alisk diminuiu a expressão desses marcadores (NALisk+PD). A expressão dos marcadores de reabsorção óssea Trap, Mmp9, Oscar e Socs1 foi maior no grupo NPD, enquanto no grupo DPD houve aumento na expressão de Trap, Mmp9 Ctsk e Oscar, e observamos o mesmo resultado no grupo DPD em relação à marcação tecidual. O tratamento no grupo DALisk+PD, Alisk aumentou significativamente a expressão de Oscar e Socs1. No grupo NALisk+PD, Alisk reduziu Trap e Mmp2. Em conclusão, nosso estudo sugere que a renina tem um papel protetor no metabolismo ósseo em animais D com DP, uma vez que sua inibição por Alisk causou uma deterioração significativa no metabolismo ósseo nesses animais, já que na ausência de renina foi observado um

aumento de Oscar. e SOCS-1, bem como IL-6 e IL-1 β que são citocinas osteoclastogênicas.

Palavras-chave: Doença periodontal. Diabetes mellitus. Metabolismo ósseo. Sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

RIBEIRO, B. S. Aliskiren modulates bone metabolism in diabetic mice with periodontal disease. 2022. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

In addition to inflammation, the renin-angiotensin system (RAS) is associated with bone remodeling through the action of angiotensin. In the present study, we evaluated the role of renin in mandibular bone metabolism in normal (N) and diabetic (D) mice with Periodontal Disease (PD). We used male Balb/c mice and diabetes was induced by peritoneal injection of streptozotocin (STZ). PD was induced by the insertion of a bilateral ligature in the lower first molars. Treatment was administered concomitantly for 15 days at a dose of 50 mg/kg of Aliskiren (Alisk). Animals were euthanized and the mandibles were collected for morphological analysis, gene expression, tissue labeling, and production of pro-inflammatory cytokines. Morphological analysis showed a marked bone loss in both groups, with worsening bone loss in group D treated with Alisk (DALisk+PD). The production of pro-inflammatory cytokines had an increase in the expression of IL-1 β in both groups with PD (NPD and DPD), an increase in the expression of IL-6 only in D mice with PD (DPD), and an increase in the TNF- α expression in N mice, but not in D mice. Treatment with Alisk significantly decreased IL-6 production in D and IL-1 β mice in both groups. The gene expression of bone formation factors showed a decrease in Alp, Col1a1, and Ocn, and an increase in Bmp2 and Opn in the DPD group. Treatment with Alisk did not change Alp, Col1a1, and Ocn, but decreased Opn. In group N with PD (NPD), there was an increase in the expression of Col1a1 and Bsp. Treatment with Alisk decreased the expression of these markers (NALisk+PD). The expression of bone resorption markers Trap, Mmp9, Oscar, and Socs1 was higher in the NPD group, while in the DPD group, there was an increase in the expression of Trap, Mmp9 Ctsk, and Oscar, and we observed the same result in the DPD group in relation to tissue labeling. Treatment in the DALisk+PD, Alisk group significantly increased the expression of Oscar and Socs1. In the NALisk+PD group, Alisk reduced Trap and Mmp2. In conclusion, our study suggests that renin has a protective role in bone metabolism in D animals with PD since its inhibition by Alisk caused a significant deterioration in bone metabolism in these animals since in the absence of renin an increase in Oscar was observed. and SOCS-1, as well as IL-6 and IL-1 β which are osteoclastogenic cytokines.

Keywords: Periodontal disease. Diabetes mellitus. Bone metabolism. Renin-angiotensin system.

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise microtomográfica da mandíbula de camundongos normais e diabéticos (com DP 15 dias, tratados com alisquireno. Reconstrução tridimensional da mandíbula em vista lingual com corte na região de furca (A), e gráficos mostrando %BV/TV (B), Tb.N (C) , Tb.Th (D) e Tb.Sp (E) como média $\pm$ SEM (n = 5) 43

Figura 2 - Ensaio Mecânico na mandíbula de camundongos normais e diabéticos (com DP 15 dias, (A) Força máxima, (B) Resistência a fratura, (C) Alongamento e (D) Modulo de Elasticidade 44

Figura 3 - Expressão de citocinas pró-inflamatórias na mandíbula dos camundongos (A) IL-6, (B), IL-17, (C) TNF- α e (D) IL-1 β . Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6) 46

Figura 4 - Expressão genica de fatores de transcrição da formação óssea na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Runx2(A), Osterix (Osx) (B), β -catenina (Ctnnb) (C) e alvos de formação óssea na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Alp (D), Col1a1 (E), Opn (F), Ocn (G), Bsp (H), Bmp2 (I). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6) 48

Figura 5 - Expressão gênica do eixo Opg/Rankl/Rank na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Opg (A), Rankl (B), Rank (C). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6) 49

Figura 6 - Expressão gênica de marcadores de reabsorção óssea na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Trap (A), Mmp2 (B), Mmp9 (C), Ctsk (D), Oscar (E), Vtn (F), Itga5 (G), Itgb5 (H) e Socs1 (I). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6) 51

Figura 7 - Expressão tecidual de marcadores de reabsorção óssea na mandíbula dos camundongos. Imunohistoquímica para Ctsk (A), Mmp9 (B), Oscar (C), e Trap(D) 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrão de marcação imunohistológica

52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ A	Microampere
μ L	Microlitro
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
Actb	<i>Beta actin</i>
Alp	<i>Bone alkaline phosphatase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , análise de variância
Bmp2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
Bsp/Ibsp	<i>Bone sialoprotein / Integrin-binding sialoprotein</i>
BV/TV	<i>Bone volume/Total volume</i> , Volume ósseo/Volume total
Ctnnb	β -catenin / Cadherin associated protein beta 1
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico complementar
Col1a1	<i>Collagen type I alpha 1</i>
Ctsk	<i>Cathepsin K</i>
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i> , Pirocarbonato de dietila
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
DNase	<i>Desoxirribonuclease</i>
DP	Doença periodontal
IL-6	<i>Interleukin-6</i> , Interleucina-6
Itgav	<i>Integrin, alpha V</i>
Itgb5	<i>Integrin, beta 5</i>
mg	Miligrama
microCT	<i>Micro-computed tomography</i> , micro tomografia computadorizada
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mmp2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
Mmp9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
Ocn	<i>Osteocalcin /</i>
Opg	<i>Osteoprotegerina</i>
Opn	<i>Osteopontina</i>
Oscar	<i>Osteoclast associated immunoglobulin-like receptor</i>

Osx	<i>Osterix</i>
p	Probabilidade
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Tampão fosfato salino
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i> , Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
Rank	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11^a</i>
Rankl	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11</i>
RCF	<i>Relative centrifugal force</i> , Força centrífuga relativa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
ROI	<i>Region of interest</i> , Região de interesse
RQ	<i>Relative quantitation</i> , Quantificação relativa
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
*	Asterisco
β	Beta
$^{\circ}$	Grau
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
+	Mais
$\pm$	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
-	Menos
:	Para (razão matemática)
%	Porcentagem / Por cento
Δ	Variação
$\Delta\Delta$	Variação da variação

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Doença Periodontal	25
1.2 Diabetes mellitus	25
1.3 Correlação entre diabetes <i>mellitus</i> e doença periodontal	26
1.4 Metabolismo ósseo	27
1.5 O sistema renina-angiotensina e o metabolismo ósseo	28
2 PROPOSIÇÃO	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais, aspectos éticos e design experimental	35
4.2 Indução de diabetes	35
4.3 Indução de doença periodontal	35
4.4 Tratamento com alisquireno	36
4.5 Coleta das amostras	36
4.6 Análise de microtomografia computadorizada	36
4.7 Resistência Flexional	37
4.8 Quantificação de citocinas por ensaio imunoadsorvente ligado a enzima	38
4.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real	40
4.9.1 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Animais normais e diabéticos com DP apresentam perda óssea significativa	42
5.2 Camundongos Diabéticos com DP mostraram menor resistência a fratura	43
5.3 A doença periodontal aumenta a produção de IL-6 e IL-1 β e diminui a produção de IL-17 nas mandíbulas de camundongos diabéticos	45
5.4 Doença periodontal diminui a expressão de fatores de transcrição relacionados à formação óssea em camundongos diabéticos, e diminui a expressão de Alp, Col1a1, Ocn e Bmp2	47
5.6 Alisquireno modula a expressão do eixo Opg/Rankl/Rank em camundongos normais, mas não em camundongos diabéticos	49

5.7 Doença periodontal aumenta expressão gênica de marcadores de reabsorção óssea	50
5.8 Doença periodontal aumenta a produção tecidual de Ctsk, MMP-9, Oscar e Trap em animais diabéticos, e tratamento com alisquireno potencializa essa marcação	52
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Periodontal

A doença periodontal (DP), também conhecida como periodontite, é um grupo de doenças inflamatórias do periodonto. É causada por bactérias anaeróbicas Gram-negativas e caracteriza-se pela perda e destruição dos tecidos periodontais. O periodonto é a estrutura que dá suporte aos dentes, ele é composto pelas gengivas, pelo cemento, ligamento periodontal e o osso alveolar. (1, 2) A severidade da DP depende do nível de biofilme acumulado nos dentes, da virulência das bactérias que fazem parte deste biofilme e da resposta imunológica a estes agentes. (3) A doença pode ser considerada localizada quando afeta <10 dentes ou generalizada se acometer >10 dentes. (4)

A DP está entre as doenças infecciosas mais comuns nos humanos e é considerada uma das duas maiores causas de perda dentária, juntamente com as cáries (5) Segundo Kinane, Stathopoulou e Papapanou (4), a maior prevalência da doença é em adultos, porém Botero et al. (3) afirma que na América Latina, as crianças e os adolescentes são os mais afetados pelas doenças periodontais.

O tratamento da periodontite consiste na remoção da placa e do biofilme bacteriano, na intenção de limitar e/ou evitar que a doença se espalhe. Se há perda visível de tecido ósseo, deve-se controlar a inflamação e a progressão da doença, a fim de criar condições para que o paciente consiga manter a dentição saudável e funcional. Em casos mais graves há a possibilidade de associar ao tratamento alguns antibióticos de aplicação local ou sistêmica ou até mesmo procedimentos cirúrgicos. (4) Apesar de todos os efeitos sobre os dentes e a gengiva, há vários estudos que vinculam a periodontite à doenças sistêmicas como doenças cardiovasculares,

nascimentos prematuros, câncer (5) e diabetes *mellitus*, que é muito estudada em relação à DP.

1.2 Diabetes mellitus

A diabetes *mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado pela capacidade reduzida do organismo de secretar ou responder à insulina, hormônio produzido pelas células beta das ilhotas de *Langerhans* no pâncreas e é um dos responsáveis pela manutenção dos níveis glicêmicos no organismo. Também causa hiperglicemia crônica e problemas no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. (6) Pacientes diabéticos também possuem de 2 a 4 vezes mais chances de desenvolver doenças cardiovasculares e infarto cerebral. (7)

Os sintomas da hiperglicemia incluem poliúria, coceira, sede e fome excessivas, visão embaçada, perda de peso, fraqueza e aumento da susceptibilidade a algumas infecções. Em casos agudos com alta severidade pode haver cetoacidose, que causa hiperventilação e mau funcionamento do sistema nervoso central, o que pode levar ao coma e se não houver tratamento adequado, que consiste na administração intravenosa de insulina e outros fármacos, pode levar à morte do paciente. (6, 8) Existem dois tipos da doença. O tipo 1, também conhecido como insulino dependente e o tipo 2, que é não insulino dependente. A diabetes tipo 1 caracteriza-se pela destruição das células beta do pâncreas, por isso o portador fica dependente da insulina para sobreviver. (6) Normalmente ocorre em crianças ou adolescentes, mas pode ser diagnosticada e se tornar sintomática em qualquer idade. Não é raro pacientes acometidos por este tipo de diabetes desenvolverem outras doenças autoimunes. (8)

Diabetes tipo 2 é a forma mais comum da doença, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos. Atinge principalmente os adultos, mas também pode acometer crianças e adolescentes, segundo a Enciclopédia Britânica. É caracterizada pela resistência à insulina ou insuficiência na produção da mesma. Na maioria dos casos não apresenta sintomas e normalmente só é diagnosticada em exames de rotina. (6) A etiologia deste tipo de diabetes está fortemente associada a componentes genéticos, até mais do que a diabetes tipo 1. Está intimamente relacionada à obesidade. Não há destruição autoimune das células e não é comum haver cetoacidose, exceto em casos associados com outras doenças e infecções. (8)

1.3 Correlação entre diabetes *mellitus* e doença periodontal

A relação entre DP e outras patologias sistêmicas tem sido estudada há vários anos, sendo a diabetes a doença mais comumente ligada à periodontite. (9) Sabe-se que a DP tem maior prevalência e grau de severidade aumentado em pacientes diabéticos, sendo considerada a sexta complicação da diabetes. (10) Em pacientes com DM tipo 2, a DP é a complicação oral mais comum e estudos mostram que em pacientes com DM tipo 1 a prevalência de DP é cinco vezes maior em adolescentes e causa um aumento da taxa de hemorragia bucal, bem como das bolsas periodontais e perda do ligamento dentário. (11) A diabetes *mellitus* potencializa a gravidade da DP acelerando a reabsorção óssea. Estudos em animais demonstraram que a perda do osso alveolar em ratos que tiveram DM tipo 1 induzida por estreptozotocina (STZ) foi três vezes maior que em ratos normais. O estudo sugere também que a gravidade e o risco da perda do osso alveolar estão diretamente ligados ao controle metabólico da glicose deficiente. (12, 13) Além disso, a diabetes está associada a marcadores

sistêmicos da inflamação. Esse estado inflamatório contribui para complicações vasculares e a hiperglicemia pode ativar mecanismos que agravam a inflamação, estresse oxidativo e apoptose, o que aumenta a severidade da inflamação nos tecidos periodontais. Estudos recentes sugerem que a relação entre a diabetes e a DP é uma “via de mão-dupla”, indicando que não só a diabetes é um fator de risco para a periodontite, mas a doença periodontal também influencia negativamente no controle glicêmico de pacientes diabéticos. Poucos estudos mostram os mecanismos envolvidos na perda óssea induzida pela periodontite na presença de diabetes, principalmente no que se refere à atividade osteoclástica. (14)

1.4 Metabolismo ósseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado que se difere de outros tecidos por causa da mineralização da sua matriz que promove endurecimento do tecido e fornece suporte e proteção. O mineral é o fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita. O maior componente estrutural da matriz óssea é o colágeno do tipo 1, tendo traços de colágenos dos tipos III, V, XI e XII. Ainda faz parte da composição da matriz óssea algumas proteínas não colágenas, são elas: macromoléculas proteoglicanas, glicoproteínas multiadesivas, proteínas dependentes de vitamina K específicas de osso e fatores de crescimento e citocinas. Estas proteínas são essenciais para o desenvolvimento, crescimento, remodelação e reparo ósseo. (15) A nível celular, o metabolismo ósseo é mediado pelos osteócitos, osteoblastos e pelos osteoclastos. O osteoclasto é uma célula multinucleada, adaptada unicamente para reabsorver a matriz mineralizada dos ossos, tem origem hematopoiética e pode ser encontrada na circulação e na medula óssea. O osteoblasto é uma célula altamente

especializada, mononuclear, adaptada para a formação da matriz mineral óssea. Origina-se de fibroblastos periosteais. (16) Osteoblastos quando são encapsulados pela matriz que eles mesmos sintetizam, se tornam osteócitos. Os osteócitos possuem baixa atividade metabólica, mas constituem 90% das células de ossos maduros e têm papel importante na manutenção da estrutura óssea. (17) A atividade destas células é regulada por forças mecânicas, hormônios, citocinas, fatores locais ou remodelação óssea (*turnover*). O processo de remodelação óssea é iniciado pelos osteócitos, que respondem a estímulos mecânicos ou bioquímicos e recrutam osteoclastos seguidos pela fusão de osteoclastos ativados que formam osteoclastos multinucleados, que por sua vez medeiam a reabsorção do osso. Após este processo, osteoblastos são recrutados para o sítio de reabsorção e depositam ali novos osteóides que posteriormente se calcificam. A taxa de reabsorção varia de acordo com o tipo de osso. (17) Além dos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, o remodelamento ósseo ainda requer a participação de células do sistema imunológico, como as células polimorfonucleares. (18) Diversos fatores interferem nas fases do remodelamento ósseo, como os fatores de crescimento, que são essenciais para os processos de reparo e remodelamento ósseo (19) e as citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, TGF- β e a quimiocina CCL2, que afetam a reabsorção óssea por induzir a ativação e diferenciação osteoclástica, causando acelerada degradação óssea. (20)

Além disso o metabolismo ósseo é modelado por vias de sinalização e uma delas é a Wnt- β -Catenina que participa na proliferação e síntese da matriz óssea através dos osteoblastos, e da diferenciação dos osteoclastos, além de ser essencial para viabilidade dos osteócitos, células importantes que participam da manutenção e reabsorção da matriz óssea. (21)

1.5 O sistema renina-angiotensina e o metabolismo ósseo

O SRA exerce papel fundamental no controle homeostático da pressão arterial, da vascularização tecidual e do volume extracelular. Possui características endócrinas e utiliza o angiotensinogênio como substrato principal. O angiotensinogênio é secretado pelo fígado e clivado, na circulação sanguínea, pela renina, enzima que é secretada pelo aparelho justaglomerular nos rins. O produto desta clivagem é a angiotensina I (ANG I). Então a ANG I é ativada pela enzima conversora de angiotensina (ACE) e transformada em angiotensina II (ANG II), o principal peptídeo do SRA. (21, 22) O SRA associa-se ao *turnover* ósseo pela angiotensina que atua de forma indireta sobre as células ósseas através do fluxo vascular da medula óssea ou pela liberação de mediadores da inflamação que aumentam a vascularização endotelial que estimula a osteoclastogênese. A ANG II aumenta a remodelação óssea pelo aumento da produção de RANKL pelos osteoblastos, que causa o aumento da atividade dos osteoclastos. Isto é causado pela ligação da ANG II aos receptores AT1 e AT2. A utilização de fármacos que bloqueiam o sistema renina-angiotensina, como o telmisartan, pode reduzir os processos inflamatórios e gerar benefícios sobre o *turnover* ósseo. (23-25) Outro fármaco com papel importante no sistema SRA é o alisquireno, que demonstrou ter aumentado significativamente o volume ósseo e a densidade mineral em ratos, além de regular a expressão de angiotensinogênio, ANG II, receptor de ANG II tipo 1 e diminuir genes específicos de osteoclastos, metaloproteinase-9 e a catepsina K. (26) Assim, a utilização de um antagonista do receptor de angiotensina do tipo 1 em pacientes com periodontite pode ter efeitos benéficos sobre a progressão da doença, reduzindo a inflamação e as metaloproteinases, bem como sobre a formação e a diferenciação dos osteoclastos, confirmada por diminuição da expressão de RANK/RANKL e catepsina K. (27)

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

A crescente incidência da diabetes, associada ao fator de risco para o desenvolvimento da DP, faz com que cada vez mais estudos sejam direcionados para descoberta de novos alvos terapêuticos, para ampliar as alternativas de tratamentos, bem como aprimorar os já instituídos, para assim melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com estas patologias. Estudos indicam que terapias com antagonista de receptor de angiotensina AT1R podem estar surgindo como uma nova ferramenta para investigar os mecanismos envolvidos no processo inflamatório. Dessa forma, existe a necessidade de entender melhor os mecanismos pelos quais o sistema SRA atua, bem como suas interações com a DP e doenças sistêmicas em relação as alterações entre o metabolismo ósseo e os tecidos moles periodontais. Este trabalho propõe avaliar a reabsorção óssea e os marcadores ósseos da atividade osteoclástica e sua relação com a renina em camundongos normais e diabéticos tratados com alisquireno, a fim de se verificar a modulação do fármaco sobre o metabolismo ósseo da periodontite induzida na presença da diabetes *mellitus*.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da renina sobre os marcadores de formação e reabsorção óssea e citocinas envolvidas no metabolismo ósseo da mandíbula de camundongos normais e diabéticos submetidos a periodontite experimental.

3.2 Objetivos específicos

Em linhas gerais o trabalho foi dividido em 6 grupos experimentais, sendo estes: camundongos normais (N), diabéticos (D), normais com periodontite (N+DP), diabéticos com periodontite (D+DP), normais com periodontite tratados com alisquireno (N+A+DP), diabéticos com periodontite tratados com alisquireno (D+A+DP). Foram investigados:

a) a presença de reabsorção óssea nos animais diabéticos e normais com doença periodontal tratados ou não com alisquireno por técnicas histológicas e histomorfométricas;

b) a expressão dos marcadores osteoblásticos na mandíbula dos grupos citados acima sendo esses, genes fatores de transcrição envolvidos na formação óssea; Runx-2, Osx e Ctnnb, como também marcadores da formação óssea; Alp, Col1a1, Opn, Ocn, Bsp e Bmp2. Também foram avaliados a expressão dos marcadores osteoclásticos, sendo esses genes Rankl, Rank e Opg, eixo envolvido na reabsorção óssea e os principais marcadores da reabsorção óssea: catepsina K, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), OSCAR, SOCS1, receptores de vitronectina e calcitonina, metaloproteinases da matriz do tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) por RT-PCR

em tempo real;

c) a marcação tecidual no tecido histológico mandibular dos camundongos, sendo esses; CTSK, MMP-9, OSCAR e TRAP por técnicas imunohistológicas

d) a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β , e IL-17 no osso mandibular dos grupos experimentais por imunoensaioenzimático (ELISA)

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais, aspectos éticos e design experimental

Os cuidados com os animais e os protocolos experimentais estavam de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentos Animais do Brasil e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) (Processo FOA-00974-2016). Esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número utilizado. Foram utilizados 36 camundongos Balb/c machos adultos (25 ± 5 g) do Biotério do Departamento de Ciências Básicas (Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP). Os animais foram alojados em gaiolas ventiladas individualmente em ambiente com luz controlada (ciclo claro/escuro de 12 h), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$), com ração padrão peletizada e água potável oferecidos. Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais ($n = 5$), sendo: Controle Normal, Normal com DP, Normal com DP tratados com alisquireno, Controle Diabético, Diabético com DP e Diabéticos com DP tratados com alisquireno.

4.2 Indução de diabetes

Para indução de diabetes, os camundongos receberam 200 mg/kg de estreptozotocina intraperitoneal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em tampão citrato (100 mM, pH 6,0). Após 7 dias, os níveis de glicemia foram medidos por um glicosímetro (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson Medical, Milpitas, CA, EUA) e os camundongos foram considerados diabéticos quando os valores se mostraram iguais ou superiores a 250 mg/dl. (13).

4.3 Indução de doença periodontal

A DP foi induzida pela inserção bilateral de uma ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores, mantida por 14 dias, conforme descrito anteriormente. (28) Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de cetamina (Cetamim, Syntec; Hortolândia, São Paulo, Brasil) associado a 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmium, Agener União; Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e colocados em decúbito ventral em mesa odontológica para roedores, com afastadores orais apoiados nos dentes incisivos. Um fio de seda 4-0 (Shalon; Goiânia, Goiás, Brasil) foi inserido ao redor dos primeiros molares inferiores, empurrando cuidadosamente a ligadura no sulco gengival e amarrando mesialmente. Os grupos controles não receberam a ligadura. No entanto, eles foram anestesiados e manipulados de forma semelhante para sofrer o mesmo estresse que os outros.

4.4 Tratamento com alisquireno

Alisquireno foi administrado diariamente, na dose de 50 mg/kg em PBS pH 7,4, conforme descrito por Santos et al. (27) utilizando gavage oral, iniciando 1 dia antes da indução da DP e mantida até a eutanásia. Os grupos controles foram manipulados de forma semelhante e receberam apenas PBS pH 7,4 para sofrer o mesmo estresse que os demais.

4.5 Coleta das amostras

No dia 15 após a indução da DP, os camundongos foram eutanasiados com Isoflurano (Isoflurano; Cristália, Itapira, SP, Brasil) por inalação de overdose. A presença da ligadura bilateral foi avaliada, e os animais em que ela estava ausente foram excluídos do estudo. As hemi-mandíbulas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, posteriormente armazenadas em -80°C até serem usadas para a quantificação de citocinas e análise de expressão gênica. O lado esquerdo foi utilizado para microtomografia computadorizada, armazenado em solução salina e congelado a - 20°C até que o experimento fosse realizado ou emergido em formaldeído e processado para fins histológicos.

4.6 Análise de microtomografia computadorizada

As imagens tomográficas das hemi-mandíbulas direitas foram adquiridas usando um sistema SkyScan 1272 (Bruker microCT; Kontich, Bélgica) [70 kVp e 142 μ A; filtro de alumínio de 0,5 mm; voxel isotrópico de 9 μ m; Tempo de exposição de 1.100 ms, média de dois quadros e rotação de 180° (passo de rotação de 0,5°)] e reconstruído 6 tridimensionalmente (software NRecon; v1.6; Bruker microCT). A perda óssea alveolar foi avaliada na região do primeiro molar, e uma região de interesse (ROI) foi padronizada a partir de pontos anatômicos definidos (limite superior: teto de furca; limite inferior: ápice radicular proximal; limite distal: raiz proximal do segundo molar; limite proximal: raiz proximal do primeiro molar e limites vestibulares e linguais: limites do osso alveolar). Um volume de interesse (VOI) foi automaticamente delimitado pelas bordas ósseas e pela exclusão do volume do dente. A porcentagem óssea foi dada por (%BV/TV). (29)

4.7 Resistência Flexional

O ensaio de resistência flexural (RF) (n=5) por três pontos foi realizado em uma máquina universal de ensaios (Emic DL 2000®, Emic, São José dos Pinhais, PR, Brasil), com uma célula de carga de 200 N. Os espécimes foram dispostos horizontalmente em contato com as hastes paralelas entre si de um suporte metálico e, em seguida, a máquina foi acionada com uma velocidade de 5 mm/min. A porção móvel da máquina incidiu sua força perpendicularmente na região central dos corpos-de-prova até ocorrer fratura, seguindo os parâmetros estabelecidos pela norma da ADA, especificação n.º 27(2,5).

A resistência flexural foi obtida em Newtons e calculada em Megapascal (MPa) por meio da seguinte fórmula (1): $p = 3fl/2bh^2$.

Em que:

- p = Resistência flexural em Megapascal
- f = carga de fratura, em Newtons, aplicada sobre o espécime
- l = distância entre os suportes; em milímetros
- b = largura do espécime; em milímetros
- h = espessura do espécime, em milímetros

As medidas de cada espécime foram aferidas previamente ao ensaio de flexão.

Módulo de Elasticidade

Os valores do módulo de elasticidade (ME) (n=5) foram realizados simultaneamente com o ensaio de resistência flexional, em Mpa, foram calculados pela seguinte fórmula (2): $ME = [(f l^3) / (4bh^3d)]$

Onde:

f é a carga aplicada em N

d é a deflexão causada pela carga f em mm

l , b , h são as variáveis definidas na fórmula 1.

Depois, os valores obtidos em Mpa foram transformados em Gpa.

4.8 Quantificação de citocinas por ensaio imunoadsorvente ligado a enzima

As amostras da mandíbula foram reunidas e sonicadas até que todo o tecido fosse desintegrado em tampão de lise (PBS pH 7,4, mais coquetel de inibidor de protease), que foi então centrifugado e o sobrenadante foi usado para quantificação de IL-6, IL-17, TNF- α e IL-1 β por imunoensaio enzimático sanduíche (ELISA) utilizando número experimental $n = 5$. Os anticorpos e padrões foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), e as concentrações de anticorpos que foram utilizadas foram previamente padronizadas. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços revestidas com os respectivos anticorpos de captura por 18 h a 4°C. Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com tampão de bloqueio (PBS mais 1% de albumina de soro bovino) por 1 h em temperatura ambiente. As amostras e os padrões foram carregados e incubados durante 2 horas em temperatura ambiente. O respectivo anticorpo biotinilado foi adicionado e incubado por 1 h em temperatura ambiente. A estreptavidina conjugada à peroxidase de rábano em tampão de bloqueio foi adicionada e incubada por 1 hora em temperatura ambiente, seguida pela adição de solução de substrato cromogênico 7 (3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina). A reação foi realizada por 30 min e interrompida com ácido sulfúrico 4M, e a DO foi medida em um comprimento de onda de 450 nm. As placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,4, com 0,1% de Tween 20) após cada etapa.

4.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real

As hemi-mandíbulas foram cortadas (excluindo o ramo mandibular e o dente incisivo), limpas do tecido mole adjacente e pulverizadas em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído com Pure Link, RNA Mini Kit. O RNA total foi quantificado (QuantiT RiboGreen RNA Assay Kit, Invitrogen) e o DNA complementar sintetizado com 2 µg de RNA (High Capacity RNA-to-cDNA; Applied Biosystems). A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi realizada em equipamento StepOne Plus™ Real-Time PCR, com ensaios TaqMan™. A expressão dos alvos foi normalizada pela expressão de Actb (gene housekeeping), e a quantificação relativa dos alvos foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tendo como referência o grupo Controle Normal.

4.9.1 Análise estatística

Após aprovação no teste de distribuição de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguido de teste post hoc de Sidak. Os dados são representados como gráficos de colunas, plotados com média e erro padrão. Para todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e as comparações múltiplas compostas de (a) Controle vs. PD, (b) PD vs. animais

tratados com Alisk com PD, e (c) Normal vs. Diabético na mesma condição experimental. Todas as análises foram realizadas no software estatístico Graph Pad Prism v8.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, Califórnia, EUA).

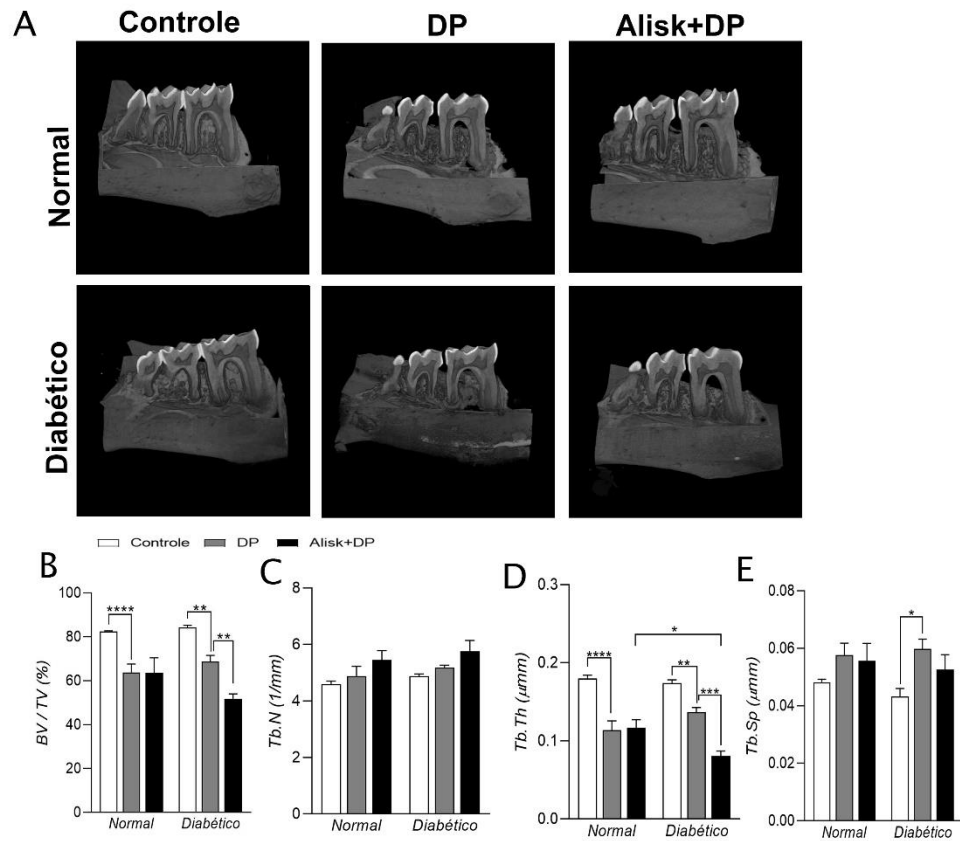
RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Camundongos normais e diabéticos com DP apresentam perda óssea significativa

Inicialmente analisamos os efeitos da DP e do tratamento com Alisk através de micro Ct, (figura 1A) avaliando os parâmetros arquitetônicos e porcentagem óssea nos grupos. Observou-se níveis semelhantes desses parâmetros nos grupos controle, normal e diabético. Por outro lado, a indução da doença periodontal foi capaz de reduzir significativamente o volume ósseo, indicando grande reabsorção na indução da DP. Foi evidenciado pela redução do percentual ósseo (%BV/TV) e, pela redução da espessura trabecular (Tb.Th) (figura 1D). No entanto, não foram observadas alterações no número trabecular (Tb.Nb), mas a DP aumentou a separação trabecular (Tb.Sp) em camundongos diabéticos. (Figuras 1C, E). O tratamento com Alisk não alterou significativamente a perda óssea em camundongos normais, mas em camundongos diabéticos com DP, observou-se piora do quadro de reabsorção (Figura 1B), que foi acompanhado pela redução da espessura trabecular (Tb.Th) (Figura 1D).

Figura 1 - Análise microtomográfica da mandíbula de camundongos normais e diabéticos (com DP 15 dias, tratados com alisquireno. Reconstrução tridimensional da mandíbula em vista lingual com corte na região de furca (A), e gráficos mostrando %BV/TV (B), Tb.N (C) , Tb.Th (D) e Tb.Sp (E) como média $\pm$ SEM (n = 5)



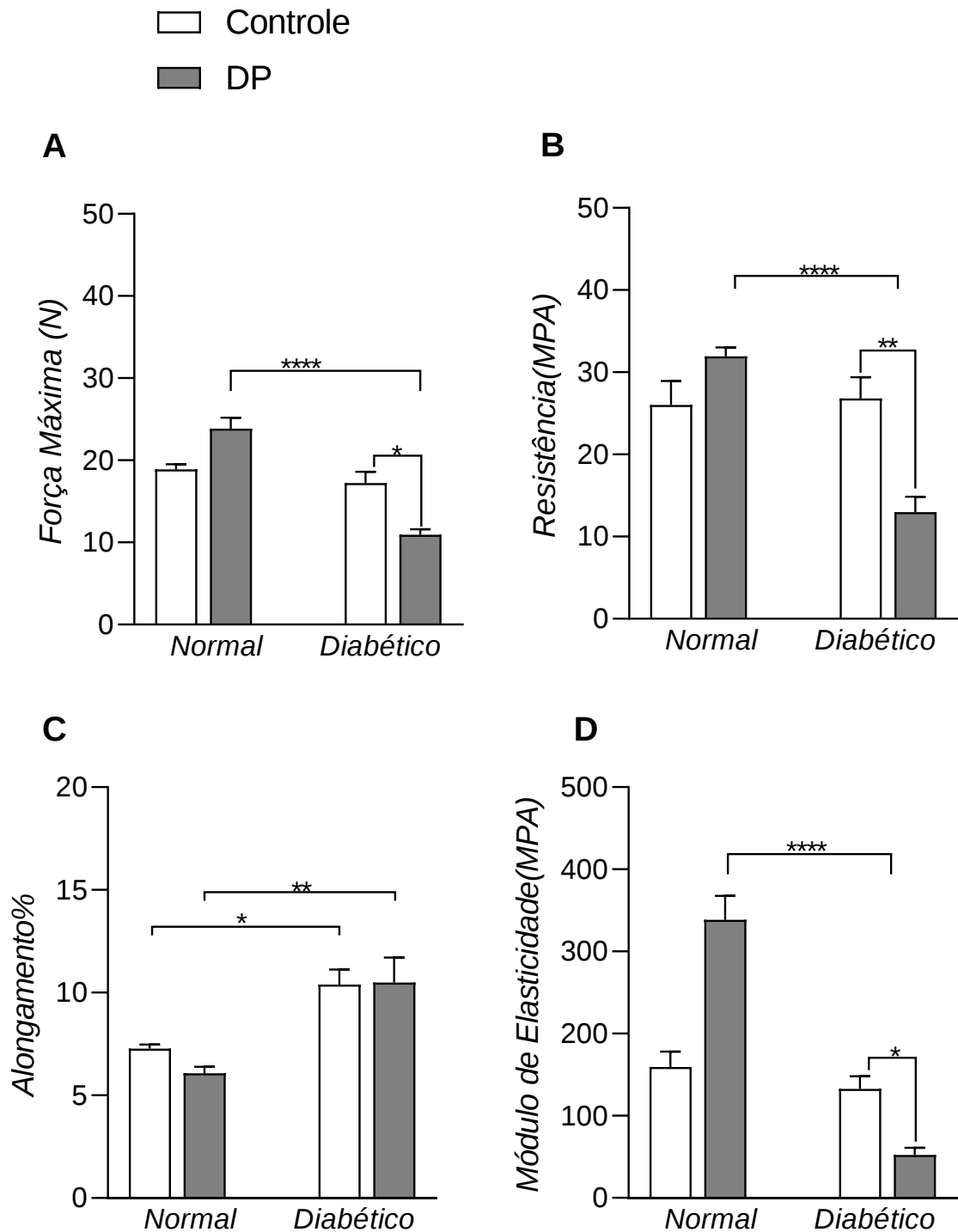
A diferença estatística é representada por colchetes marcados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$

Fonte: RIBEIRO B.S,2022

5.2 Camundongos Diabéticos com DP mostraram menor resistência a fratura

Para avaliarmos a resistência do osso, realizamos um ensaio mecânico nas amostras de mandíbula, onde observamos uma diferença significativa nos camundongos diabéticos com doença periodontal (D+DP) em relação aos camundongos normais com DP (N+DP). A mandíbula dos camundongos diabéticos mostrou uma menor resistência a fratura comparado aos camundongos normais, evidenciando que o animal diabético com DP(D+DP) tem um osso deteriorado e que foi necessária uma força muito menor para induzir uma fratura em tal amostra (Figura 2 A e B).

Figura 2 - Ensaio Mecânico na mandíbula de camundongos normais e diabéticos (com DP 15 dias, (A) Força máxima, (B) Resistência a fratura, (C) Alongamento e (D) Modulo de Elasticidade



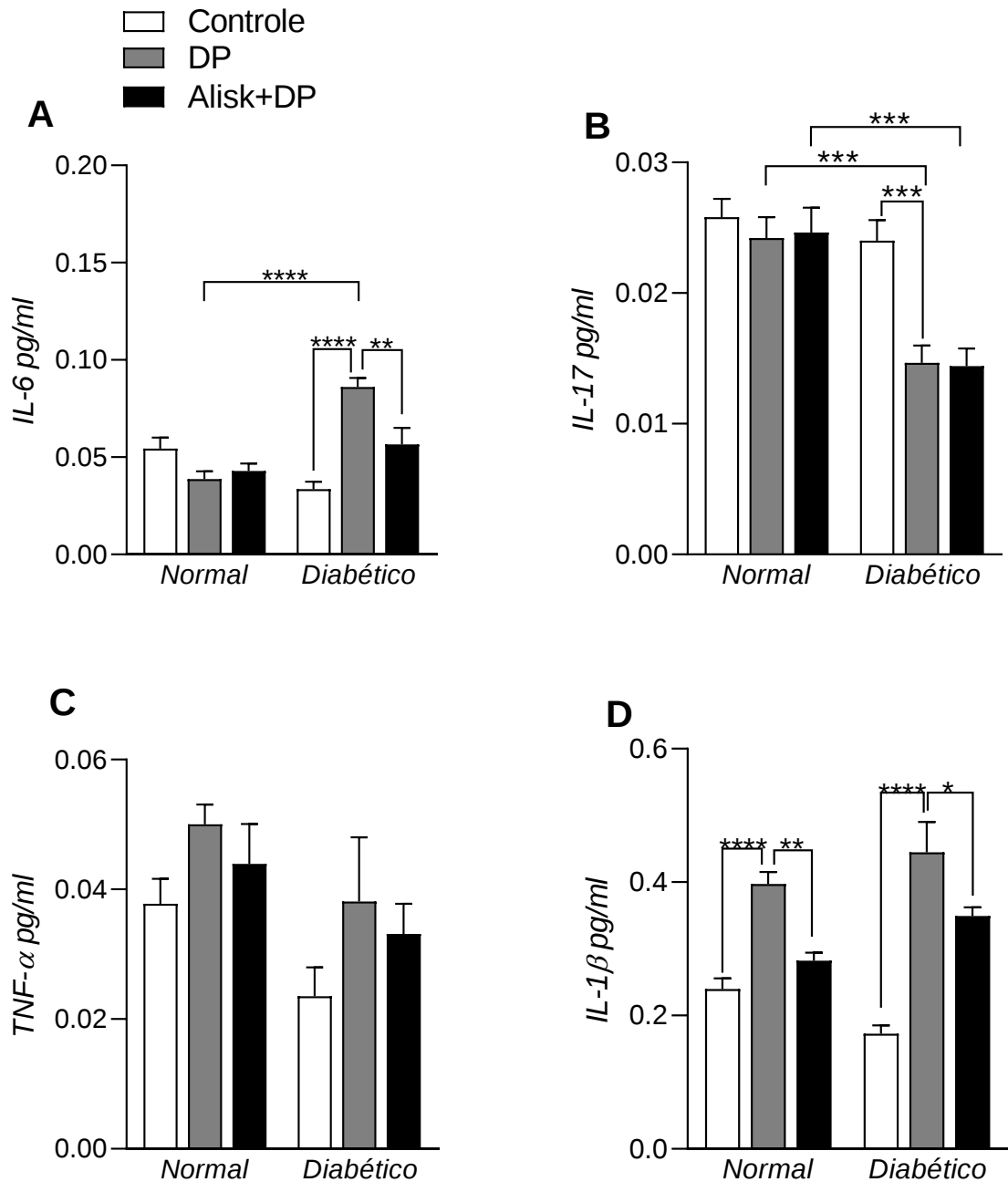
Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$

Fonte: RIBEIRO B.S,2022

5.3 A doença periodontal aumenta a produção de IL-6 e IL-1 β e diminui a produção de IL-17 nas mandíbulas de camundongos diabéticos

Para investigar o processo inflamatório causado pela DP e diabetes mellitus, analisamos a produção de citocinas inflamatórias na mandíbula de camundongos normais e diabéticos, com DP, tratados com Alisk. A DP em camundongos diabéticos foi capaz de aumentar significativamente a produção de IL-6 e IL-1 β e diminuir a produção de IL-17 (DPD) (figura 2A, B, D). Em camundongos normais com DP, também foi observado aumento de IL-1 β (NPD) (figura 2D). O tratamento com alisk foi capaz de diminuir a produção de IL-6 e IL-1 β em camundongos diabéticos (DAisk+DP). Tal perfil de resposta também é observado em camundongos normais apenas em relação à IL-1 β . (NAisk+DP) (figura A, D).

Figura 3 - Expressão de citocinas pró-inflamatórias na mandíbula dos camundongos (A) IL-6, (B), IL-17, (C) TNF- α e (D) IL-1 β . Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6)



Diferenças estatísticas representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$)

Fonte: RIBEIRO B.S,2022

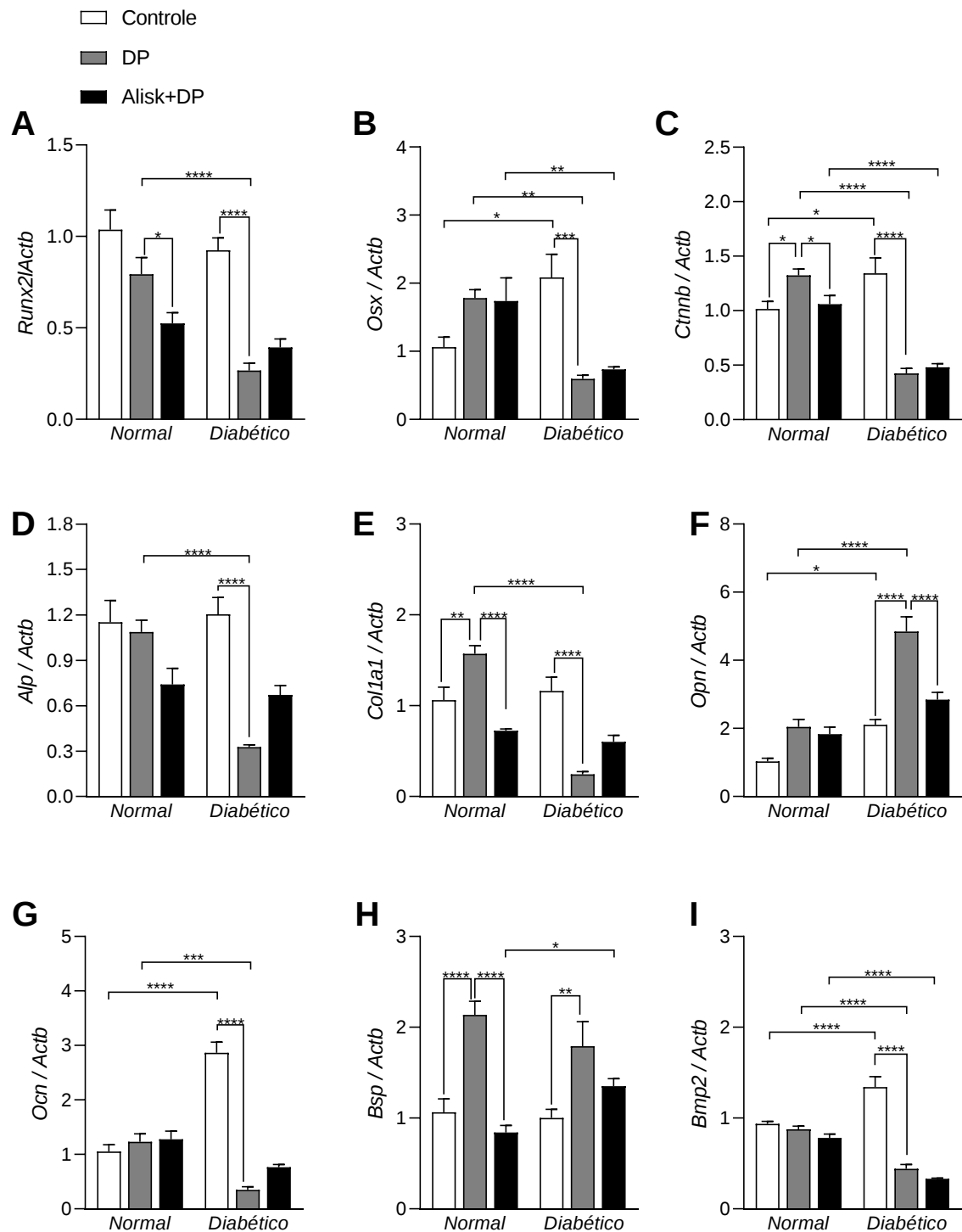
5.4 Doença periodontal diminui a expressão de fatores de

transcrição relacionados à formação óssea em camundongos diabéticos, e diminui a expressão de Alp, Col1a1, Ocn e Bmp2.

Para melhor compreensão do efeito local do diabetes na resposta óssea induzida pela DP, avaliamos a expressão gênica dos fatores de transcrição da formação óssea, Runx2, Osx e Ctnnb, na mandíbula de camundongos normais e diabéticos, com DP, tratados com Alisk. A DP aumentou significativamente a expressão de Ctnnb e diminuiu a expressão de Runx2 em animais normais (NDP), enquanto em animais diabéticos (DDP), observamos uma redução na expressão de Runx2, Osx e Ctnnb, em comparação com os respectivos controles (DC). O tratamento com Alisk levou a uma diminuição significativa na expressão de Runx2 e Ctnnb, em camundongos normais (NAlisk+DP), enquanto em camundongos diabéticos, não foram observadas diferenças significativas quando comparados aos seus respectivos controles (D+PD) (figura 4 A, B, C).

Para entender melhor o efeito de Alisk nos marcadores de formação óssea, investigamos a expressão gênica em camundongos normais e diabéticos com DP. A DP induziu um aumento em Col1a1 e Bsp em camundongos normais (NPD) (Figura 4 E, H). Em camundongos diabéticos, a DP induziu diminuição da expressão de Alp, Col1a1, Ocn e BmP2, (figura 4D, E, G, I) e aumento da expressão de Opn e Bsp (DPD) (figura 4F, H). O tratamento com Alisk diminuiu a expressão de Col1a1 e Bsp em camundongos normais com DP (Nalisk+DP), enquanto em camundongos diabéticos, apenas diminuiu a expressão de Opn (Dalisk+DP) (figura 4E, H).

Figura 4 - Expressão genica de fatores de transcrição da formação óssea na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Runx2(A), Osterix (Osx) (B), β -catenina (Ctnnb) (C) e alvos de formação óssea na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Alp (D), Col1a1 (E), Opn (F), Ocn (G), Bsp (H), Bmp2 (I). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6)



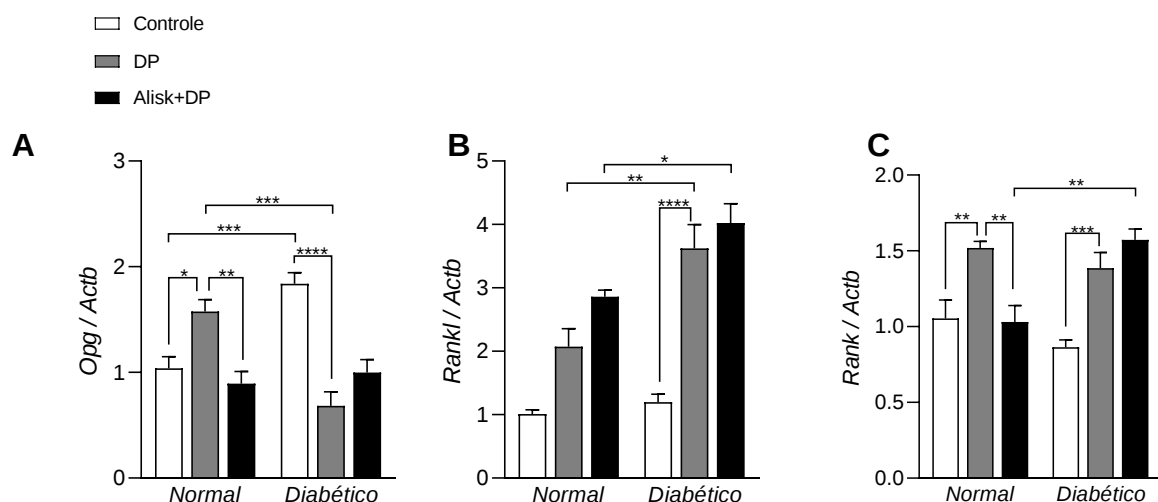
Diferenças estatísticas representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$)

Fonte: RIBEIRO B.S,2022

5.6 Alisquireno modula a expressão do eixo Opg/Rankl/Rank em camundongos normais, mas não em camundongos diabéticos

Avaliamos a expressão gênica do eixo Opg/Rankl/Rank como indicadores chave de remodelação e dinâmica óssea. Observamos que a DP foi capaz de aumentar o nível de expressão de Opg e Rank em camundongos normais (NDP) (figura 5A, C), enquanto em camundongos diabéticos com DP, houve aumento na expressão de Rank e Rankl e diminuição de a expressão de Opg (DDP). No grupo controle, a expressão de Opg foi menor no controle normal (NC) em relação ao controle diabético (DC), porém, não houve diferença significativa na expressão de Rankl e Rank. O tratamento com Alisk diminui a expressão de Opg e Rank apenas em camundongos normais (NALisk+DP), mas não altera a expressão em camundongos diabéticos (DALisk+DP) (figura 5A, C).

Figura 5 - Expressão gênica do eixo Opg/Rankl/Rank na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Opg (A), Rankl (B), Rank (C). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6)



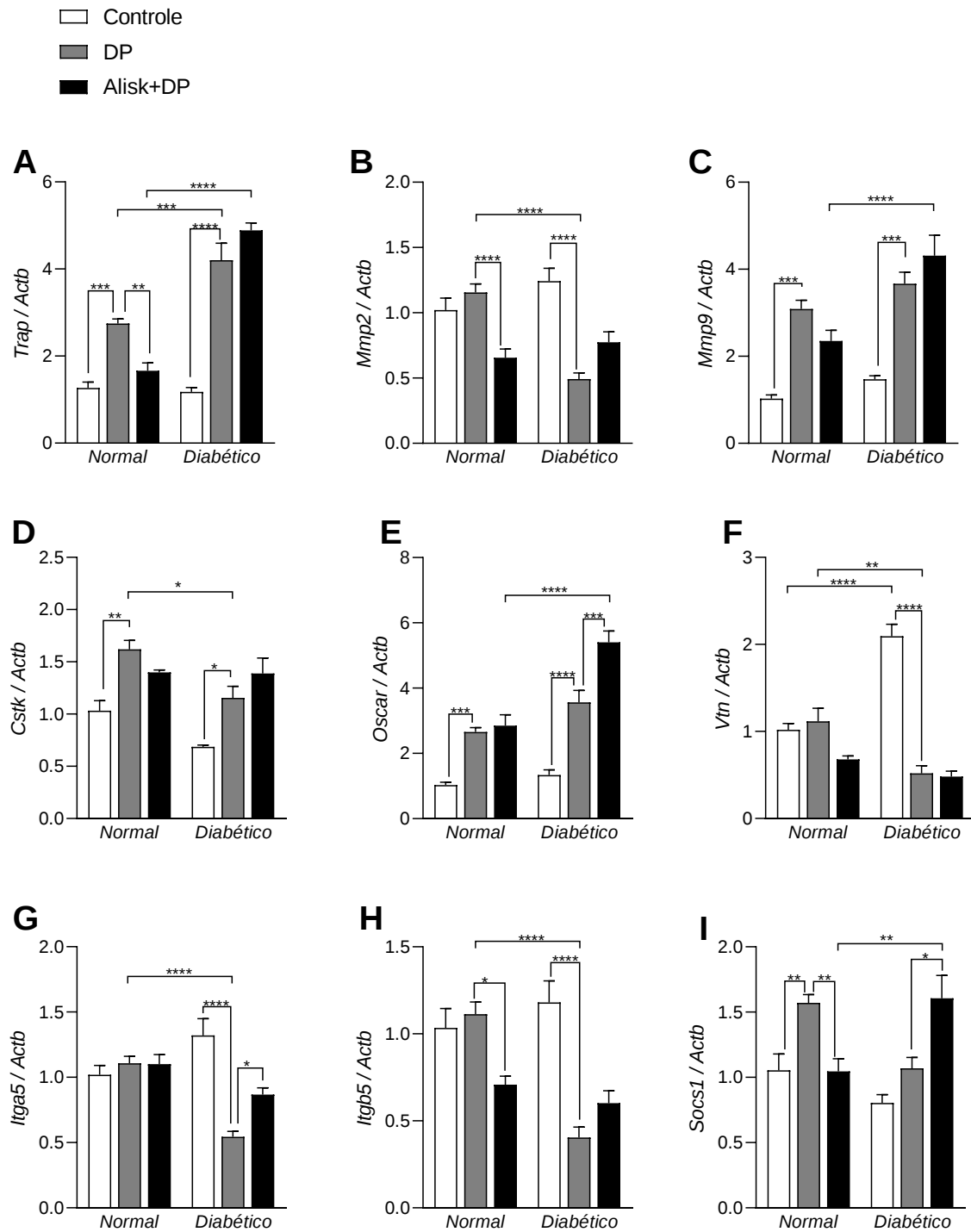
Diferenças estatísticas representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$)

Fonte: RIBEIRO B.S, 2022

5.7 Doença periodontal aumenta expressão gênica de marcadores de reabsorção óssea

Por fim, avaliou-se a expressão de marcadores de reabsorção óssea e notamos que DP foi capaz de induzir um aumento na produção de Trap, Mmp9, Cstk e Oscar em camundongos normais (NPD) e diabéticos (DPD) (figura 6 A, C, D, E). Por outro lado, observamos uma diminuição na expressão de Mmp2, Vtn, Itga5 e Itgb5 em camundongos diabéticos com DP (DDP), mas não em camundongos normais (figura 6B, F, G, H). O tratamento com alisquireno foi capaz de reduzir a expressão de Trap, Mmp2 e Itgb5 em camundongos normais tratados com alisk (NALisk+DP) (Figura 6A, B, H). Enquanto o tratamento em camundongos diabéticos (DALisk+DP) aumentou a expressão de Oscar e Itga5 (figura 6E, G).

Figura 6 - Expressão gênica de marcadores de reabsorção óssea na mandíbula dos camundongos. qRT-PCR para Trap (A), Mmp2 (B), Mmp9 (C), Ctsk (D), Oscar (E), Vtn (F), Itga5 (G), Itgb5 (H) e Socs1 (I). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6)

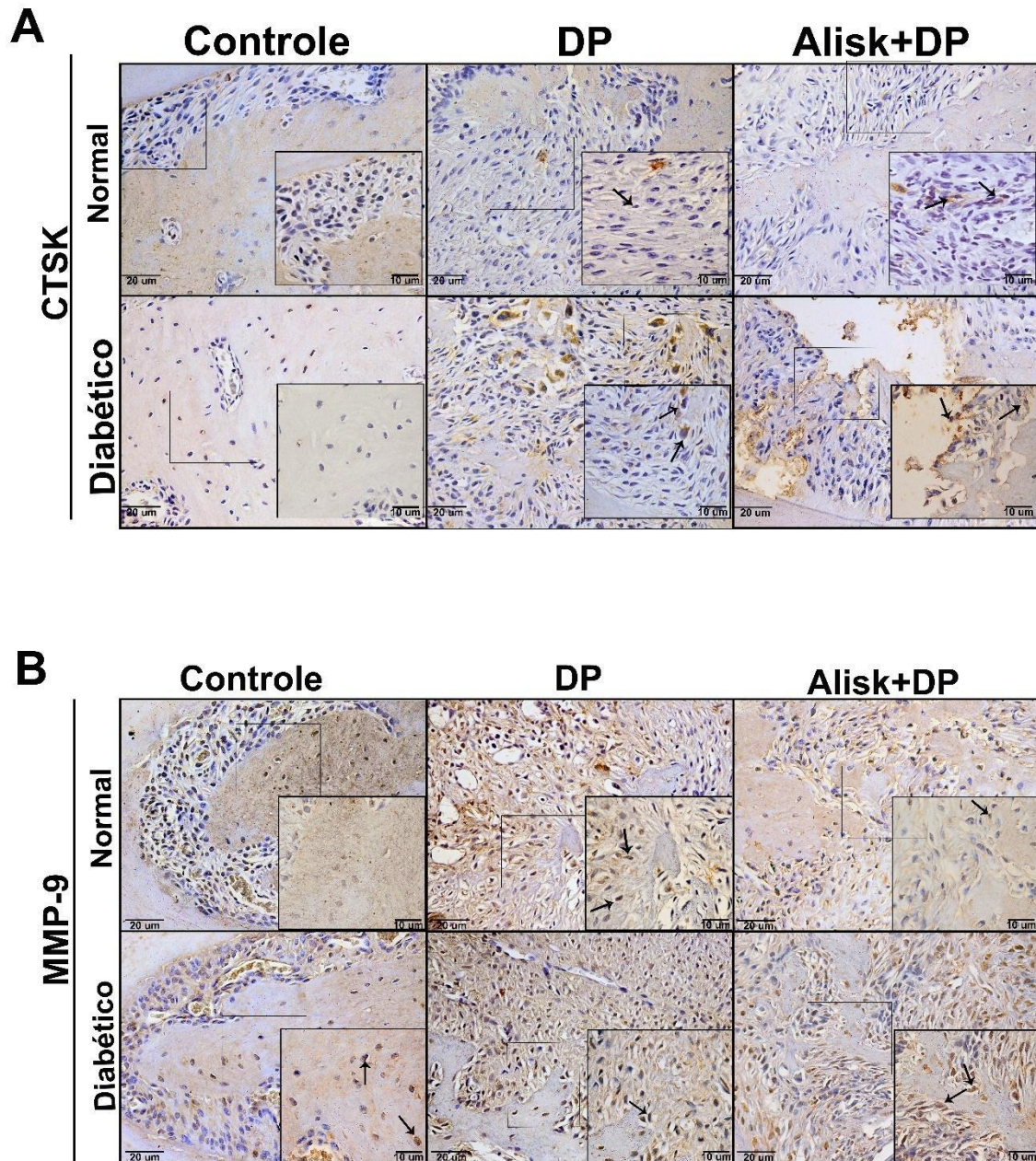


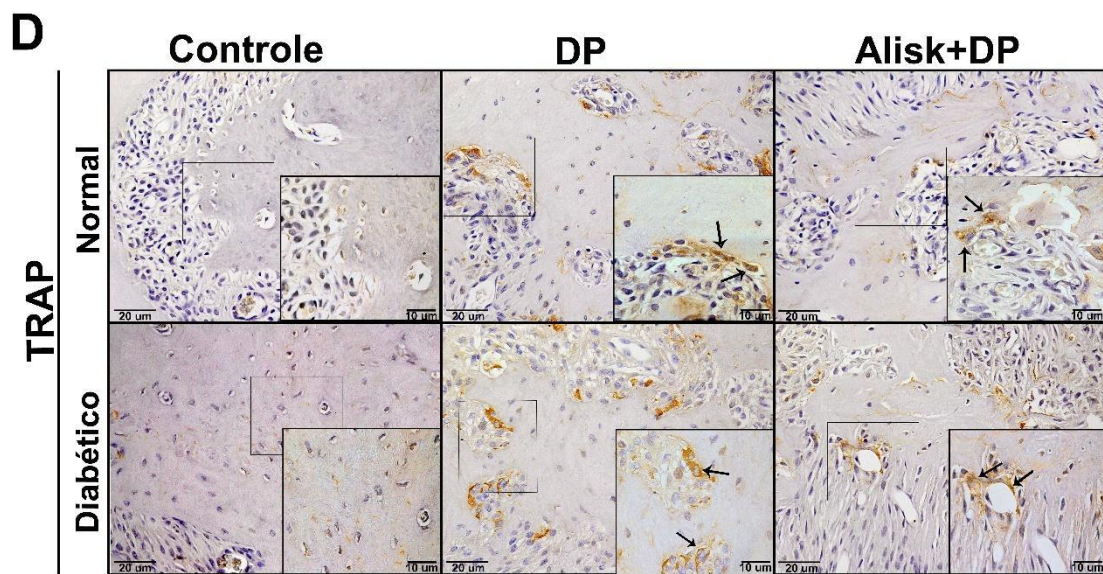
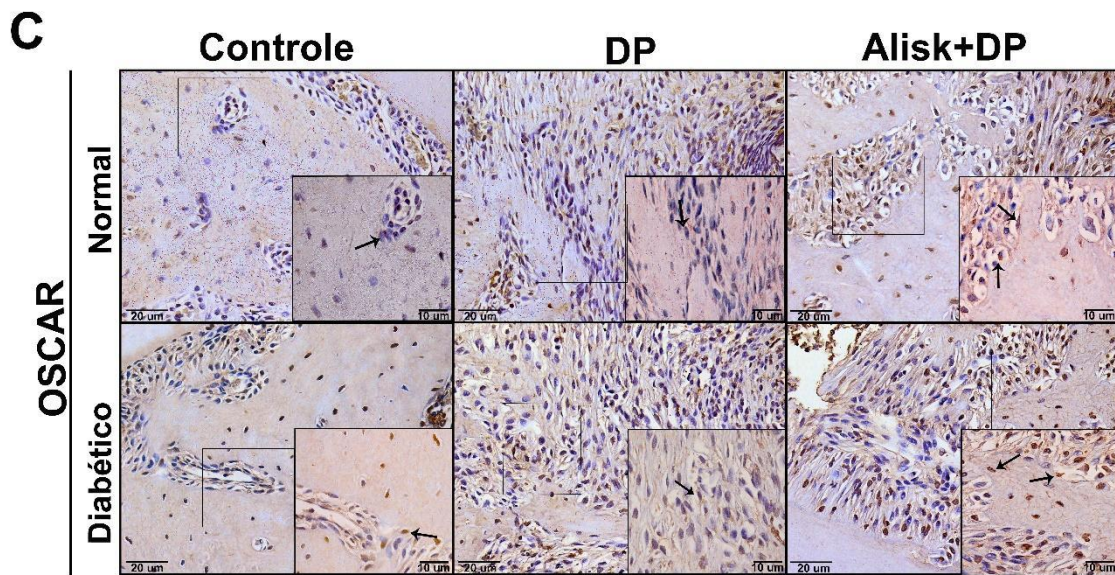
Diferenças estatísticas representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$)

Fonte: RIBEIRO B.S, 2022

Fonte: RIBEIRO B.S,2022

Figura 7 - Expressão tecidual de marcadores de reabsorção óssea na mandíbula dos camundongos. Imunohistoquímica para Ctsk (A), Mmp9 (B), Oscar (C), e Trap(D)





Os resultados representam padrão de avaliação de marcação considerando os seguintes conceitos;
 (+) marcação fraca, (++) marcação intermediária e (+++) marcação forte

Fonte: RIBEIRO B.S,2022

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nossos dados demonstram que a renina teve um papel protetor na reabsorção óssea alveolar induzida pela DP em camundongos diabéticos, o que foi evidenciado por um aumento na reabsorção óssea, e não alteração dos marcadores de formação óssea, aumento no fator de reabsorção óssea e citocinas osteoclastogênicas após o tratamento com Alisk, um inibidor de renina.

A renina é a enzima inicial para ativação do sistema renina-angiotensina. A clivagem de angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) pela ação da renina e posteriormente angiotensina I em II por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Ang II). Os receptores de renina ligam tanto a pró-renina quanto a renina. (30) Dois receptores de renina são abundantes no coração, cérebro e placenta, sendo encontrados níveis mais baixos no rim e fígado. (31) Embora o RAS esteja envolvido no metabolismo ósseo, não há estudos investigando o papel da renina nesse mecanismo.

camundongos N e D, mas não foi detectada diferença significativa entre os dois grupos. Estudos também realizados em camundongos D mostraram que a perda óssea alveolar foi maior no D, mas a indução da DP nesses animais foi realizada com a inoculação do patógeno humano *P. gingivalis* e o período experimental foi muito superior ao utilizado em nosso estudo, considerando um tempo experimental mínimo de 2 meses. (32) Assim acreditamos que o período experimental de 15 dias utilizado em nosso estudo pode não ter sido suficiente para demonstrar a diferença da perda óssea entre os grupos (N e D). Kim et al. (13) demonstraram que a reabsorção óssea induzida pela DP e avaliada 15 dias após foi mais pronunciada em animais diabéticos, mas esses ensaios foram realizados em ratos e não em camundongos como o nosso

estudo. Possivelmente há uma diferença em relação à resposta do metabolismo ósseo entre as espécies, considerando que o turnover ósseo no camundongo é mais acentuado do que no rato, além disso o ensaio mecânico evidenciou que apesar de não haver uma diferença significativa entre os grupos em relação a reabsorção óssea, o osso do camundongo diabético com DP (D+PD) se mostra mais prejudicado e deteriorado sendo menos resistente a fratura comparada ao camundongo normal com DP(N+DP). O efeito de Alisk foi significativo apenas em animais diabéticos, piorando a reabsorção óssea alveolar, embora a literatura relate que a inibição do SRA com drogas como Telmisartan antagonista do AT1R e Losartana, inibidor da ECA, pode ter papel protetor no metabolismo ósseo. (33) Nossos resultados mostraram que a ausência de renina causa maior perda óssea alveolar em animais D, sugerindo que a renina teria um efeito protetor no metabolismo ósseo.

Em seguida, avaliamos a produção de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que podem estar envolvidos na formação e/ou reabsorção óssea. Nossos resultados mostraram que a DP foi capaz de aumentar significativamente a produção de IL-1 β em camundongos N e D, enquanto o aumento de IL-6 foi observado apenas em D. Tais citocinas, além do processo inflamatório, são classificadas como citocinas osteoclastogênicas, onde foi observado que a IL-6 já demonstrou aumentar a destruição óssea inflamatória. (34) Estudos relacionados ao papel de citocinas pró-inflamatórias no metabolismo ósseo, especificamente, a IL-1 β tem sido associada ao aumento da reabsorção óssea, (35) enquanto a IL-6 pode ser expressa por osteoblastos e assim induzir a reabsorção óssea. (36) Em nosso estudo, o tratamento com Alisk foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-6 e IL-1 β , sugerindo que, a renina está regulando a produção dessas citocinas. Além disso, causou uma

melhora na reabsorção óssea ao diminuir a expressão de IL-1 β e IL-6 sugerindo que ambas as citocinas têm influência significativa na reabsorção óssea.

A próxima etapa foi investigar as alterações nos marcadores do metabolismo ósseo que poderiam ajudar a compreender a resposta biológica. Os resultados obtidos em relação aos alvos de formação óssea mostraram maior expressão de Alp, Col1a1, Ocn e Bmp2 em animais diabéticos enquanto a indução da DP causou uma diminuição nesta expressão. A análise da expressão de marcadores de transcrição óssea corrobora os resultados obtidos em relação aos fatores de formação óssea. Essa alteração pode ser explicada porque o diabetes mellitus provoca um ambiente inflamatório muito propício para gerar alterações metabólicas, e no metabolismo ósseo não é diferente. Muitos estudos mostraram que o processo de formação e reparo ósseo é bastante prejudicado pelo diabetes. (37) Nossos dados mostram que importantes fatores de formação óssea estão aumentados e isso provavelmente se deve às consequências geradas como resultado dessa doença metabólica. Por outro lado, A indução de DP em animais diabéticos causou um aumento na expressão de Opn, que foi reduzida pelo tratamento com Alisk, levando-nos a acreditar que este marcador esteja atuando como uma citocina pró-inflamatória conforme descrito na literatura. (38) A osteopontina, além de ser um grande componente da matriz extracelular óssea, também atua como uma citocina solúvel, presente em diversas patologias, tendo sua resposta mediada por células Th1 além de estimular a produção de citocinas Th1 e degradação da matriz. (39) Além disso, a diminuição de sua expressão com o tratamento com Alisk é outro fator que nos leva a associar o aumento dessa citocina como mediador pró-inflamatório.

A indução de DP diminuiu a expressão de Alp, Col1a1, Ocn e Bmp2 em camundongos diabéticos, o que também foi observado em relação aos fatores de

transcrição, em que a DP reduziu drasticamente a expressão de Runx2, Osx e Ctnnb em animais diabéticos, o que pode ser explicado devido à hiperglicemia constante em conjunto com a DP, levando a respostas imunoinflamatórias exageradas que provavelmente são responsáveis pela maior gravidade da DP e, conseqüentemente, diminuição dos fatores de transcrição, afetando o metabolismo ósseo. (40) Por outro lado, a DP em animais normais causou um aumento significativo de Col1a1 e Bsp, sugerindo que pode estar ocorrendo um mecanismo compensatório, para que o organismo tente estabilizar a homeostase devido a acentuada perda óssea, visto essas duas proteínas estão envolvidos na formação do osso primário. (41). O tratamento com alisquireno foi capaz de diminuir a expressão de Col1a1 e Bsp, mas não de Alp, Opn, Ocn e Bmp2 em animais normais, sugerindo que a renina não está regulando a maior parte dos marcadores de formação óssea. Em animais diabéticos, observamos redução na expressão apenas de Opn. Esses resultados sugerem que a renina não desempenha nenhum papel na formação óssea dos animais diabéticos, mas participa parcialmente em animais normais. Apesar de ter ocorrido um aumento na expressão de Opn, esta, como descrito anteriormente, pode estar funcionando como uma citocina pro-inflamatória.

Quanto ao eixo Opg/Rankl/Rank, que é responsável pelo controle da atividade dos osteoclastos e osteoblastos, observamos que PD aumentou a expressão de Rankl e Rank e diminuiu Opg em animais diabéticos. Na presença do diabetes, os osteoclastos são mais estimulados devido ao ambiente inflamatório gerado, que se soma a outros fatores da doença, como a produção de AGEs e RAGE, que já foram descritos por outros autores como estimuladores da atividade osteoclástica. (42) Além disso, a DP causou uma diminuição na expressão de Opg, que é um receptor solúvel, e expresso em células de linhagem osteoblástica, o que

impede que Rankl se ligue a Rank, ativando a diferenciação osteoclástica para o processo de reabsorção. (43, 44) Nossos resultados sugerem que possivelmente a interação entre Rankl-Rank foi eficaz, uma vez que foi observada uma diminuição na expressão de Opg favorecendo a reabsorção óssea principalmente em camundongos D. O efeito de Alisk foi ineficiente porque não foi capaz de aumentar o eixo Rankl-Rank em animais normais e em animais diabético, sugerindo que a renina não está modulando essa via.

A análise dos marcadores de reabsorção óssea na mandíbula revelou um aumento na expressão de Trap, Mmp9, Ctsk e Oscar em animais N e D com DP, e o mesmo padrão de resposta foi observado na marcação tecidual. Como a enzima Trap é um marcador de atividade osteoclástica e Oscar um receptor que estimula a diferenciação osteoclástica, seu aumento no grupo DPD é totalmente esperado, pois a DP causa perda óssea e na presença de diabetes se manifesta de forma exacerbada. (45) A atividade dos osteoclastos também tende a aumentar significativamente conforme observado, o que pode explicar o aumento de Ctsk e Mmp9 sugerindo a participação de ambos na perda óssea. Por outro lado, também observamos aumento na expressão de Mmp9 e diminuição de Vtn, Itga5 e Itgb5 em animais diabéticos com DP. O indivíduo diabético como descrito acima é extremamente propenso à inflamação devido à hiperglicemia, dessa forma, sugerimos que o ambiente inflamatório pode estar envolvido no aumento de MMP-9. (46)

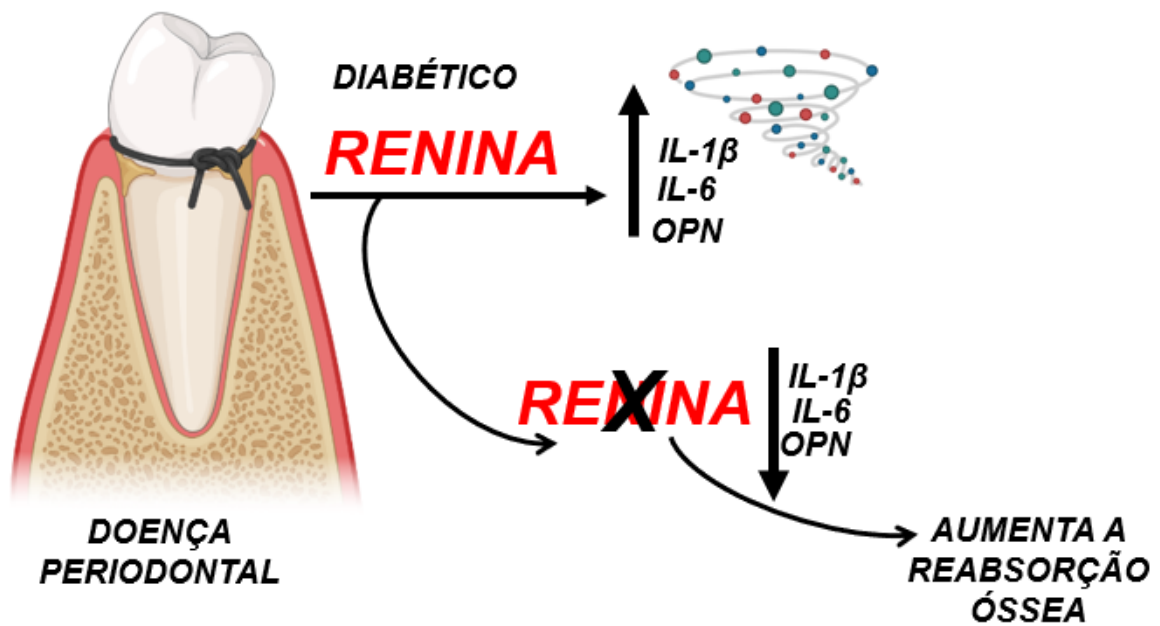
Por outro lado, a indução da DP deixa os animais mais inflamados e sabe-se que a inflamação exacerbada pode desencadear desequilíbrios nas expressão de integrinas e vitronectina, que são proteínas de adesão óssea muito importantes, principalmente no diabetes. (47) O tratamento com Alisk foi capaz de diminuir significativamente a expressão de Trap e Mmp2 em animais normais, sugerindo que

a renina regula esses marcadores de reabsorção óssea. Em animais diabéticos, o tratamento com Alisk causou aumento de Oscar, reverteu a diminuição de Igta5 induzida pela DP e aumentou Socs1. No entanto, não alterou a expressão de Trap e Mmp-9. Como o Socs1, que é um fator de transcrição que aumenta significativamente a osteoclastogênese, (48) e Oscar é um regulador da atividade osteoclástica podemos sugerir que a renina tem um efeito protetor na indução da reabsorção óssea nesses animais.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a doença periodontal em animais diabéticos provoca uma maior reabsorção óssea, por aumentar a expressão de marcadores envolvidos na perda óssea alveolar, como Oscar e Socs-1, e citocinas osteoclastogênicas via regulação da renina



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Kaur G, Mohindra K, Singla S. Autoimmunity-Basics and link with periodontal disease. *Autoimmun Rev.* 2017;16(1):64-71.
2. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:503754.
3. Botero JE, Rosing CK, Duque A, Jaramillo A, Contreras A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontol 2000.* 2015;67(1):34-57.
4. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17038.
5. Mawardi HH, Elbadawi LS, Sonis ST. Current understanding of the relationship between periodontal and systemic diseases. *Saudi Med J.* 2015;36(2):150-8.
6. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539-53.
7. Akbari F, Shahinfard N, Mirhoseini M, Shirzad H, Heidarian E, Hajian S, et al. Impacts of Hibiscus esculentus extract on glucose and lipid profile of diabetic rats. *J Nephropharmacol.* 2016;5(2):80-5.
8. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33 Suppl 1:S62-9.
9. Daniel R, Gokulanathan S, Shanmugasundaram N, Lakshmigandhan M, Kavin T. Diabetes and periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):S280-2.
10. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16(1):329-34.
11. Stanko P, Izakovicova Holla L. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014;158(1):35-8.
12. Wu YY, Xiao E, Graves DT. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. *Int J Oral Sci.* 2015;7(2):63-72.

13. Kim JH, Lee DE, Choi SH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Diabetic characteristics and alveolar bone loss in streptozotocin- and streptozotocin-nicotinamide-treated rats with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):792-800.
14. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012;55(1):21-31.
15. Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol.* 2001;26 Suppl:S153-66.
16. MacDonald BR, Gowen M. The cell biology of bone. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1993;7(3):421-43.
17. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008;61(5):577-87.
18. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol.* 2016;18:9-16.
19. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest.* 1988;81(2):277-81.
20. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(12):1361-6.
21. Lynda F. Bonewald, Mark L. Johnson, Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling, *Bone*, Volume 42, Issue 4, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.224>.
22. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86(3):747-803.
23. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl B):9-20.

24. Perez-Castrillon JL, De Luis D, Inglada L, Olmos Martinez JM, Pinacho F, Conde R, et al. [Telmisartan effect's on remodelling bone markers in hypertensive patients]. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):276-80.
25. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 2004;43(5):993-1002.
26. Asaba Y, Ito M, Fumoto T, Watanabe K, Fukuhara R, Takeshita S, et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):241-50.
27. Zhang Y, Wang L, Song Y, Zhao X, Wong MS, Zhang W. Renin inhibitor aliskiren exerts beneficial effect on trabecular bone by regulating skeletal renin-angiotensin system and kallikrein-kinin system in ovariectomized mice. *Osteoporos Int.* 2016;27(3):1083-92.
28. Santos CF, Morandini AC, Dionisio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134601.
29. Bonato CF, do-Amaral CC, Belini L, Salzedas LM, Oliveira SH. Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *J Periodontal Res.* 2012;47(6):783-92.
30. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
31. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int.* 2006;69(9):1503-6.
32. Ichihara A, Yatabe MS. The (pro)renin receptor in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(11):693-712.
33. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res.* 1998;33(7):387-99.
34. Brito VGB, Patrocinio MS, Linjardi MC, Emanuelli Alves Barreto A, Frasnelli SC, Lara V, et al. Corrigendum: Telmisartan Prevents Alveolar Bone Loss by Decreasing

the Expression of Osteoclasts Markers in Hypertensive Rats With Periodontal Disease. *Front Pharmacol*. 2020;11:635927.

35. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun*. 2001;69(2):744-50.

36. Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest*. 1994;93(5):1959-67.

37. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*. 1990;145(10):3297-303.

38. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*. 1995;44(7):775-82.

39. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal*. 2009;3(3-4):311-22.

40. Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, Arias-Magallona S, et al. Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;112(9):1318-31.

41. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3.

42. Klein A, Baranowski A, Ritz U, Mack C, Gotz H, Langendorf E, et al. Effect of bone sialoprotein coating on progression of bone formation in a femoral defect model in rats. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(2):277-86.

43. Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 5:54-7.

44. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253(2):395-400.

45. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:385-96.

46. Poplawska-Kita A, Siewko K, Szpak P, Krol B, Telejko B, Klimiuk PA, et al. Association between type 1 diabetes and periodontal health. *Adv Med Sci*. 2014;59(1):126-31.
47. Shiau MY, Tsai ST, Tsai KJ, Haung ML, Hsu YT, Chang YH. Increased circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med*. 2006;73(7):1024-8.
48. Yoon S, Gingras D, Bendayan M. Alterations of vitronectin and its receptor alpha(v) integrin in the rat renal glomerular wall during diabetes. *Am J Kidney Dis*. 2001;38(6):1298-306.
49. Lafferty MK, Fantry L, Bryant J, Jones O, Hammoud D, Weitzmann MN, et al. Elevated suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1): a mechanism for dysregulated osteoclastogenesis in HIV transgenic rats. *Pathog Dis*. 2014;71(1):81-9.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - 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 "**Sistema renina-angiotensina e metabolismo ósseo periodontal: participação de microRNAs e mastócitos na resposta inflamatória em modelos animais de hipertensão e diabetes**", Processo FOA nº 00974-2016, 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 19 de Abril de 2017.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 19 de Outubro de 2022.

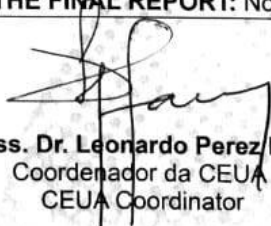
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 19 de Novembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Renin-angiotensin system and periodontal bone metabolism: involvement of microRNAs and mast cells in inflammatory responses in animal models of hypertension and diabetes**", Protocol FOA nº 00974-2016, 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 April 19, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 19, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 19, 2022.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
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