

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

DAYANE PRISCILLA DE SOUZA QUEIROZ BARBOSA

**ALISQUIRENO DIMINUI A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A SEVERIDADE
DA PERIODONTITE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS.**

Araçatuba – SP

2018

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

DAYANE PRISCILLA DE SOUZA QUEIROZ BARBOSA

**ALISQUIRENO DIMINUIU A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A SEVERIDADE
DA PERIODONTITE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS.**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, como parte final dos requisitos para a obtenção do título de “Doutor em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Profa. Tit. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araçatuba – SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B238t Barbosa, Dayane Priscilla de Souza Queiroz.
Tratamento com alisquireno diminui a resposta inflama-
tória e a severidade da periodontite experimental induzida
em camundongos diabéticos / Dayane Priscilla de Souza
Queiroz Barbosa. – Araçatuba, 2018
111 f. : il.

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

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

CDD 612

DADOS CURRICULARES

DAYANE PRISCILLA DE SOUZA QUEIROZ BARBOSA

Nascimento: 06 de Maio de 1988

Localidade: Santa Fé do Sul – São Paulo

Filiação: Célio Pinheiro de Queiroz e Ana Amélia de Souza Queiroz

2006 – 2009: Graduação em Farmácia pela Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP-ANHANGUERA, Campo Grande- MS

2009 – 2011: Pós – graduação *Lato Sensu* em Farmacologia Clínica e Gestão em Farmácias e Drogarias, pela Faculdade de Oswaldo Cruz, São Paulo- SP

2011-2013: Curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Mestrado acadêmico, pelo Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande -MS.

2014-2018: Curso de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas, nível Doutorado, pelo Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Júnior” (Foa/Unesp).

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos João Pedro, e a Maria Clara que encontra-se à caminho, ao meu esposo Max.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas, por sempre guiar os meus passos e fortalecer a minha fé.

A minha orientadora, professora Sandra Helena Penha de Oliveira pela oportunidade de grande aprendizagem, e pelo crescimento profissional e científico.

Agradeço imensamente a minha família, ao meu esposo Max por sempre me apoiar e nunca ter deixado eu desistir. Só tenho gratidão a ti por ser meu alicerce, meu espelho e principalmente meu companheiro ao longo desta jornada. Também agradeço ao meu pequeno João Pedro, meu filho, meu maior amor, que chegou ao longo do doutorado, mas que indiretamente me deu forças para vencer e chegar até aqui.

Agradecimento em especial aos meus pais Célio e Ana Amélia que não mediram esforços em minha educação, sempre me apoiaram a seguir a carreira acadêmica, acreditando em meu potencial. Obrigada por cuidarem do nosso pequeno João Pedro no momento em que eu precisei me ausentar para dedicar ao doutorado.

Ao meu irmão, Célio Júnior, pelo apoio, carinho, e hospitalidade quando passei uma temporada em São Paulo para cumprir as disciplinas na USP.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas por todo auxílio e contribuição científica, principalmente aos professores Cristina Antoniali, Suely Bonfim e Edilson Ervolino pela grande contribuição com o presente trabalho por meio do Exame Geral de Qualificação.

Ao professor Edilson Ervolino, professora Vanessa Soares Lara, por todo suporte, auxílio e orientação na execução das metodologias referentes aos processamentos histológicos e Imunohistoquímica.

A pós-graduanda Paula Faleiros, Mariane Azuma, Karen Pinke e as técnicas do laboratório de histologia Tânia e Daniele pelo ensinamento e auxílio para realização dos cortes histológicos das mandíbulas dos camundongos.

A todos os amigos que torceram por mim, principalmente aos amigos do departamento de Ciências Básicas, pela amizade, companheirismo e diversão que tornaram meus dias mais alegres.

Ao Victor Gustavo Balera Brito, um agradecimento mais do que especial, obrigada por ter sido um verdadeiro anjo em minha vida, um companheiro imensurável, um “irmão” como todos diziam. Não tenho palavras para agradecer por todo companheirismo, apoio, dedicação, amizade. Também não poderia deixar de agradecer à Carluci, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, dando conselhos e contribuindo com o trabalho científico. Serei eternamente grata a vocês e que nossa amizade perpetue por toda a vida.

Aos meus amigos de laboratório, a Farmaco B, por todo apoio, auxílio, carinho e amizade. Aos amigos que já passaram, Ingrid, Jéssica, Letícia, Fernanda, Maria Fernanda. E, aos amigos que continuam dividindo a bancada, as meninas da iniciação científica Bianca, Milena, Mariana, Carol, e ao José. A querida amiga da pós-graduação Ayná e Sabrina que nunca mediram esforços para me ajudar, e sempre estavam ali me dando um ombro amigo nos momentos mais difíceis. A Aline, Rodrigo e Kellen, meus sinceros agradecimentos, sem o auxílio destes seria muito mais árdua a trajetória até a conclusão deste trabalho.

Aos amigos da Farmaco A, Murilo, Jéssica, Simone que deixavam os meus dias mais alegres. Obrigada pelo companheirismo, amizade e apoio.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba e a todos seus funcionários por todo auxílio e suporte.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

“Você não pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas você pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

RESUMO

QUEIROZ, D.P.S. ALISQUIRENO DIMINUIU A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A SEVERIDADE DA PERIODONTITE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista – UNESP. Araçatuba. 2018.

Introdução: A associação do Diabetes Mellitus (DM) e a doença periodontal (DP) compromete a resposta inflamatória e o metabolismo ósseo, tornando-se uma das principais complicações geradas por estas patologias. O sistema renina-angiotensina local (SRA) tem sido encontrado em tecidos periodontais, sugerindo que este sistema pode contribuir com a resposta inflamatória e com a destruição periodontal. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da renina sobre a resposta inflamatória de camundongos normoglicêmicos e diabéticos submetidos à periodontite induzida. **Métodos:** O diabetes foi induzido em dose única por estreptozotocina (200mg/kg) em camundongos Balb/c. Para indução da DP, camundongos normoglicêmicos e diabéticos, tratados ou não com Alisquireno (50mg/kg) (Alisk), receberam uma ligadura por meio de fio de seda ao redor do primeiro molar inferior que foi mantido durante 14 dias. Mandíbulas foram removidas para análises histomorfométricas e o tecido gengival foi coletado para avaliar a expressão gênica de componentes do SRA (angiotensinogênio (Agt), renina (Ren), enzima conversora de angiotensina 1 e 2 (Eca e Eca2), receptores de angiotensina 1 e 2 (ATR1 e ATR2), e receptor de angiotensina 1-7 (MasR), além de marcadores do reparo tecidual (Col1a1, Col2a1, Col3a1, fibronectina (Fn), fator de transformação beta (TGF- β) por RT-qPCR em tempo real. A análise imuno-histoquímica (IHC) teve como objetivo detectar e localizar os componentes do SRA no tecido gengival. Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram utilizados para avaliar a produção de proteína C-reativa (CRP), CXCL2 e CCL8 no tecido gengival. **Resultados:** Observamos a indução da doença periodontal pela perda óssea e processo inflamatório induzido 14 dias após. O tratamento com Alisk diminuiu a resposta inflamatória e previniu a perda óssea induzida pela DP em camundongos normoglicêmicos e diabéticos. O mRNA para Ren foi indetectável no tecido gengival, sugerindo que os efeitos observados foram de renina sistêmica. DP aumentou a

expressão de Agt, Eca em camundongos normoglicêmicos e diabéticos. A expressão de AT2R foi pronunciadamente maior apenas em camundongos normoglicêmicos com DP. O tratamento com Alisk reduziu a expressão gênica desses componentes de SRA, principalmente em camundongos diabéticos. Componentes SRA foram expressos em todas as camadas do epitélio, com marcação moderada dos componentes do tecido conjuntivo adjacentes, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células de infiltrado inflamatório. Possivelmente a renina sistêmica exacerba a resposta inflamatória tanto em animais normoglicêmicos quanto em diabéticos, apresentando produção elevada de CRP, CXCL2 e CCL8 na presença de DP. O tratamento com Alisk reduziu a produção desses marcadores inflamatórios principalmente em camundongos diabéticos. Col1a1, Col1a2, Col3a1 e Fn foram aumentados em ambos os animais com DP, enquanto que a expressão de TGF- β foi reduzida. O tratamento com Alisk reduziu a expressão de Col1a1, Col1a2, e Fn, no entanto, aumentou a expressão de TGF- β . **Conclusão:** Os resultados aqui apresentados sugerem que a renina sistêmica exacerba a resposta inflamatória, contribuindo com a severidade da DP induzida, além de modular os principais componentes da matriz extracelular no tecido gengival. Finalmente, antagonizar a renina pode ser uma ferramenta importante, no futuro, para prevenir a perda óssea e principalmente a inflamação induzida pela periodontite .

Palavras chave: doença periodontal, diabetes, sistema renina angiotensina local.

ABSTRACT

QUEIROZ, D.P.S. ALISKIREN DECREASED THE INFLAMMATORY RESPONSE AND THE SEVERITY OF INDUCED PERIODONTITIS IN DIABETIC MICE. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista – UNESP. Araçatuba. 2018.

Background: The association of Diabetes Mellitus (DM) and Periodontal disease (PD) compromises inflammatory response and bone metabolism, becoming one of the main complications generated by these pathologies. The local renin-angiotensin system (RAS) has been found in periodontal tissues, suggesting that this system may contribute to the inflammatory response and to the periodontal destruction. The objective of this study was to evaluate the role of renin on the inflammatory response and bone metabolism of normoglycemic and diabetic mice submitted to induced periodontitis. **Methods:** Diabetes was induced using a single dose of streptozotocin (200mg / kg) in Balb/c mice. For PD induction, normoglycemic and diabetic mice were treated or not with Aliskiren (50mg/kg) (Alisk), and received a silk ligature around the lower first mandibular molar which was maintained for 14 days. Mandibles were harvested for histomorphometric analysis and gingival tissue was collected to evaluate the gene expression of RAS components (angiotensinogen (Agt), renin (Ren), angiotensin converting enzyme 1 and 2 (Eca and Eca2), angiotensin 1 and 2 receptor (ATR1 and ATR2), and angiotensin 1-7 receptor (MasR), besides tissue repair markers (Col1a1, Col2a1, Col3a1, fibronectin (Fn), and transforming growth factor beta (TGF- β) by real-time RT-qPCR. Immunohistochemical analysis (IHC) aimed to detect and localize the components of RAS on gingival tissue. Immunoenzymatic assays (ELISA) were used to evaluate the production of CXCL2, CCL8 and CRP on gingival tissue. **Results:** We observed the induction of periodontal disease by bone loss and inflammatory process 14 days later. Alisk treatment decreased the inflammatory response and prevents PD-induced bone loss in normoglycemic and diabetic mice. The mRNA for Ren was undetectable on gingival tissue, suggesting that the effects were due to systemic renin. PD increased of Agt, Eca expression in normoglycemic and diabetic mice. AT2R expression was

markedly increased only in normoglycemic mice with PD. Alisk treatment reduced the gene expression of these RAS components, especially in diabetic mice. SRA components were expressed in all layers of the epithelium, with moderate labeling on adjacent connective tissue components, including fibroblasts, endothelial cells and inflammatory infiltrate cells. Systemic renin exacerbated the inflammatory response in both normoglycemic and diabetic models, presenting high production of CRP, CXCL2, and CCL8 in the presence of PD. Alisk treatment reduced these inflammatory response mainly in diabetic mice. Col1a1, Col1a2, Col3a1, and Fn were increased in both PD models, whereas TGF- β expression was reduced. Treatment with Alisk reduced the expression of Col1a1, Col1a2, and Fn, however, increased expression of TGF- β . **Conclusion:** The results suggest that systemic renin can exacerbate the inflammatory response, contributing to the severity of induced-PD, and can modulate the main components of the extracellular matrix on gingival tissue. Finally, antagonizing renin may be an important tool in the future to prevent bone loss and mainly inflammation in induced-periodontitis..

Key words: periodontal disease, diabetes, renin angiotensin systems.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais componentes do sistema renina angiotensina clássico 40
- Figura 2.** Visão atual do SRA. Surgimento de vários peptídeos, enzimas e vias alternativas 41
- Figura 3.** Delineamento experimental 51
- Figura 4.** Perda óssea alveolar pela DP induzida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos 63
- Figura 5.** Expressão gênica de Agt e Eca em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida 65
- Figura 6.** Expressão gênica de ATR1 e ATR2 em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida 67
- Figura 7.** Expressão gênica de Eca2 e MasR em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida 69
- Figura 8.** Produção de Eca no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida e tratados ou não com alisquireno por meio da técnica de IHC 71
- Figura 9.** Produção de Eca2 no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida e tratados ou não com Alisquireno 73

Figura 10. Produção de AT1R no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com a DP induzida e tratados ou não com Alisquireno 75

Figura 11. Produção de AT2R no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com a DP induzida e tratados ou não com Alisquireno 77

Figura 12. Produção de CRP, CXCL2, CCL8 em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida tratados ou não com Alisquireno 79

Figura 13. Análise quantitativa da expressão gênica de Col1a1, Col1a2, Col3a1, Fn, TGF- β 1 em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida e tratados ou não com Alisquireno 81

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE's= Produto finais de glicação avançada
Agt= Angiotensinogênio
Alisk= Alisquireno
AngI= Angiotensina I
AngII=Angiotensina II
Ang 2-8= Angiotensina III
Ang 3-8= Angiotensina IV
ATR1= Receptor de angiotensina tipo 1
ATR2= Receptor de angiotensina tipo 2
BSA= Albumina sérica bovina
CCL8= Proteína quimioatraente de monócitos 2
cDNA= Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA= Comissão de Ética de Uso de Animais
Col1a1= Colágeno tipo 1a1
col1a2= Colágeno tipo 1a2
Col3a1= Colágeno tipo 3a1
CT= Ciclo limiar
CXCL2= Proteína inflamatória de macrófago 2
D= Diabético
D+DP= Diabético com doença periodontal
DM= Diabetes mellitus
DNAse= Nuclease que catalisa a degradação do DNA
DP= Doença periodontal
ECA= Enzima conversora de angiotensina 1
ECA2= Enzima conversora de angiotensina 2
EDTA= Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA= Ensaio de imunoabsorção enzimática
EROs= espécie reativa de oxigênio
HE= Hematoxilina & Eosina
IDDM= Diabetes insulino-dependente
Masr= Receptor funcional de angiotensinas

MEC= Matriz extracelular
MP= Matriz metaloproteína
MMP= Metaloproteinase de matriz
NEP= Endopeptidase neutra
NIDD= Diabetes não insulino-dependente
NG= Normoglicêmico
NG+DP= Normoglicêmico com doença periodontal
nm= Nanômetros
OPG= osteoprotegerina
PBS= Tampão fosfato salino
PCR= Proteína C reativa
PEP= Propil endopeptidase
PGE2= Prostaglandina E2
RAGES= receptores específicos de produtos finais de glicação avançada
RANKL= ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B
Ren= renina
RNA= Ácido ribonucleico
RNAm= Ácido ribonucleico mensageiro
RNase= Nuclease que catalisa a degradação do RNA
RT-PCR= Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction – Transcriptase reversa de reação em cadeia de polimerase
SRA= Sistema renina angiotensina
TA= Temperatura ambiente
TGF- β 1= Fator de transformação de crescimento beta 1
TMB= 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 Introdução.....	30
1.1 Síntese bibliográfica.....	33
1.1.2 Doença Periodontal.....	33
1.1.3 Associação entre doença periodontal e o diabetes.....	36
1.1.4 Sistema Renina Angiotensina Clássico.....	40
1.1.5 Sistema Renina Angiotensina Local.....	43
1.1.6 Sistema Renina Angiotensina Local e Doença Periodontal.....	44
2 Objetivos.....	48
2.1 Objetivos gerais	49
2.2 Objetivos específicos	49
3 Materiais e métodos	51
3.1 Animais e aspectos éticos	51
3.2 Indução de diabetes.....	52
3.3 Indução de doença periodontal experimental.....	52
3.4 Tratamento com Alisquireno.....	53
3.5 Eutanásia e coleta de amostras.....	53
3.6 Análise Histomorfológica.....	54
3.7 Análise Imunohistoquímica.....	54
3.8 Análise da produção de citocinas por ensaio imunoabsorção enzimática ELISA.....	56
3.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa em tempo real RT-qPCR.....	58
3.9.1 Extração e quantificação RNA total.....	58
3.9.2 Transcrição Reversa.....	59
3.9.3 PCR Quantitativo.....	59
3.10 Análise estatística.....	61
4. Resultados.....	62
4.1 Os componentes do SRA podem contribuir com a perda óssea alveolar e o tratamento com alisquireno previne a perda óssea alveolar induzida pela DP em camundongos diabéticos.....	62

4.2 Tratamento com Alisquireno modula a expressão dos componentes de SRA induzidos pela DP.....	64
4.3 O tratamento com alisquireno reduz a produção dos componentes de SRA no tecido gengival.....	70
4.4 Tratamento com Alisquireno reduz a produção de mediadores inflamatórios induzidos pela periodontite experimental.....	78
4.5 Tratamento com alisquireno modula a expressão gênica dos marcadores do reparo tecidual.....	80
5 Discussão.....	83
6 Conclusão.....	97
7 Referências.....	99

**INTRODUÇÃO E
SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA**

1 Introdução

A doença periodontal (DP) tem alta prevalência em todo o mundo, é considerada a segunda maior causa de patologia dentária na população humana, e a sétima patologia mais comum em todo o mundo (Mumghamba, Markkanen et al. 1995). É caracterizada por apresentar uma infecção crônica que leva à destruição dos tecidos periodontais, resultando em perda de tecido conectivo, perda óssea e formação de bolsas periodontais que eventualmente causam perda dos dentes (Okada and Murakami 1998, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011).

O Diabetes Mellitus (DM) foi confirmado como um importante fator de risco para periodontite. O risco de periodontite é aumentado em cerca de três vezes em pacientes diabéticos (Khader, Dauod et al. 2006, Chavarry, Vettore et al. 2009), e o nível do controle glicêmico é de fundamental importância na determinação deste risco aumentado. Sabe-se que pacientes diabéticos têm funções imunológicas prejudicadas, reduzindo suas funções fagocíticas e microbidas (Drachman, Root et al. 1966). A diminuição das funções celulares que ocorrem no diabetes é devido às altas concentrações de glicose as quais as células estão expostas (Marhoffer, Stein et al. 1992, Geerlings and Hoepelman 1999). Estes níveis elevados de glicose no sangue, promoverá a auto oxidação intracelular da glicose, gerando produtos finais de glicação avançada (AGEs), que ao ligar-se ao seu receptor específico RAGE, promoverá a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO), interação com os receptores das células imunológicas e conseqüentemente alterações de suas funções, além de promover o aumento da resposta inflamatória, bem como a indução de citocinas pró-inflamatórias, levando a maior destruição

periodontal (Grossi and Genco 1998, Iacopino 2001, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015).

Estudos tem demonstrado uma associação interessante entre o DM e o sistema renina-angiotensina (SRA), particularmente ilustrando um papel proeminente de angiotensina II (AngII), em complicações do diabetes, tais como nefropatia e disfunção cardiovascular (Ribeiro-Oliveira, Nogueira et al. 2008). O SRA sistêmico é considerado um eixo endócrino responsável por modular uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, como pressão arterial, equilíbrio hidroeletrólítico, inflamação, estresse oxidativo e fibrose (Zablocki and Sadoshima 2013, Itinteang, Marsh et al. 2015, Wang, Chen et al. 2015, Xue, Yu et al. 2016). O SRA clássico consistia de renina (Ren) circulante, atuando sobre o angiotensinogênio (Agt) para produzir angiotensina I (AngI), que por sua vez é convertida em AngII pela enzima conversora de angiotensina (ECA).

Um dos marcos mais importantes foi a descoberta do SRA local. Nos últimos anos, muitos estudos têm direcionado o papel dos componentes locais do SRA em diferentes patologias, como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, artrite e DP (Sakuta, Morita et al. 2010, Underwood and Adler 2013, Diao, Pan et al. 2014, Santos and Simoes e Silva 2014, Yu and Shi 2014). Santos et al. (2009), demonstraram pela primeira vez a existência de SRA local em tecido gengival de ratos. Este mesmo grupo de pesquisadores relataram que antagonizar o receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) e renina pode prevenir significativamente a perda óssea induzida pela DP em ratos (Santos, Morandini et al. 2015). Além disso, estudos recentes mostraram que os bloqueadores de SRA são capazes de reduzir a inflamação, e portanto diminuir

a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), o eixo RANK / RANKL e catepsina K em modelo de DP induzida em rato (Araujo, Souza et al. 2013). Em pacientes diabéticos com DP, o tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina (Eca) levou a melhorias na glicemia e nas condições periodontais (Shibukawa, Fujinami et al. 2012).

Deve-se notar que o alisquireno (Alisk) é o único inibidor de renina disponível para uso clínico, portanto, essa modulação farmacológica será uma ferramenta útil para entender os efeitos dessa droga na interação entre SRA, DP e doença sistêmica, como o DM. Outro fato importante que devemos levar em consideração, é que na clínica, encontramos uma alta prevalência de pacientes com periodontite experimental que fazem uso de drogas anti-hipertensivas, tornando este estudo de extrema importância. Tomados em conjunto, o aumento da incidência do diabetes, associado ao fator de risco para o desenvolvimento da DP e complicações cardiovasculares mostra que novos estudos são necessários para aumentar as alternativas terapêuticas e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com essas patologias. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da renina sobre a resposta inflamatória e a perda óssea alveolar pela periodontite induzida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

1.1 Síntese Bibliográfica

1.1.2 Doença Periodontal (DP)

A destruição periodontal está intimamente ligada com a complexa interação da resposta imunológica do hospedeiro com as bactérias patogênicas

resultantes da disbiose da microbiota oral (Darveau, Hajishengallis et al. 2012, Chen, Hemme et al. 2018). Desde meados da década de 90, sabia-se que a DP era caracterizada principalmente pela colonização de bactérias Gram negativas, como a *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, formando o complexo vermelho patogênico (Socransky, Haffajee et al. 1998). No entanto, nos últimos anos, avanços recentes de estudos metagenômicos desenvolveram um novo modelo da patogênese da DP, no qual a progressão da DP resulta não apenas de patógenos individuais, mas sim da sinergia de agentes polimicrobianos e da sua disbiose associadas a uma intensa resposta imune desregulada induzindo dano tecidual mediado pela resposta inflamatória exacerbada (Hajishengallis, Darveau et al. 2012, Hajishengallis 2015). Desta forma, podemos classificar a DP como uma doença inflamatória de origem infecciosa, que acomete o tecido de sustentação e suporte dentário, incluindo os ligamentos periodontais, cemento radicular e osso alveolar. Esta patologia consiste em uma infecção de natureza aguda ou crônica, de progressão lenta, e é caracterizada por promover a destruição dos tecidos periodontais, resultando em perda de tecido conectivo, perda óssea e formação de bolsas periodontais que podem levar a eventual mobilização dos dentes (Loe 1993, Okada and Murakami 1998, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011).

A DP apresenta índices elevados de prevalência em todo o mundo, sendo considerada a segunda maior causa de patologia dentária na população humana e um problema de saúde pública (Mumghamba, Markkanen et al. 1995). O estudo desenvolvido por Eke e colaboradores (2012) relataram incidência da DP em aproximadamente 65 milhões de adultos nos Estados

Unidos, correspondendo cerca de 47% de sua população. No Brasil, esse quadro é ainda maior, visto que em algumas regiões a porcentagem desta doença pode chegar a ser maior que 70%(Palma & Leite, 2014). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DP são: tabagismo, alcoolismo, sexo, obesidade, síndrome metabólica, osteoporose, falta de cálcio e vitamina D, estresse, fatores genéticos, e diabetes (Genco and Borgnakke 2013).

A resposta inflamatória e imunológica estimula a produção de diversos tipos celulares como os neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais e monócitos. Os queratinócitos gengivais são células diferenciadas do tecido epitelial que atuam como primeira linha de defesa contra os periodontopatógenos. Essas células secretam uma gama de peptídeos antimicrobianos e, quando estimuladas por toxinas derivadas de bactérias periodontopatogênicas, liberam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que desempenham importante função na imunidade inata e adaptativa (Sandros, Karlsson et al. 2000, Takahashi, Honda et al. 2010). A regulação desta resposta depende da produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T helper (Th), podendo exibir um padrão Th1 ou Th2, que atuam amenizando ou exacerbando a resposta inflamatória nos tecidos periodontais. As respostas mediadas com padrões Th1 consistem, predominantemente, de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, caracterizadas pela presença de citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon - γ . Já as respostas mediadas por um padrão Th2 apresentam uma resposta imune predominantemente celular, com características anti-inflamatórias e com a presença de citocinas como a interleucina 10 (IL-10)(Berglundh, Liljenberg et al. 2002, Teng 2003).

Nos últimos anos, inúmeros estudos descrevem a presença de um terceiro grupo de células que são responsáveis pelo desenvolvimento das doenças periodontais inflamatórias. Este, por sua vez, é denominado como células Th-17, as quais secretam IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-22, TNF- α . Estes mediadores inflamatórios induzem o aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2) e da matriz de metaloproteína (MP), as quais são responsáveis pela destruição extracelular da gengiva, do ligamento periodontal e da reabsorção óssea (Takahashi, Azuma et al. 2005, Beklen, Ainola et al. 2007, Lester, Bain et al. 2007).

1.1.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E O DIABETES

O DM pertence a um grupo de doenças metabólicas, caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta a insulina, promovendo alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. O diabetes ocorre quando o nível de glicose no sangue se encontra elevado, denominando um quadro de hiperglicemia. O desenvolvimento desta patologia pode ser ocasionado por diversos processos patogênicos resultante de uma deficiência na secreção da insulina causada pela disfunção das células β do pâncreas, resistência da ação da insulina no fígado e nos músculos, e/ou a combinação de ambos. As formas mais comuns da diabetes compreendem: diabetes tipo 1 ou insulino-dependente (IDDM), diabetes tipo 2 ou não-insulino-dependente (NIDD) e diabetes gestacional (Alberti and Zimmet 1998, Kemink, Hermus et al. 2000, Xiong, Saunders et al. 2001).

O diabetes tipo 1 é ocasionada pela destruição auto-imunes das células beta pancreáticas, causando deficiência na produção de insulina, ou até mesmo perda total em sua secreção. É considerada a forma menos freqüente da doença, porém a mais grave, e, comumente, acomete principalmente crianças e adolescentes. Já o diabetes tipo 2, é a forma mais freqüente da doença (90 a 95%), geralmente, este tipo de doença tem início insidioso após os 40 anos de idade e está relacionada com a obesidade, falta de atividade física e predisposição genética. É uma desordem metabólica que ocorre devido à resistência à insulina, ou insuficiência relativa de insulina. E por fim, a diabetes gestacional, é causada por intolerância à glicose durante o período gestacional (Atkinson and Eisenbarth 2001, Taiyeb-Ali, Raman et al. 2011, Health Quality 2015).

O Diabetes Mellitus é reconhecido como um importante fator de risco para a periodontite, uma vez que, pacientes diabéticos apresentam funções prejudicadas das células do sistema imune, principalmente as células polimorfonucleares, as quais apresentam diminuição na quimiotaxia, fagocitose e poder microbicida. As células mononucleares, como os monócitos e macrófagos, também apresentam funções prejudicadas, tais como na quimiotaxia, fagocitose, e alteração na secreção de citocinas e quimiocinas (Drachman, Root et al. 1966, Bagdade, Root et al. 1974, Katz, Klein et al. 1983, Marhoffer, Stein et al. 1992, Delamaire, Maugendre et al. 1997, Geerlings and Hoepelman 1999, Joshi, Caputo et al. 1999). A diminuição das funções celulares ocorridas no diabetes é decorrente das elevadas concentrações de glicose a qual as células estão expostas, favorecendo interações não-enzimáticas entre açúcares e produtos finais de glicação avançada (AGEs), as

quais interagem com receptores das células do sistema imunológico, consequentemente reduzindo a resposta imune do hospedeiro (Drachman, Root et al. 1966, Marhoffer, Stein et al. 1992). Portanto, a redução da função imunológica torna o hospedeiro mais suscetível a desenvolver patologias principalmente infecções do trato respiratório inferior, do trato urinário, infecções de pele, membranas, mucosas e DP (Loe 1993, Shah and Hux 2003, Muller, Gorter et al. 2005).

A hiperglicemia é o fator chave no desenvolvimento de complicações geradas pelo diabetes, tais como: nefropatias, neuropatias, retinopatias, doenças cardiovasculares, além de ser responsável pela progressão e exacerbação da DP (Wu, Xiao et al. 2015). As interações não-enzimáticas entre açúcares e produtos finais de glicação avançada (AGEs), dependem de sua ligação com seus receptores específicos (RAGES), promovendo a formação de radicais livres, formação de ligações cruzadas com proteínas ou interação com receptores das células do sistema imunológico, promovendo estresse oxidativo, alterações das funções imunológicas, aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, favorecendo maior destruição periodontal (Grossi and Genco 1998, Iacopino 2001, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015).

Já é bem elucidado na literatura uma relação bidirecional entre o DM e a DP, onde o DM pode aumentar o risco e a severidade da DP, favorecendo as interações não enzimáticas, e consequentemente, exacerbando a resposta inflamatória que levará maior perda óssea alveolar (Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015). Além disso,

vários estudos tem demonstrado que a periodontite também pode agravar o controle glicêmico. Isto acontece, porque as bactérias instaladas no biofilme microbiano libera suas endotoxinas, promovendo inicialmente uma intensa resposta inflamatória, aumentando a liberação de citocinas e quimocinas pró-inflamatórias, bem como de fatores de transcrição NFK- β , que podem levar a disfunção das células beta pancreáticas, além de prejudicar a via de sinalização insulínica, comprometendo-a, e conseqüentemente aumentando a resistência à insulina (Negrato, Tarzia et al. 2013, Wu, Xiao et al. 2015, Nazir 2017),. Diferentes pesquisas relatam que o tratamento periodontal, como a raspagem e alisamento radicular associadas à administração sistêmica de doxiciclina promove efeito benéfico no controle dos níveis glicêmicos de indivíduos diabéticos (Grossi et al., 1997).

Estudos tem demonstrado que o diabetes exacerba a reabsorção óssea alveolar induzida pela DP (Sima and Glogauer 2013, Wu, Xiao et al. 2015). A associação do DM e da DP compromete o metabolismo ósseo, tornando-se uma das principais complicações geradas por estas patologias (Wu, Xiao et al. 2015, Nazir 2017). O desequilíbrio entre o ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG) tem se mostrado um possível mecanismo para explicar os prejuízos ósseos em indivíduos diabéticos com DP (Beam, Parsons et al. 2002, Sima and Glogauer 2013). Além disso, o quadro hiperglicêmico reduz a diferenciação e proliferação de osteoblastos, bem como a produção de colágeno (Beam, Parsons et al. 2002, Sima and Glogauer 2013).

1.1.4 Sistema Renina Angiotensina Clássico (SRA)

O SRA clássico é um eixo endócrino responsável por regular a pressão arterial e o balanço eletrolítico, além de participar de processos inflamatórios e promover a elevação de vários peptídeos hormonais. A visão clássica do SRA consistia na renina sistêmica (Ren) atuando sobre o angiotensinogênio (Agt) para formar o decapeptídeo Angiotensina I (AngI) (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-Leu¹⁰), metabólito que atua como substrato para vias enzimáticas formadoras de Angiotensina II. A AngI é convertida em Angiotensina II (AngII) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A Ang II é um octapeptídeo (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸), ativo, responsável por promover o efeito vasoconstritor, e exerce suas funções interagindo com os receptores de membrana, denominados receptores de angiotensina tipo 1 e 2 (AT1R/ AT2R) (Peach 1977, Carey and Siragy 2003, Fyhrquist and Saijonmaa 2008). A atuação da Ang II em condições anormais gera efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular, como hipertensão e resistência vascular (Mascitelli and Pezzetta 2007). A Figura 1 ilustra o SRA clássico.

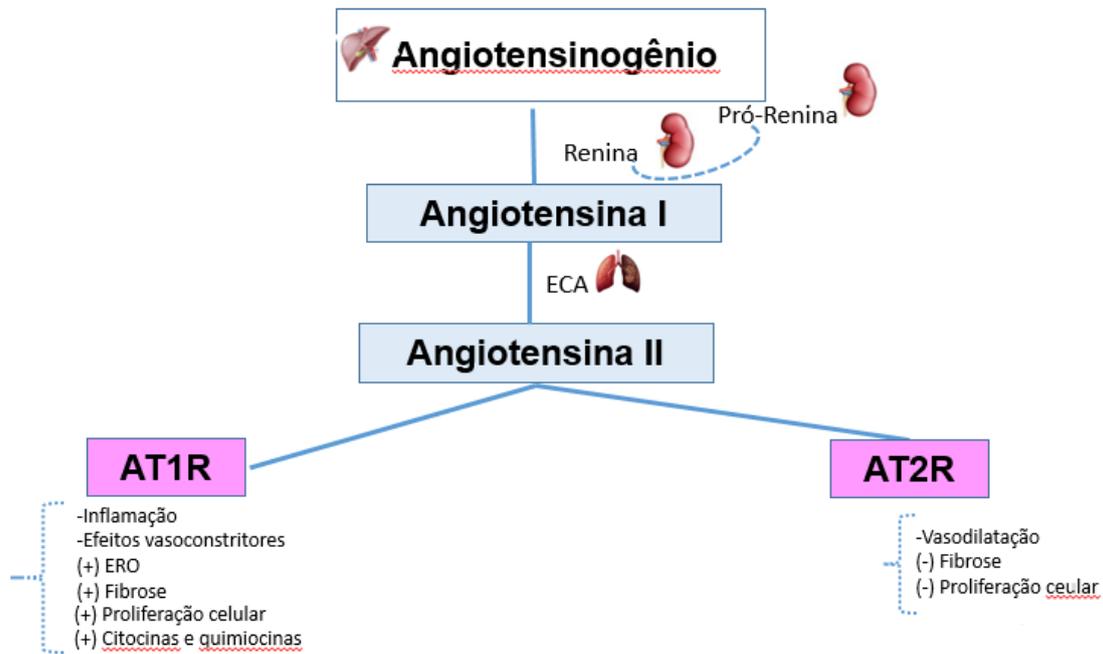


Figura 1. Principais componentes do sistema renina angiotensina clássico (SRA). O produto final Ang II é gerado pela ação da renina, convertendo o angiotensinogênio, na forma inativa AngI, que então é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Ang II, que poderá ligar-se ao receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) ou 2 (AT2R).

A AngII quando interage com o receptor de membrana tipo 1 (AT1R), possui efeitos vasoconstritores, promove proliferação celular, fibrose, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), acentuando o processo inflamatório. Já a sua interação com o receptor tipo 2 (ATR2), promove um efeito oposto, favorecendo a vasodilatação, reduzindo a fibrose e a proliferação celular, promovendo desta forma, um efeito protetor no organismo (Unal and Karnik 2014, Santos, Morandini et al. 2015).

Abaixo, a figura 2 demonstra vias alternativas para a formação de AngII, independentes da renina e da ECA, como por exemplo pela ação da tonina, e da quimase.

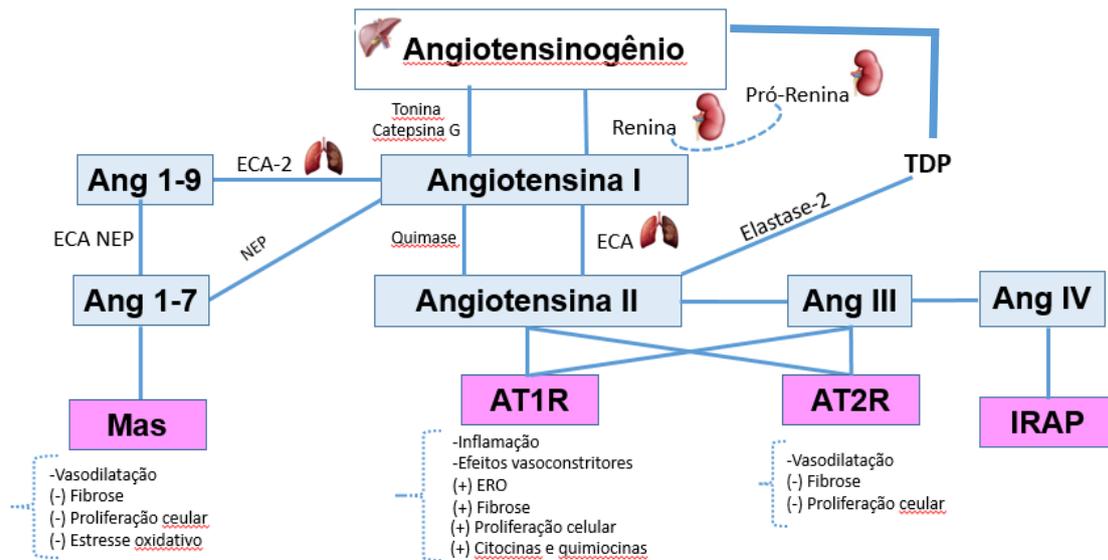


Figura 2. Visão atual do SRA. Surgimento de vários peptídeos, enzimas e vias alternativas.

Além da AngII, também já é descrito na literatura diferentes receptores para AngII (AT1R, AT2R, AT4R), e para diferentes peptídeos (receptor Mas). Outros peptídeos biologicamente ativos já foram identificados, como a Ang 2-8, também conhecida como AngIII, responsável por funções semelhantes a AngII. A Ang 3-8 (AngIV), também conhecida como Ang IV, exerce as suas funções via receptores regulados por insulina.

Outro peptídeo já descrito é a Ang 1-9, o qual é formado através da clivagem da AngI pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) também já foi descrita. Acredita-se que ela possa estar envolvida na regulação da função plaquetária (Kramkowski, Mogielnicki et al. 2006). Já a Ang1-7 é um outro produto final do SRA formado a partir da AngI por uma via independente da Ren e da ECA, como as protil endopeptidase (PEP) e endopeptidase neutra (NEP)(Santos, Brosnihan et al. 1988), que liga-se ao receptor de membrana acoplado a proteína G, receptor Mas (receptor funcional de angiotensinas), e

apresenta ações contra-regulatórias às ações da AngII, promovendo efeitos vasodilatadores, anti-proliferativos, anti-fibrótico (Trask and Ferrario 2007) .

Nos últimos anos o conceito de SRA clássico vem sendo modificado com evidências em novos estudos que demonstram um papel proeminente da AngII em diferentes órgãos e tecidos, assim foi possível formular novos conceitos a respeito da funcionalidade deste sistema local.

1.1.5 Sistema Renina Angiotensina Local

Nos últimos anos, muitos estudos mostram a existências de componentes locais do SRA, capazes de gerar angiotensinas independentes do SRA clássico. Vários órgãos e tecidos como tecido adiposo, coração, rim, pâncreas, gônadas, cérebro, tecido gengival são capazes de gerar localmente produtos da cascata do SRA, como angiotensinogênio, ECA, receptores de angiotensinas(Ganten, Marquez-Julio et al. 1971, Campbell 1987, Sernia 2001, Paul, Poyan Mehr et al. 2006, Cassis, Police et al. 2008, Santos, Akashi et al. 2009, Tojo, Kinugasa et al. 2016).

Estudos tem relacionado o SRA local com múltiplas funções teciduais como ações anti-proliferativas, anti-fibróticas, apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio, ações pró-inflamatórias, entre outras em diferentes órgãos e tecidos (Campbell and Habener 1986, Paul, Poyan Mehr et al. 2006). Enquanto que o SRA clássico é visto como promotor da homeostasia da pressão arterial e do balanço eletrolítico. Todas essas evidências tornou o SRA local capaz de exercer funções endócrinas, autócrinas e parácrinas (Fyhrquist and Saijonmaa 2008).

Alguns estudos ainda descrevem a existência de um SRA intracelular, cuja função estaria relacionado com o controle do influxo de Ca^{+2} e na regulação da expressão gênica das células, no entanto, os mecanismos pelos quais a AngII é gerada são desconhecidos (De Mello 2006, Re and Cook 2007). Portanto, nos últimos anos inúmeros estudos vem sendo direcionado à respeito do SRA local, uma vez que este sistema pode estar relacionado com a fisiopatologia de diferentes doenças sistêmicas, como por exemplo doenças cardiovasculares e diabetes.

1.1.6 Sistema Renina Angiotensina Local e Doença Periodontal

Estudos recentes vem sendo direcionados em SRA locais relacionados com os tecidos periodontais, tais como: tecidos gengivais, ligamentos periodontais, tecidos ósseos. Trabalhos mostram a existência de componentes do SRA em tecidos periodontais de diferentes espécies, como ratos, coelhos, porcos da índia e polpa de humanos (Ohuchi, Koike et al. 2002, Berggreen, Wiig et al. 2003, Souza, Fukada et al. 2007, Santos, Akashi et al. 2009, Santos, Morandini et al. 2015).

Alguns estudos tem demonstrado o papel da Ang II sobre células e tecidos periodontais (Ohuchi, Koike et al. 2002, Segawa, Nakao et al. 2003). Ohuchi e colaboradores (2002) relataram que AngII era produzida localmente em fibroblastos gengivais de guinea pig, e que a proliferação destas células era mediada através da ativação de receptores angiotensina tipo1. Além disso, estes mesmo grupo de pesquisadores verificaram que a AngII promovia um efeito proliferativo em fibroblastos gengivais de coelhos via dose-dependente (Ohuchi, Hayashi et al. 2004).

Segawa e colaboradores (2003) demonstraram que a AngII estimula a produção de prostaglandinas E2 (PGE2) em fibroblastos gengivais de humanos. Além disso, verificou-se que essas ações da AngII na liberação de mediadores inflamatórios, e seus efeitos proliferativos estariam relacionados diretamente com os receptores tipo 1 de angiotensina, o que foi confirmado com o uso de drogas antagonistas específicas (Ohuchi, Koike et al. 2002, Berggreen and Heyeraas 2003, Ohuchi, Hayashi et al. 2004).

Santos et al. (2009), demonstraram pela primeira vez a existência de SRA local em tecido gengival de ratos. Este mesmo grupo de pesquisadores relataram que antagonizar o receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) (Losartan) e a renina (Alisquireno) pode prevenir significativamente a perda óssea periodontal induzida pela DP em ratos (Santos, Morandini et al. 2015). Além disso, estudos recentes mostraram que os bloqueadores de SRA são capazes de reduzir a inflamação, e portanto diminuir a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), o eixo RANK / RANKL e catepsina K em modelo de rato de DP (Araujo, Souza et al. 2013). Logo, nota-se que o uso de drogas anti-hipertensivas pode ser uma ferramenta eficaz no controle da progressão da DP.

Dados da literatura demonstraram que inibidores específicos do SRA, como carvedilol, losartana, alisquireno promove efeito benéfico sobre a resposta inflamatória e metabolismo ósseo em modelos de periodontite (Li, Liao et al. 2006, Santos, Morandini et al. 2015), uma vez que foi capaz de reduzir os níveis de mieloperoxidase, COX-2, IL-1 β , e TNF- α , além de afetar a formação/destruição óssea, reduzindo os níveis de RANK e RANKL e induzindo ao aumento da expressão de OPG (de Araujo Junior, Souza et al. 2013).

O alisquireno (Alisk), é o único inibidor de renina disponível no mercado para uso clínico. Comumente, é utilizado no controle da hipertensão arterial (HA) e de doenças cardiovasculares relacionadas. Este fármaco promove o bloqueio do sítio catalítico da renina, impedindo a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, e conseqüentemente, reduzindo os níveis de angiotensina II na circulação sanguínea. Seu pico de concentração plasmática é alcançado em torno de 1 a 3 horas após absorção oral, e sua biodisponibilidade absoluta é de 2,6%. Sua eliminação ocorre pelo trato hepatobiliar como droga não metabolizada (Dalla Vestra, Simioni et al. 2009, Rao 2010). Poucos estudos tem investigado o seu efeito sobre as patologias odontológicas, no entanto, já há evidências na literatura de que o alisquireno pode promover um efeito benéfico na perda óssea alveolar induzida pela DP em ratos (Santos, Morandini et al. 2015).

Estudos recentes tem demonstrado que o SRA está intimamente relacionado com o diabetes. Estudos demonstram que pacientes diabéticos apresentam níveis elevados de AngII (Prabhakar 2013, Lastra, Syed et al. 2014). Além disso, muitos estudos tem demonstrado que a AngII participa da inicialização e progressão de complicações geradas pelo diabetes, como a nefropatia diabética, hipertensão, retinopatia (Lastra, Syed et al. 2014). Em pacientes diabéticos, com DP, o tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina, Captopril, induziu uma melhora nos níveis de glicose, assim como nas condições periodontais do indivíduo (Shibukawa, Fujinami et al. 2012, Prabhakar 2013). Além disso dados da literatura demonstram que o uso de inibidores de SRA reduz a incidência de complicações cardiovasculares, e

estas melhorias parecem estar relacionadas com os efeitos benéficos na proteção das ilhotas pancreáticas, e consquentemente melhora da resistência à insulina (2000, Brenner, Cooper et al. 2001, Lastra, Syed et al. 2014).

Diante destes relatos, nota-se uma interação complexa entre SRA, DP e DM, e desmembrar/compreender melhor esta interação pode torna-se uma ferramenta útil no controle desta patologias, que comumente apresentam alta prevalência na população, tornando-se um grave problema de saúde pública. Além disso, outro fato importante que devemos levar em consideração, é que na prática clínica, encontramos uma alta prevalência de pacientes diabéticos com periodontite experimental que fazem uso de drogas anti-hipertensivas, como inibidores de renina, e inibidores de receptores de AngII, tornando este estudo de extrema importância, uma vez que o uso de inibidores do SRA podem apresentar efeitos benéficos sobre as consequências geradas pela periodontite experimental e pelo DM.

OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.0 OBJETIVO GERAIS

Avaliar o papel da renina sobre a resposta inflamatória e severidade da periodontite induzida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No decorrer da pesquisa foram investigados os parâmetros de biologia tecidual, para tanto avaliamos:

- a) O desenvolvimento da doença periodontal nos grupos experimentais por meio de técnicas histológicas e histomorfométrica.
- b) Avaliamos a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA), ECA-2, receptor de angiotensina do tipo 1 (ATR1), receptor de angiotensina do tipo 2 (ATR2), angiotensinogênio (Agt), receptor Mas (MasR), e renina no tecido gengival dos grupos experimentais;
- c) Avaliamos a produção da enzima conversora de angiotensina (ECA), ECA-2, receptor de angiotensina do tipo 1 (ATR1), e receptor de angiotensina do tipo 2 (ATR2), no tecido gengival dos grupos experimentais por meio de IHC;
- d) Avaliamos a produção de CXCL2, CCL8, e CRP, no tecido gengival dos grupos experimentais pelo ensaio imunoenzimático ELISA;
- e) Avaliamos a expressão gênica de Col1a1, Col2a1, Col3a1, Fibronectina (Fn), e TGF- β em tecido gengival dos grupos experimentais;
- f) Investigamos o efeito da Alisquireno sobre os alvos descritos acima no tecido gengival de camundongos diabéticos submetidos à periodontite induzida.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, aspectos éticos e desenho experimental

Para realização deste trabalho foram utilizados 72 camundongos Balb/c de 18 - 22g provenientes do biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Estes animais permaneceram em uma sala climatizada com temperatura em torno de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade $55\% \pm 3\%$, com sistema de exaustão, ciclo claro/escuro de 12 horas, e com consumo de água e ração à vontade. Os protocolos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Araçatuba-SP, Brasil, protocolo n^o FOA-00106-2016.

Em linhas gerais o trabalho foi dividido em 6 grupos experimentais, sendo estes: **grupo 1**: camundongos normoglicêmicos (NG); **grupo 2**: normoglicêmicos com DP (NG+DP); **grupo 3**: normoglicêmicos com DP tratados com alisquireno (NG+Alisk+DP); **grupo 4**: camundongos diabéticos (D); **grupo 5**: diabéticos com DP (D+DP); **grupo 6**: diabéticos com DP tratados com alisquireno (D+Alisk+DP).

Abaixo segue o cronograma experimental:

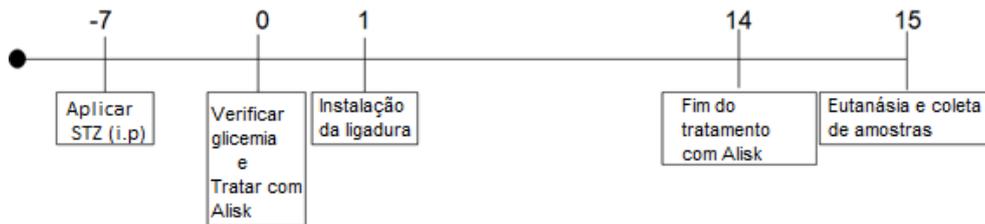


Figura 3. Delineamento experimental. No dia -7, foi realizada aplicação da estreptozotocina (200mg/kg) via intraperitoneal, para indução do DM. Posteriormente, no dia 0 verificamos a glicemia dos animais e consideramos os mesmos diabéticos quando os níveis de glicemia encontrava-se igual ou superior a 250mg/dL. O tratamento com Alisk teve início no dia 0 (momento que antecede a instalação da ligadura) tanto em animais normoglicêmicos quanto em diabéticos. Dia 1 foi realizado a instalação da ligadura, para indução da DP experimental, e por fim, consideramos o fim do tratamento com Alisk no dia 14, sendo a mandíbula e o tecido gengival coletados no dia 15 para posterior análise.

3.2. Indução de diabetes

Para indução de diabetes, os camundongos receberam 200 mg/kg de estreptozotocina por via intraperitoneal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluídos em tampão citrato (100 mM, pH 4,5). Após 7 dias, os níveis de glicemia foram medidos por um glicosímetro (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson Medical, Milpitas, CA, EUA) e os animais foram considerados diabéticos quando os valores mostraram ser ≥ 250 mg / dL (Kim, Choi et al. 2014).

3.3 Indução da doença periodontal

A DP foi induzida pela inserção bilateral de uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior, mantida por 14 dias, como descrito anteriormente

(Bonato, do-Amaral et al. 2012). Resumidamente, os animais foram anestesiados com 80 mg / Kg de cloridrato de quetamina (Cetamim, Syntec; Hortolândia, São Paulo, Brasil) associado a 10 mg / Kg de cloridrato de xilazina por via intraperitoneal (Calmium, AgenerUnião; Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil). Um fio de seda 4-0 (Shalon; Goiânia, Goiás, Brasil) foi enrolado em torno dos primeiros molares inferiores, empurrando com cuidado a ligadura para o sulco gengival e dando um nó mesial. Os grupos controle não receberam a ligadura, no entanto, foram anestesiados e manipulados de forma semelhante, para serem submetidos ao mesmo estresse que os demais.

3.4 Tratamento com alisquireno

O alisquireno foi administrado diariamente por gavagem, na dose de 50 mg/Kg, diluídos em PBS pH 7,4, conforme descrito por (Santos, Morandini et al. 2015), iniciando um dia antes da instalação da ligadura e mantida por 14 dias. Grupos não tratados foram manipulados de forma semelhante, e receberam apenas PBS pH 7,4, para sofrer o mesmo estresse que os demais.

3.5 Eutanásia e coleta das amostras

No 15º. dia após a indução da DP, os animais foram eutanasiados por inalação com overdoses de halotano (Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brasil). A presença de ligadura bilateral foi avaliada, e os animais nos quais ela estava ausente foram excluídos do estudo. A gengiva marginal foi cirurgicamente colhida em condições de limpeza, imediatamente congelada em nitrogênio

líquido e posteriormente armazenada a -80 ° C até ser utilizada para quantificação de citocinas e análise de expressão gênica, ou fixada para processamento histológico. Hemimandíbulas também foram colhidas para avaliar a perda óssea alveolar através de métodos histológicos.

3.6 Análise histomorfológica

Tecido gengival e hemimandíbula foram fixados em solução tamponada com formaldeído a 10% por 48 h. O tecido foi lavado em água corrente por 24 horas e as hemimandíbulas foram descalcificadas com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% por 60 dias. Em seguida, o tecido foi desidratado e embebido em parafina. Cortes transversais foram obtidos com 5 µm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE). Para determinar a reabsorção óssea, a área total da região de furca e a área óssea alveolar foram medidas com o software ImageJ (Versão 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e, finalmente, a porcentagem de osso alveolar foi calculada (Saadi-Thiers, Huck et al. 2013, de Molon, Mascarenhas et al. 2015).

3.7 Análise Imunohistoquímica (IHC)

Os cortes histológicos foram obtidos como descrito acima e imunomarcados para determinar a produção da enzima conversora de angiotensina I (Eca), enzima conversora de angiotensina I (Eca2), receptor de

angiotensina II tipo 1 (ATR1) e receptor de angiotensina II tipo 2 (ATR2). Resumidamente, as lâminas ficaram 30 min em estufa a 60°C para desparafinizar, em seguida passou-se por um processo de desidratação, seguindo os seguintes passos: Xilol I e II por 5 minutos, Álcool 95°C I, Álcool 95°C II, Álcool 70°C I, Álcool 70°C II, Álcool 50°C I, Álcool 50°C II por 3 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água deionizada duas vezes por 2 minutos e a recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato (0,2626g de ácido cítrico para cada 25 ml de tampão), seguido de lavagem com água deionizada. Os cortes foram delimitados com caneta (Dakopen), o bloqueio foi realizado utilizando peróxido de hidrogênio 3% (Merke), durante 45 minutos, seguido de lavagem com água deionizada. Os anticorpos primários (Biotecnologia Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EUA) incluíram anticorpos policlonais de coelho anti-ECA (1:50) e anti-ECA2 (1:50) e policlonais de cabra anti-ATR1 (1: 250), e anti -ATR2 (1: 100) foram diluídos em tampão diluente ou PBS/BSA 1%, durante 1 hora em temperatura ambiente (TA), seguido de lavagem em PBS/Tween20, 3 vezes por 3 minutos. E então, detectou-se a presença de anticorpos com kit Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (cabra e coelho) (Nichirei Biosciences Inc; Tóquio, Japão), durante 30 minutos em câmara escura úmida, e o 3,3'-diaminobenzidina-tetrahydrocloro (DAB) (Dako Corp., Carpinteria, CA, EUA) foi utilizado como substrato cromógeno. O procedimento foi completado pela contracoloração de hematoxilina de Harry. Todos os ensaios foram acompanhados por um controle positivo (rim) e controle negativo (rim e gengiva).

Para a análise IHC, cinco seções de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente para examinar a imunomarcagem do epitélio gengival e do

tecido conjuntivo. Em resumo, a expressão foi baseada em: intensidade da imunomarcção (0 = negativa; 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = forte; 4 = muito forte) e porcentagem de células positivas (0 = 0% de células positivas; 1 = 25 % de células positivas, 2= 50% de células positivas, 3= 75% células positivas e 4= 100% células positivas), conforme descrito por Faustino, Oliveira et al. (2008) com algumas modificações. As lâminas representativas foram fotografadas com uma câmera digital (Olympus, XC50, Tokyo, Japan) acoplada a um microscópio de luz (Olympus, BX53, Tokyo, Japan), e a análise foi realizada avaliando as laminais fotografadas em aumento de 20X e 40X por duas pessoas, de forma independente, sem identificação dos casos, na forma duplo cego. Eventuais resultados conflitantes foram discutidos pelos mesmos para definição consensual da análise.

3.8Quantificação de citocinas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

A produção de CRP, CXCL2, e CCL8 foram quantificadas do tecido gengival dos camundongos, pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). As amostras gengivais do mesmo animal foram reunidas e sonicadas até a total desintegração em 500 µL de tampão de lise (PBS pH 7,4 mais coquetel inibidor de protease), centrifugadas e o sobrenadante foi usado para quantificação de CRP, CXCL2, e CCL8 por ELISA. Cada pool (2 gengivas) foi considerado n=1 e o número experimental foi n=5.

Placas de 96 poços foram incubadas com anticorpos primários anti-CRP, anti-CXCL2 e anti-CCL8 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) diluídos em

tampão fosfato salino 1x (PBS 1x)(NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KHPO₄ 2 mM, e Na₂HPO₄ 8 mM) (18 horas, 4°C) (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, EUA).Posteriormente, as placas foram lavadas com solução de lavagem (PBS, Tween 20 1%) e bloqueadas com solução de albumina sérica bovina 1% (ASB 1% em PBS) (1 hora, temperatura ambiente) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, as placas foram lavadas e o anticorpo recombinante (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), para confecção da curva padrão (4000-31.25 pg/mL, em diluição seriada de 2x em ASB 1%), e as amostras foram adicionadas (50uL) e incubadas por 3 horas em TA. Depois deste período, as placas foram novamente lavadas, e o anticorpo secundário/biotinilado (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), correspondente a cada alvo, foi incubado por 1 hora em TA. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionadas estreptoavidina conjugada com peroxidase (ExtrAvidin®-Peroxidase, Sigma) (1:2000) por 30 minutos em TA. Passado este tempo, após lavagem da placa, foi adicionado solução de substrato cromogênico 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos à TA. A reação então, foi parada com solução de ácido sulfúrico 1M (Gomes, Filho et al. 2008).

A quantificação da cor produzida nas reações foi feita por espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), em comprimento de onda de 450 nm. A concentração de CRP, CXCL2 e CCL8 foi calculada em pg/mL por comparação com os resultados da curva padrão. No presente trabalho, o modelo de curva logística de quatro parâmetros (4PL) foi utilizado como referência para a curva de calibração, melhorando a veracidade e a precisão sobre um máximo intervalo de calibração utilizável.

3.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR)

3.9.1 Extração e quantificação do RNA total

A extração do RNA total foi realizada por meio da adição do reagente Trizol (Life Technologies - Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) aos tecidos gengivais seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para tanto, após a homogeneização dos tecidos em 1 mL de Trizol, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Millipore - Darmstadt, HE, Alemanha), logo em seguida, os tubos foram vigorosamente agitados e mantidos em repouso à temperatura ambiente (TA) por 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 13000 g, por 15 minutos, e a fase aquosa superior de cada tubo foi retirada e acondicionada em tubos novos. Para precipitação do RNA foram adicionados 1 mL de álcool isopropílico (Merck, Millipore - Darmstadt, HE, Alemanha) para cada 1 mL de fase aquosa coletada. Então, as amostras foram estocadas a -20 °C *overnight*.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados à 4°C e 13000 g, por 15 minutos, para obtenção dos precipitados. Posteriormente, estes precipitados foram lavados com etanol (Merck, Millipore - Darmstadt, HE, Alemanha) a 75% e novamente centrifugados à 4°C e 10000 g, por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado e os precipitados formados foram dissolvidos em 15 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (AppliedBiosystems - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e estocados em freezer a -80 °C. Para quantificação do RNA total, alíquota de 2 µL de cada amostra de RNA obtido foi

diluída em 98 µL de água destilada ultra pura - livre de DNase/RNase. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), considerando as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm.

3.9.2 Transcrição reversa

Com o propósito de eliminar possíveis contaminações por DNA genômico, o RNA total das amostras foi tratado com DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, com a utilização de kit High Capacity (AppliedBiosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA), ambos os kits, foram feitos de acordo com instruções do fabricante.

3.9.3 PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio das reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman (AppliedBiosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA), em um aparelho StepOne Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA). Para esta reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizadas pela mesma empresa. São elas:(Angiotensinogênio, Mm00599662_m1, Agt; Renina, Mm02342887_mH, Ren; Enzima conversora de Angiotensina I, Mm00802048_m1, Eca; Enzima Conversora de Angiotensina II, M21159006_m1, Eca2; Receptor de Angiotensina II tipo 1a, Mm01957722_s1, Atr1; Receptor Angiotensina II tipo 2, Mm00431727_g1, Atr2 e Receptor de Angiotensina 1-7, Mm00434823_s1,

Mas1) e alvos do reparo tecidual (Colágeno tipo I alfa 1, Mm00801666_g1, Col1a1; Colágeno tipo I alfa 2, Mm00483888_m1, Col1a2; Colágeno tipo III alfa 1, Mm00802300_m1, Col3a1; Fibronectina 1, Mm01256744_m1, Fn1; Fator de crescimento transformador beta 1, Mm01178820_m1, Tgfb1). Paralelamente, também foi realizada à amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada disponibilizada pela mesma empresa: Gapdh(Gapdh, Mm99999915_g1) fluoróforo VIC.

Para obtenção da melhor eficiência da reação, foram realizadas diluições seriadas de um pool de amostras de cDNA (1:2, 1:4; 1:8; 1:16, 1:32 e 1:64), utilizando as concentrações dos reagentes para do sistema Taqman determinadas previamente.

Para realização do ensaio adicionou-se a microplacas alíquotas de 2 μ L do cDNA na melhor diluição encontrada no teste descrito acima, reagentes Taqman Gene Expression Master Mix (AppliedBiosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA), mais as sondas, tudo como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 μ L. Esta reação de amplificação compreende em 2 minutos à 50°C; 10 minutos à 95°C; e 40 ciclos de 15 segundos à 95°C, e 1 min à 60°C, conforme recomendado pela empresa. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001). Para cada grupo, foi detectado o valor de CT (ciclethreshold – ou ciclo limiar) tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação foi detectado. O valor do CT do gene alvo foi subtraído do valor do CT do normalizador e resultou no valor de ΔCT ; o valor de ΔCT do gene alvo foi então subtraído do valor do ΔCT do calibrador

(controle), e foi encontrado o valor de $\Delta\Delta CT$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representou a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak and Schmittgen 2001). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências das sondas inventoriadas utilizadas.

3.10 Análise estatística

Os dados paramétricos são representados como gráficos de colunas, plotados com média e erro padrão, e foram analisados por one-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Šidak, após passar no teste de distribuição de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados não paramétricos (análise IHC) são representados como gráfico de caixa, plotados com mediana e valores mínimos e máximos, e foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Para todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e comparações múltiplas compreendendo (*) Controle vs. DP, (*) DP vs. animais tratados com Alisk com DP, e (#) Normal vs Diabético na mesma condição experimental. Todas as análises foram realizadas no software estatístico Graph Pad Prism v7.0 (GraphPad Software Inc .; San Diego, Califórnia, EUA).

RESULTADOS

4.0 Resultados

4.1 Os componentes do SRA podem contribuir com a perda óssea alveolar e o tratamento com alisquireno previne a perda óssea alveolar induzida pela DP em camundongos diabéticos

Primeiramente, nós avaliamos a perda óssea alveolar induzida pela DP para confirmar a indução da doença por meio de análise histomorfométrica, utilizando cortes histológicos da mandíbula corados pela HE. Os animais apresentaram perda óssea significativa sugerindo que a DP induzida foi efetiva quando comparados aos controles. Observamos que os animais diabéticos apresentaram uma destruição periodontal mais severa, em comparação aos camundongos normoglicêmicos (Figura 4 A, B, C, D e G). O tratamento com Alisk foi capaz de reduzir significativamente a perda óssea, tanto em animais normoglicêmicos quanto em diabéticos, em comparação com os animais não tratados (Figura 4 E, F e G).

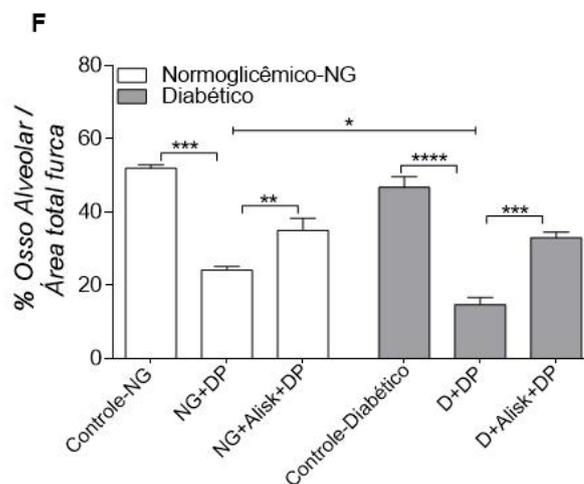
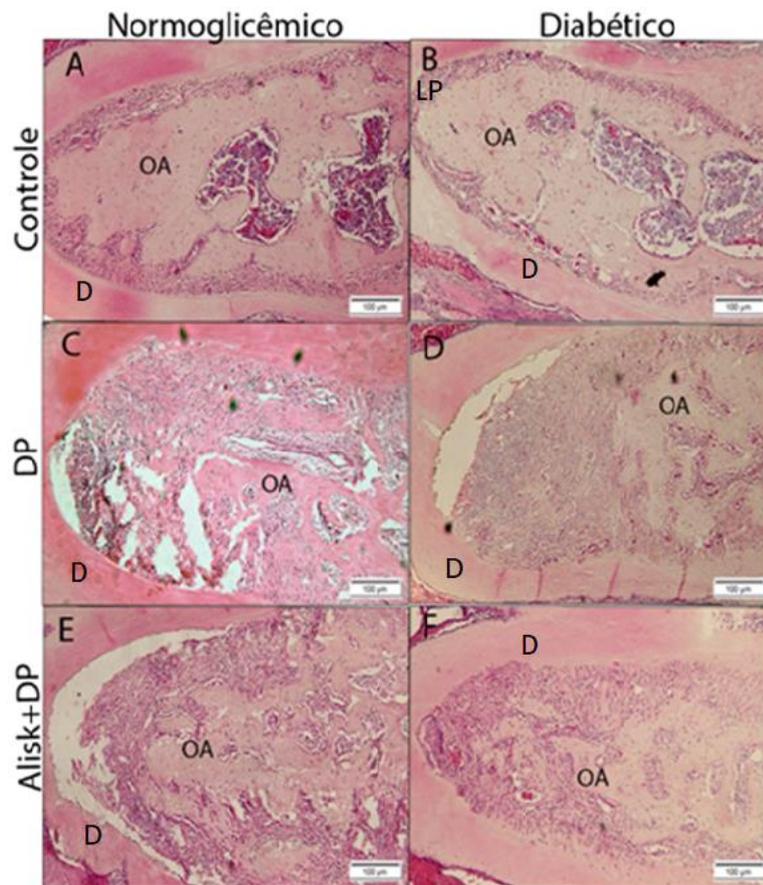


Figura 4. Perda óssea alveolar pela DP induzida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos. Cortes histológicas transversais dos primeiros molares inferiores corados com HE, dos grupos Controle Normoglicêmicos (NG) (A), Controle Diabético (D)(B), Normoglicêmico com DP (NG+DP) (C), Diabético com DP (D+DP) (D), Normoglicêmico com DP tratado com Alisquireno (NG+Alisk+DP) (E), Diabético com DP tratado com alisquireno (D+Alisk+DP) (F). O símbolo OA = osso alveolar inter-radicular, D= dentina, LP= ligamento periodontal. Medida de área de osso alveolar por μm^2 usando software Image J (G). Resultados expressam média \pm EPM. Valores significativos estão representados por, * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

4.2 Tratamento com Alisquireno modula a expressão dos componentes de SRA pela periodontite induzida.

Com o objetivo de avaliar a expressão dos componentes do SRA após a DP induzida, avaliamos a expressão gênica de Ren, Agt, Eca, Eca2, ATR1, ATR2 e MasR por RT-qPCR no tecido gengival de animais normoglicêmicos e diabéticos com DP tratados ou não com Alisk.

O RNAm da renina no tecido gengival não foi detectado pelo método avaliado (dados não mostrados).

A DP aumentou a expressão de Agt e Eca em animais normoglicêmicos e diabéticos, em comparação aos seus respectivos controle. O tratamento com Alisk diminuiu significativamente a expressão de Agt e Eca em ambas as condições, sendo a expressão. Observamos uma redução maior da expressão de Eca em animais diabéticos do que em animais normoglicêmicos (Figura 5 A-B).

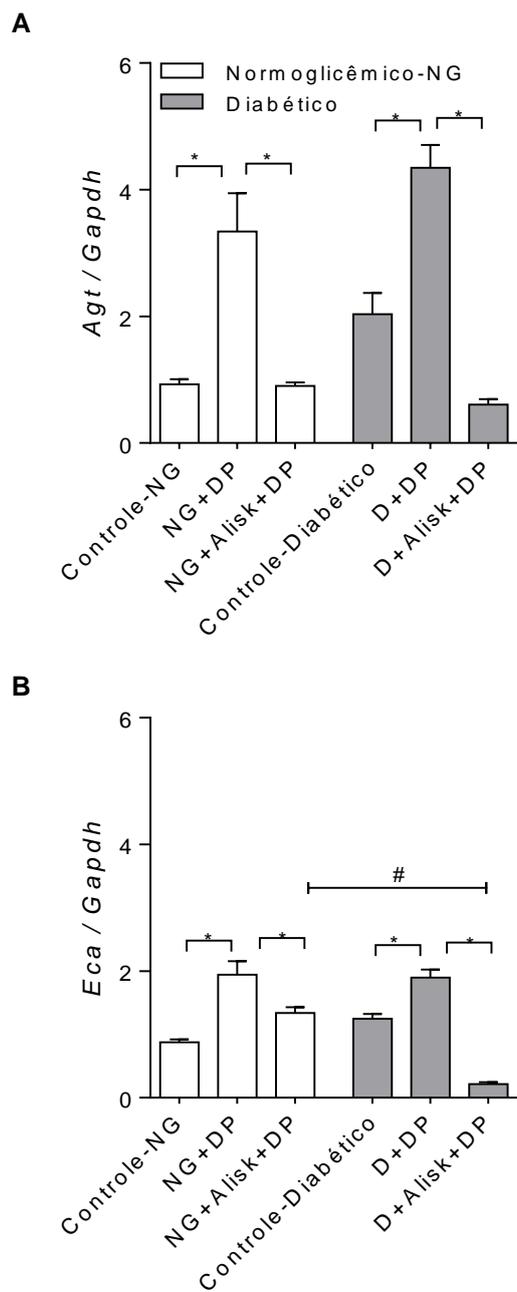


Figura 5. Expressão gênica de Agt e Eca em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida. Análise quantitativa da expressão gênica de Agt (A), Eca (B), em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP tratados ou não com alisquireno. O RNA total isolado das amostras experimentais foi submetido à transcrição reversa seguida de amplificação por reação em cadeia de polimerase. Todos os resultados foram normalizados pelo controle normoglicêmico e os resultados são representados por médias \pm EPM. Valores significativos são expressos por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

A expressão dos receptores da angiotensina II (Ang II), ATR1, apresentou uma maior expressão constitutiva em animais diabético, comparado ao controle normoglicêmico. DP não alterou a expressão de ATR1 em camundongos normoglicêmicos, mas sim em animais diabéticos. O tratamento com Alisk reduziu significativamente sua expressão, principalmente em diabéticos. A DP aumentou a expressão de ATR2 em ambas os animais, sendo mais pronunciada em camundongos normoglicêmicos. O tratamento com Alisk reduziu expressivamente essa resposta tanto em animais normoglicêmicos quanto em diabéticos (Figura 6A-B).

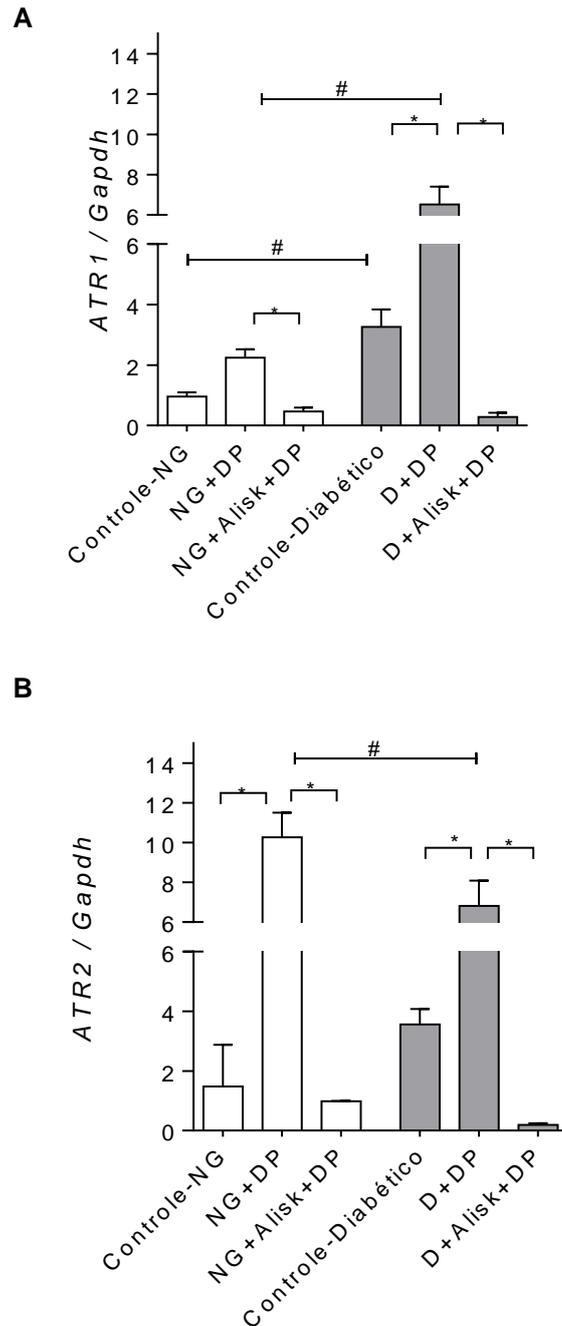


Figura 6. Expressão gênica de ATR1 e ATR2 em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida. Análise quantitativa da expressão gênica de ATR1 (A), ATR2 (B), em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP tratados ou não com alisquireno. O RNA total isolado das amostras experimentais foi submetido à transcrição reversa seguida de amplificação por reação em cadeia da polimerase. Todos os resultados foram normalizados pelas controles normoglicêmicos e os resultados são expressos com médias \pm EPM. Valores significativos são expressos por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

Em relação a Eca2, a DP levou a uma redução da expressão em camundongos normoglicêmicos, no entanto, em diabéticos não observamos alteração dos níveis de expressão. Por outro lado, o tratamento com Alisk reduziu significativamente sua expressão apenas em camundongos diabéticos (Figura 7 A). Observamos ainda, uma maior expressão constitutiva de ECA2 em animais normoglicêmicos quando comparado a animais diabéticos. A expressão de Mas1, receptor de angiotensina 1-7, também foi avaliada, e foi observada ser constitutivamente em ambos animais e maior nos animais diabéticos, comparado ao animais controles normoglicêmicos. DP não alterou esta resposta em camundongos normoglicêmicos, no entanto, em diabéticos reduziu significativamente esta expressão. O tratamento com Alisk reduziu sua expressão em ambos os animais, mas mais principalmente no animal diabético (Figura 7B).

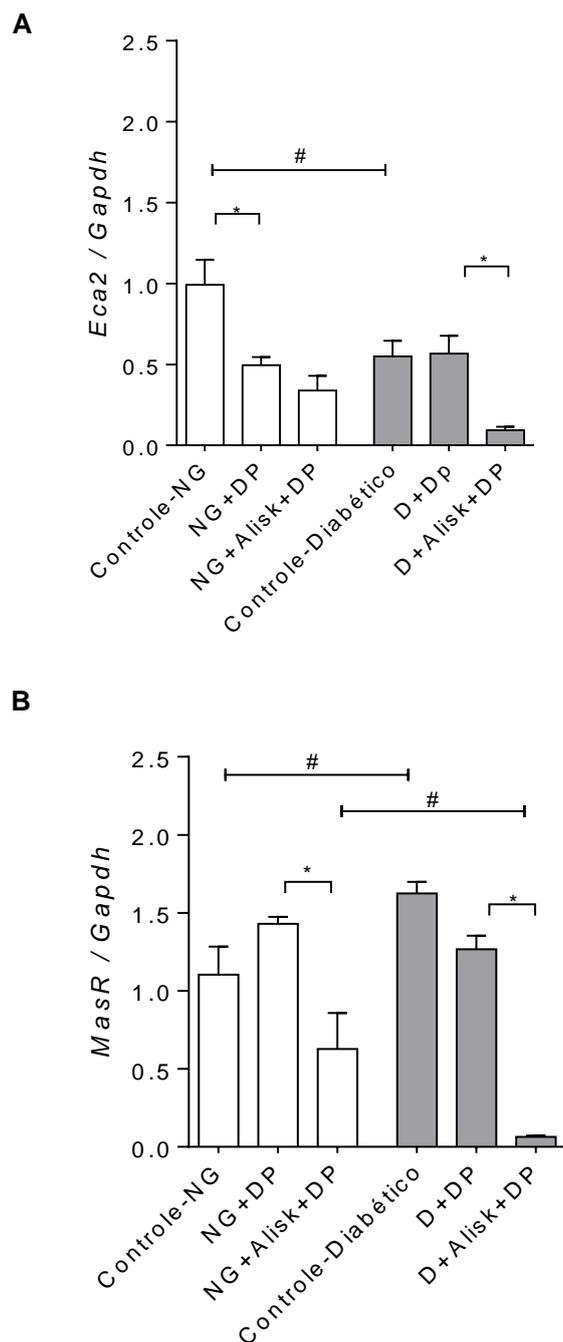


Figura 7. Expressão gênica de Eca2 e MasR em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida. Análise quantitativa da expressão gênica de Eca2 (A), Mas1 (B), em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP tratados ou não com alisquireno. O RNA total isolado das amostras experimentais foi submetido à transcrição reversa seguida de amplificação por reação em cadeia da polimerase. Todos os resultados foram normalizados pelo controle-normoglicêmico e os resultados são expressos com médias \pm EPM. Os valores significativos são expressos por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

4.3 O tratamento com alisquireno reduz a produção dos componentes de SRA no tecido gengival

Também avaliamos a presença e localização dos componentes do SRA no tecido gengival, nas condições experimentais propostas. Primeiro, nossos resultados demonstraram marcação imunológica positiva para Eca, Eca2, ATR1, e ATR2, confirmando a presença de um SRA local, no entanto, observamos perfis de imunomarcação diferentes entre os alvos avaliados.

A Eca demonstrou marcação moderada no epitélio, especialmente na camada granulosa (Figura 8 A-F). Observamos na porção conectiva, marcação constitutivamente mais pronunciada nos grupos diabéticos (Figura 8G, H). A DP aumentou a marcação de Eca em animais normoglicêmicos (epitélio e tecido conjuntivo), mas não em diabéticos, em comparação com o controle (Figura 8 C, D, I, J). O tratamento com Alisk não alterou essa resposta em camundongos normoglicêmicos, mas reduziu significativamente esta marcação no modelo diabético (Figura 8 E, F, K e L).

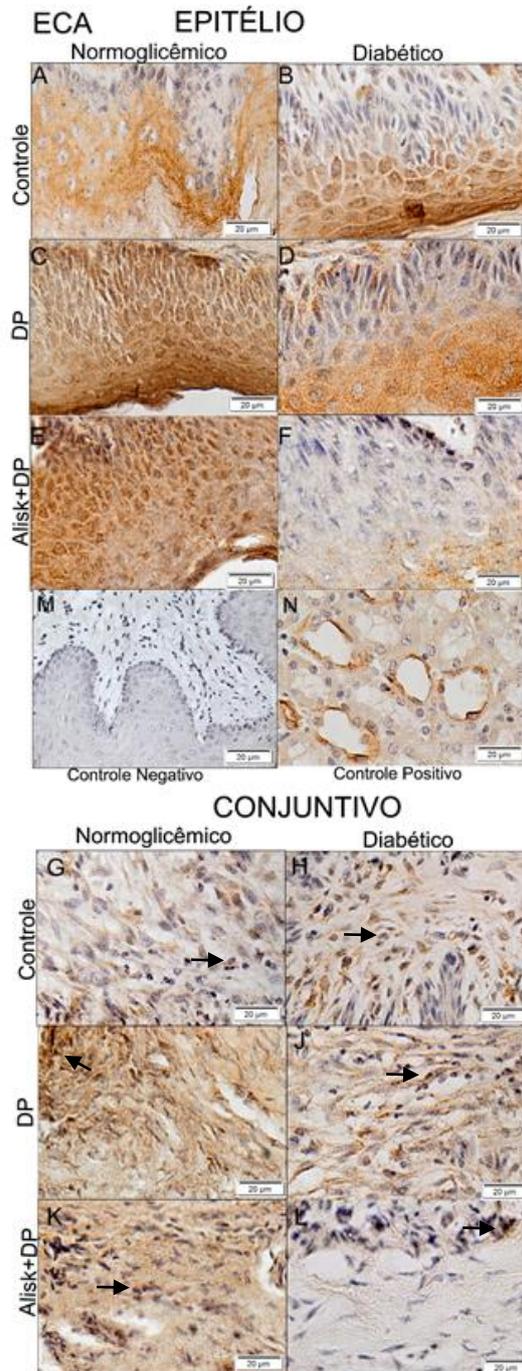


Figura 8. Produção de Eca no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida e tratados ou não com alisquireno por meio da técnica de IHC. Foto representativa da porção do epitélio e tecido conjuntivo do tecido gengival de camundongos normoglicêmicos (A,G), diabético (B,H), normoglicêmico com DP (C,I), diabético com DP (D,J), normoglicêmico com DP tratado com alisquireno (E,K), diabético com DP tratado com alisquireno (F,L) por IHC. Figura (M) representa o controle negativo (gengiva) e (N) representa o rim, como controle positivo, respectivamente. O gráfico (O) representa o score do epitélio e tecido conjuntivo marcado. As setas indicam marcações positivas de fibroblastos gengivais. As diferenças estatísticas são representadas pela mediana. Valores significativos são representados por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

A Eca2 demonstrou forte marcação em todas as camadas do epitélio e imunomarcação moderada na porção conjuntiva, sendo semelhante entre os controles normoglicêmicos e diabético (Figura 9 A, B, G, H). A DP não alterou a marcação de Eca2 em animais normoglicêmicos, mas em diabéticos observamos uma maior marcação no epitélio, enquanto reduzida na porção conectiva (Figura 9 C, D, I, J). O tratamento com Alisk foi capaz de reduzir significativamente a marcação de Eca2 apenas em animais diabéticos (porção epitélio) (Figura 9F).

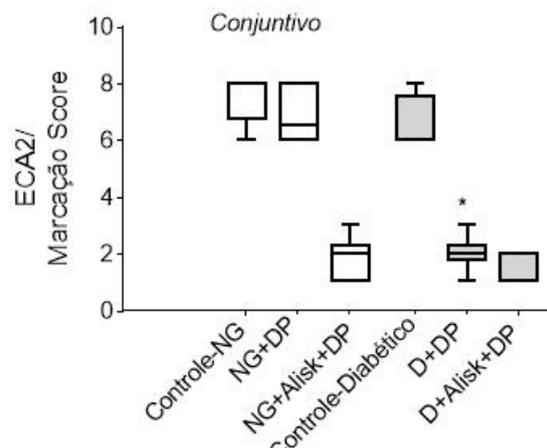
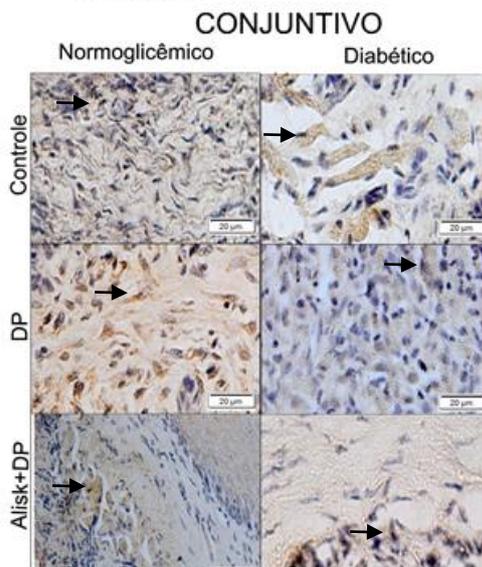
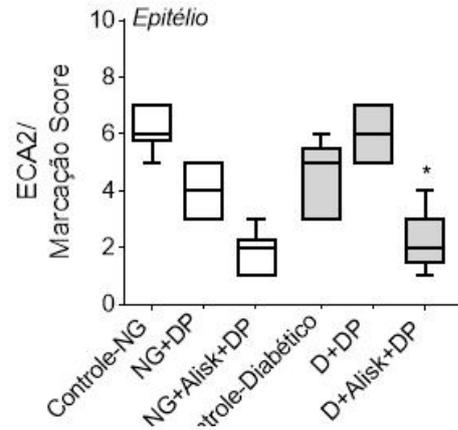
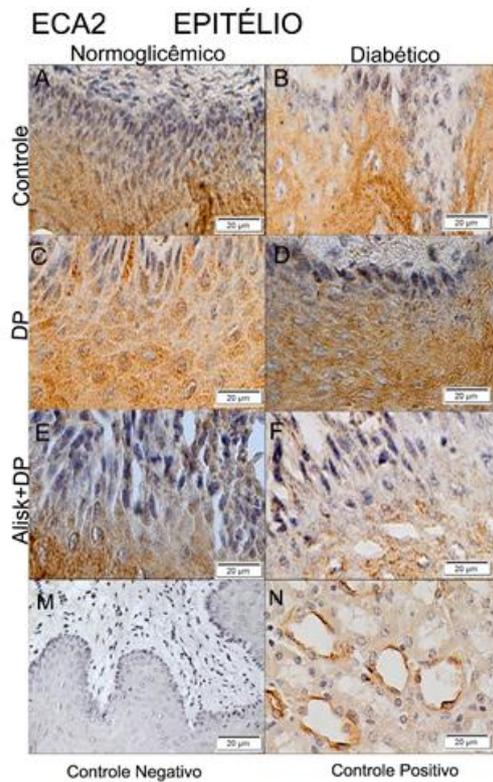


Figura 9. Produção de Eca2 no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida e tratados ou não com Alisquireno. Foto representativa da porção do epitélio e tecido conjuntivo da gengiva de camundongos normoglicêmicos (A, G), diabético (B, H), normoglicêmico com DP (C, I), diabético com DP (D, J), normoglicêmico com DP tratado com alisquireno (E, K), diabético com DP tratado com alisquireno (F, L) por IHC. Figura (M) representa o controle negativo (gengiva) e (N) representa o rim, como controle positivo, respectivamente. O gráfico (O) representa o score do epitélio e tecido conjuntivo marcado. As setas indicam marcações positivas de fibroblastos gengivais. As diferenças estatísticas são representadas pela mediana. Valores significativos são representados por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

O ATR1 mostrou forte marcação nas camadas basais do epitélio, especialmente em diabéticos, e moderada marcação no tecido conjuntivo (Figura 10 A, B, G, H). A DP aumentou significativamente a marcação de ATR1 em animais normoglicêmicos (epitélio e porção conjuntiva) (Figura 10 C, I), mas em diabéticos não houve alterações (Figura 10 D, J). O tratamento com Alisk, no entanto, foi capaz de reduzir significativamente esta imunomarcação de ATR1 em ambos os modelos experimentais (epitélio e conectivo) (Figura 10 E, F, K, L).

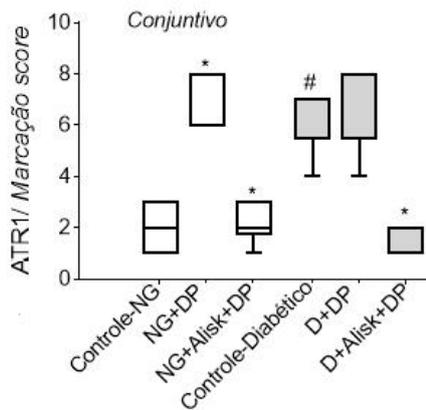
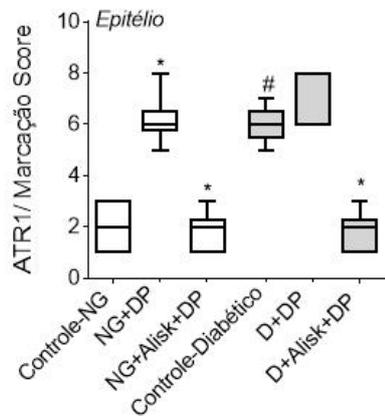
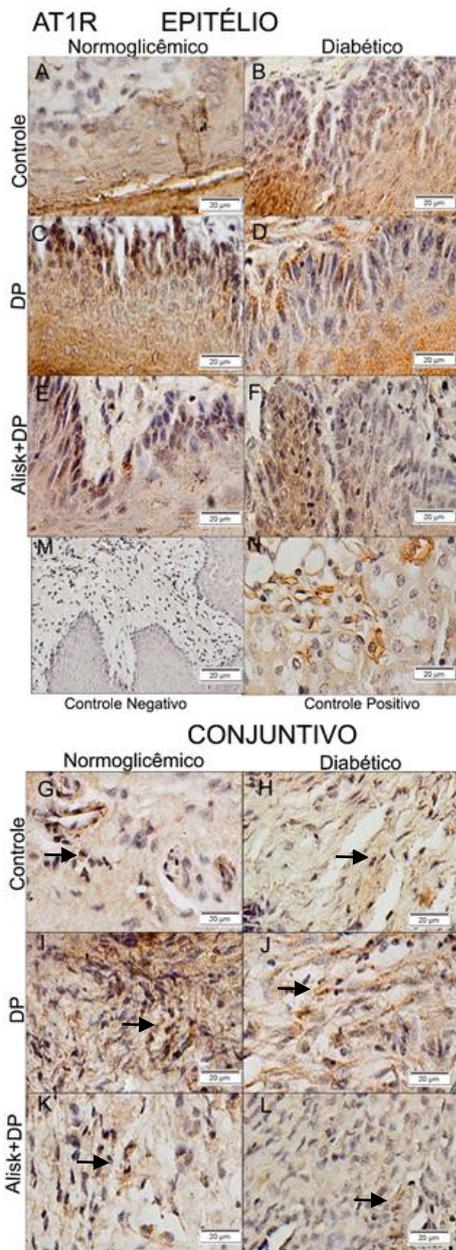


Figura 10. Produção de AT1R no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com a DP induzida e tratados ou não com Alisquireno. Foto representativa da porção do epitélio e tecido conjuntivo da gengiva de camundongos normoglicêmicos (A, G), diabético (B, H), normoglicêmico com DP (C, I), diabético com DP (D, J), normoglicêmico com DP tratado com alisquireno (E, K), diabético com DP tratado com alisquireno (F, L) por IHC. Figura (M) representa o controle negativo (gengiva) e (N) representa o rim, como controle positivo, respectivamente. O gráfico (O) representa o score do epitélio e tecido conjuntivo marcado. As diferenças estatísticas são representadas pela mediana. As setas indicam marcação positiva para fibroblastos gengivais. Valores significativos são representados por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

Observamos fraca marcação de AT2R nas camadas do epitélio e no tecido conjuntivo dos animais controles normoglicêmicos (Figura 11A, G), no entanto, houve marcação moderada no epitélio e tecido conjuntivo dos animais diabéticos (Figura 11B, H). A DP aumentou significativamente a marcação de AT2R apenas em animais normoglicêmicos (Figura 11C, I). O tratamento Alisk reduziu significativamente esta resposta nos grupos normoglicêmicos (Figura 11E, K), e em diabéticos observamos redução desta marcação apenas na porção conjuntiva (Figura 11L).

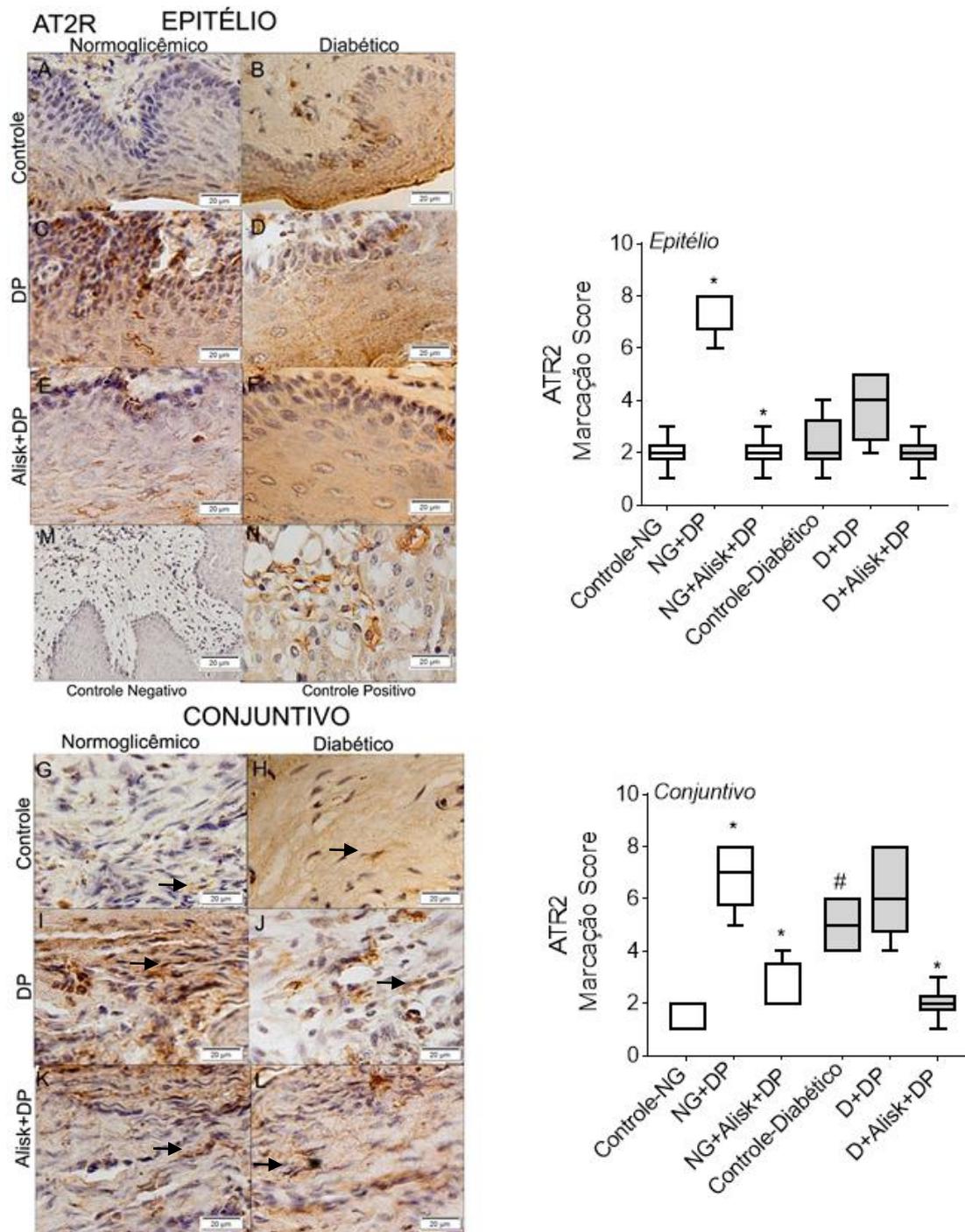


Figura 11. Produção de AT2R no tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com a DP induzida e tratados ou não com Alisquireno. Foto representativa da porção do epitélio e tecido conjuntivo da gengiva de camundongos normoglicêmicos (A, G), diabético (B, H), normoglicêmico com DP (C, I), diabético com DP (D, J), normoglicêmico com DP tratado com alisquireno (E, K), diabético com DP tratado com alisquireno (F, L) por IHC. Figura (M) representa o controle negativo (gengiva) e (N) representa o rim, como controle positivo, respectivamente. O gráfico (O) representa o score do epitélio e tecido conjuntivo marcado. As setas indicam marcação positiva para fibroblastos gengivais. As diferenças estatísticas são representadas pela mediana. Valores significativos são representados por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

4.4 Tratamento com Alisquireno reduz a produção de mediadores inflamatórios provocados pela periodontite induzida

Em seguida, avaliamos a resposta inflamatória medindo os níveis de produção de CRP, marcador específico da inflamação e produção das quimiocinas CXCL2 e CCL8 por ELISA. Nossos resultados demonstram uma produção de CRP significativamente elevada em ambos os grupos normoglicêmico e diabéticos com DP. O tratamento com Alisk reduziu significativamente esta resposta, apenas em animais diabéticos (Figura 12 A).

A DP foi capaz de aumentar a produção de CXCL2 tanto em animais normoglicêmicos quanto em diabético. O tratamento com Alisk reduziu esta resposta apenas em camundongos diabéticos. Por outro lado, a DP elevou a produção de CCL8 em ambos os animais, sendo este aumento mais pronunciado em animais normoglicêmicos. Já o tratamento com Alisk reduziu significativamente a produção de CCL8 apenas em animais normoglicêmicos. (Figura 12 B, C).

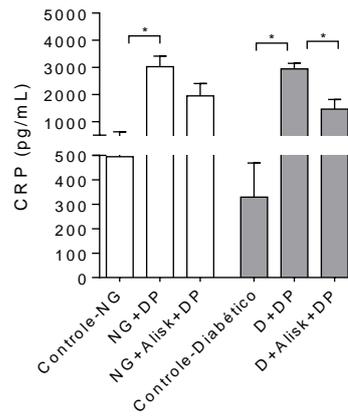
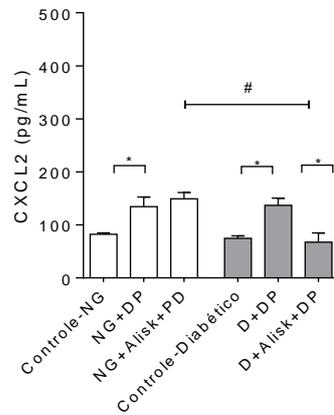
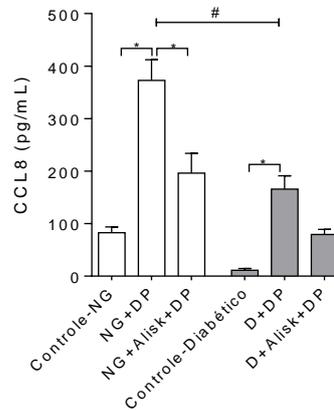
A**B****C**

Figura 12. Produção de CRP, CXCL2, CCL8 em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida tratados ou não com Alisquireno. CRP (A), CXCL2 (B), CCL8 (C) por pg / mL no tecido gengival controle normoglicêmico (NG), normoglicêmico com DP (NG+DP), normoglicêmico com DP tratado com Alisk (NG+Alisk + DP), diabético (Diabético), diabético com DP (D+DP), diabético com DP tratado com Alisk (D+Alisk + DP) por ELISA. Resultados expressam média \pm EPM. Valores significativos são representados por $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

4.5 Tratamento com alisquireno modula a expressão gênica dos marcadores do remodelamento tecidual

Com o objetivo de evidenciar o efeito do tratamento com alisquireno sobre o reparo tecidual, avaliamos a expressão gênica de alguns marcadores dos componentes da matriz extracelular do tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP, tratados ou não com Alisk. A DP aumentou a expressão de Col1a1, Col1a2, Col3a1, Fn1, e diminuiu Tgfb1 em camundongos normoglicêmicos e diabéticos, quando comparado aos seus respectivos controles (Figura 13A-E). Em camundongos normoglicêmicos, o tratamento com Alisk reduziu a expressão de Col1a1 e Fn1, enquanto aumentou Tgfb1 (Figura 13 A, D e E). Em camundongos diabéticos, Alisk apresentou uma resposta semelhante, além de diminuir a expressão de Col1a2 (Figura 13 B).

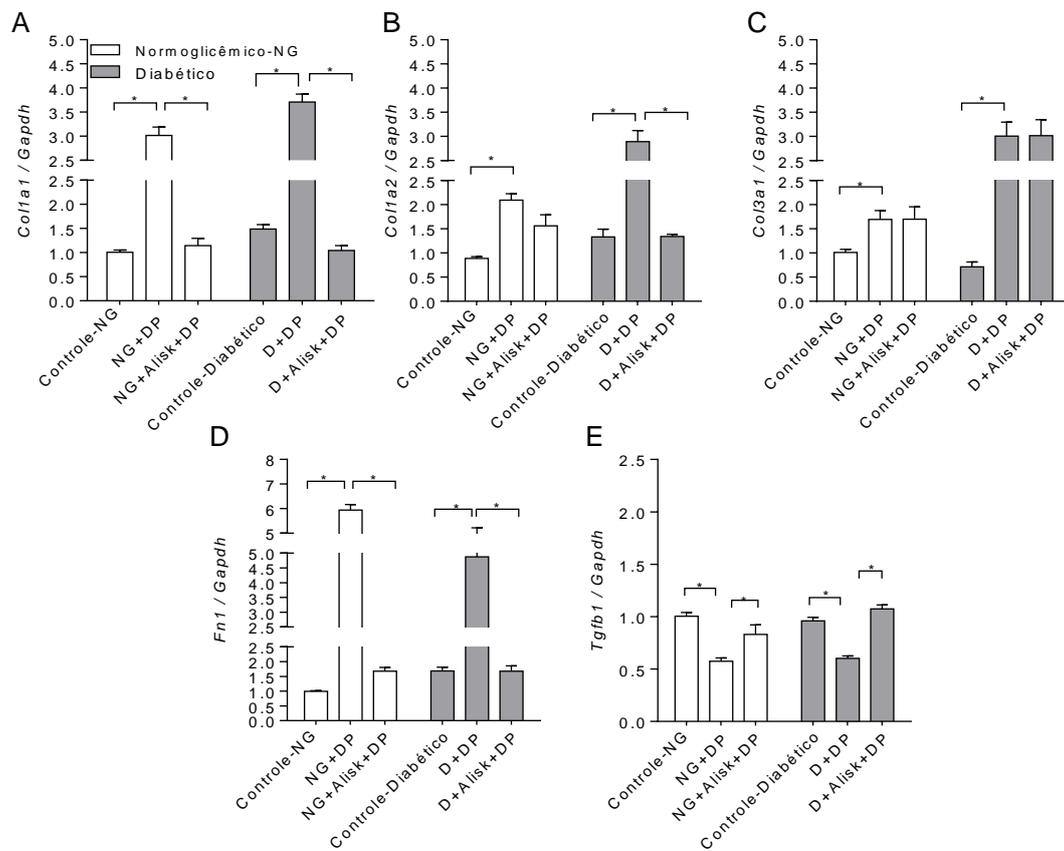


Figura 13. Análise quantitativa da expressão gênica de Col1a1, Col1a2, Col3a1, Fn, TGF- β em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos com DP induzida e tratados ou não com Alisquirone. Expressão gênica de Col1a1 (A), Col1a2 (B), Col3a1 (C), Fn (D), TGF- β (E). O RNA total isolado das amostras experimentais foi submetido à transcrição reversa seguida de amplificação por reação em cadeia da polimerase. Todos os resultados foram normalizados pelo controle-normoglicêmico e são representados com médias \pm EPM. Valores significativos são expressos por * $p < 0,05$ (NG vs. NG+DP; NG+DP vs. NG+Alisk+DP e D vs D+DP; D+DP vs. D+Alisk+DP); # indica diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos (NG vs. D; NG+DP vs D+DP; NG+Alisk+DP vs. D+Alisk+DP).

DISCUSSÃO

5.0 Discussão

No presente estudo, avaliamos uma correlação entre os componentes locais do SRA e doenças periodontais (DP), sobre marcadores da inflamação e reparo tecidual em tecido gengival de camundongos normoglicêmicos e diabéticos. Este estudo sugere que os componentes do SRA podem exacerbar a resposta inflamatória e possivelmente a perda óssea alveolar, principalmente em camundongos diabéticos. Além disso, também confirmou a existência de componentes do SRA local no tecido gengival, bem como sua contribuição na remodelação tecidual.

Em primeiro lugar, demonstramos a perda óssea alveolar induzida pela DP em camundongos normoglicêmicos e diabéticos. Nossos resultados demonstraram que a DP foi mais pronunciada em camundongos diabéticos, do que em camundongos normoglicêmicos, corroborando com dados da literatura que relatam que o diabetes favorece o desenvolvimento e progressão da DP, conforme revisado por Preshaw, Alba et al. (2012). Também é relatado que a condição diabética apresenta alterações no sistema renina-angiotensina (SRA) (Amemiya, Ishihara et al. 1990, Zhang, Qu et al. 2017), portanto, propusemos investigar os efeitos do tratamento com alisquireno (Alisk), um inibidor sistêmico da renina, nas condições experimentais propostas.

O tratamento com Alisk foi capaz de prevenir significativamente a perda óssea e a inflamação periodontal, como já demonstrado em ratos normais, corroborando com nossos resultados (Santos, Morandini et al. 2015). No entanto, observamos um efeito mais pronunciado nos animais diabéticos, quando comparados aos animais normoglicêmicos. Nossos resultados sugerem que o SRA pode ter um papel importante na perda óssea alveolar

induzida pela DP, principalmente em camundongos diabéticos, onde os efeitos da inibição da renina foram mais significativos. Esse resultado necessita de maiores estudos para compreendermos o mecanismo pelo qual isso ocorre neste modelo.

Com o objetivo de confirmar uma possível correlação entre o SRA e a DP no animal diabético, avaliamos a expressão gênica e protéica dos componentes do SRA por RT-qPCR e IHC, respectivamente, no tecido gengival. Nossos resultados confirmam a presença de vários componentes do SRA no tecido gengival (SRA local), exceto pela expressão do gene da renina, que não foi detectada (não mostrado), como também relatado por Santos e colaboradores (2015) em ratos, sugerindo que os efeitos do tratamento de Alisk podem ser devidos à inibição sistêmica da renina e não local.

Em relação aos outros componentes do SRA, a DP foi capaz de aumentar a expressão de Agt, em ambos animais normoglicêmicos e diabéticos, e por ser o primeiro componente da cascata de SRA, com o substrato da renina para gerar Ang I (Atlas 2007), a expressão de Agt induzida pela DP pode sugerir um aumento em todos os peptídeos de angiotensina. Autores já relataram que a angiotensina II está aumentada em condições inflamatórias, incluindo a DP, atuando como potente mediador inflamatório (Piqueras, Kubes et al. 2000, Alvarez, Cerda-Nicolas et al. 2004, Nobuhiko, Sugauma et al. 2004, Chang and Wei 2015, Santos, Morandini et al. 2015). Em contraste, a inibição da renina por Alisk preveniu significativamente essa resposta inflamatória em camundongos normoglicêmicos e diabéticos, provavelmente reduzindo os níveis locais da circulação de AngII, que, além de ser uma molécula inflamatória, regula a expressão gênica e proteica de Agt,

como já mostrado (Kobori, Harrison-Bernard et al. 2001). A expressão de Agt foi similar entre animais normoglicêmicos e diabéticos, e, apesar de relacionada à resposta inflamatória da DP induzida, como discutido, não é responsável pelas diferenças observadas no modelo diabético.

A enzima conversora de angiotensina (Eca) é uma enzima chave na produção de Ang II a partir de Ang I. Nossos resultados apresentaram expressão gênica semelhante nos grupos normoglicêmico e diabético, mas elevada marcação proteica no epitélio gengival e tecido conjuntivo em camundongos diabéticos, como já demonstrado em outros modelos diabéticos, (Ustundag, Canatan et al. 2000, Cordonnier, Zaoui et al. 2001, Lely, Luik et al. 2007), o que sugeriria uma maior produção constitutiva de Ang II. A DP levou a um aumento significativo da expressão gênica de Eca, nos grupos normal e diabético, mas a IHC apresentou diferenças apenas no grupo normoglicêmico com DP, uma vez que o tecido diabético já apresentava marcação elevada, sem inflamação. O tratamento com Alisk foi mais efetivo em camundongos diabéticos, mas levou à diminuição da expressão gênica e proteica de Eca em ambos os animais. Visto isso, podemos sugerir que a resposta exacerbada observada em animais diabéticos com DP, pode ser explicada em parte, pela elevação da produção de AngII, devido ao aumento da expressão de Eca, enquanto o tratamento com Alisk é capaz de proteger contra essa resposta, principalmente em animais diabéticos. Alisk bloqueia a geração de Agt em AngI pela inibição da renina, reduzindo todos os peptídeos de angiotensina, e assim induzindo uma baixa regulação de Eca, conforme demonstrado por outros autores (Schunkert, Ingelfinger et al. 1993, Sadjadi, Kramer et al. 2005), corroborando com nossos resultados..

Em relação aos receptores tipo 1 (AT1R) e tipo 2 (AT2R) de angiotensina, também observamos respostas interessantes. AT1R é o caminho pelo qual a Ang II age como um mediador inflamatório, levando ao aumento da proliferação celular, fibrose, estresse oxidativo e produção de citocinas e quimiocinas, enquanto AT2R apresenta efeitos opostos, como um ramo antiinflamatório da cascata de SRA(Unal and Karnik 2014, Santos, Morandini et al. 2015). Nossos dados mostram uma maior expressão gênica e proteica de AT1R constitutiva no tecido gengival do grupo controle diabético, comparado ao controle normoglicêmico, como já mostrado na condição diabética (Wagner, Gehlen et al. 1999, Romero-Nava, Rodriguez et al. 2016). AT2R foi similarmente expresso em ambas as condições, exceto pela maior marcação protéica na porção conectiva da gengiva diabética. A DP levou a um aumento pronunciado na expressão gênica do AT1R no grupo diabético, enquanto no grupo normoglicêmico, só observamos o aumento da imunomarcação gengival de AT1R. Em relação ao AT2R, camundongos normoglicêmicos com DP apresentaram maior expressão gênica e protéica, no entanto no grupo diabético essa resposta foi menos pronunciada. Esses dados podem ajudar a explicar as consequências exacerbadas da DP no modelo diabético, que apresentou maior resposta AT1R, relacionada à promoção da inflamação, combinada a uma menor resposta do AT2R, demonstrando menores efeitos protetores na inflamação e lesão tecidual (Benndorf, Krebs et al. 2009, Abadir, Walston et al. 2011, Dhande, Ma et al. 2015), sugerindo um mecanismo protetor endógeno alterado na condição diabética.

O tratamento com Alisk levou a uma redução significativa da expressão gênica e protéica de AT1R e AT2R em grupos normoglicêmicos e diabéticos.

Santos, Morandini et al. (2015) não observaram redução dos receptores AngII com tratamento com Alisk no tecido gengival de ratos, entretanto, outros autores relataram redução da expressão de AT1R no tecido inflamado de camundongos diabéticos tratados com Alisk (Ye, Qian et al. 2011). O efeito protetor do Alisk na DP pode ser explicado devido à redução da expressão do gênica e protéica do AT1R, uma vez que a ligação AngII/ Agt1r é o principal eixo do SRA relacionado a efeitos danosos/inflamatórios.

AngII é o maior efetor deletério do SRA, no entanto Eca2, uma enzima homóloga Eca, é capaz de converter AngII em Ang1-7, que age através do receptor Mas (Masr), que por sua vez mostra efeito oposto ao eixo AngII/ATR1, compreendendo um importante mecanismo endógeno que elimina a produção de AngII e neutraliza seus efeitos (Rodrigues Prestes, Rocha et al. 2017). Nossos resultados mostraram que camundongos diabéticos tiveram diminuição da expressão de Eca2, que já foi demonstrado estar reduzido em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (Tikellis, Bialkowski et al. 2008, Tikellis, Pickering et al. 2012). DP levou à diminuição da expressão gênica de Eca2 em camundongos normoglicêmicos, mas em diabético não foi alterada, no entanto, IHC demonstrou diminuição significativa da marcação de Eca2 no tecido conjuntivo gengival. Estas diferenças na expressão gênica e protéica podem ser explicadas, pois na IHC é possível distinguir um padrão de expressão espacial, que pode ser mascarado no ensaio RT-qPCR, no qual os níveis de mRNA são agrupados de todas as porções do tecido (epitélio e tecido conjuntivo).

O tratamento com Alisk não alterou a expressão gênica de Eca2 em camundongos normoglicêmicos, mas reduziu a marcação protéica na porção

conectiva do tecido gengival. No grupo diabético, o tratamento levou à diminuição da expressão de Eca2 e reduziu a marcação no epitélio gengival. Até o presente momento, não há estudos na literatura demonstrando os efeitos do tratamento com Alisk na expressão gênica e protéica de Eca2, no entanto, já observamos que os camundongos diabéticos tratados com Alisk apresentam uma redução de Eca2 mais pronunciada, do que os camundongos normoglicêmicos. Alguns elementos demonstraram modular a expressão de Eca2, como peptídeos e hormônios da angiotensina, mas ainda pouco se sabe sobre sua regulação (Clarke and Turner 2012).

Em relação à expressão do gênica de MasR, receptor da Ang1-7, DP, não alterou significativamente essa resposta em camundongos normoglicêmicos, como já observado em ratos normais com DP (Santos, Morandini et al. 2015), entretanto, camundongos diabéticos com DP tiveram expressão significativamente diminuída. Este resultado, combinado a uma redução na expressão constitutiva de Eca2 no modelo diabético e, portanto, possível redução da produção de Ang1-7, sugere uma diminuição do mecanismo antiinflamatório endógeno, o que pode ajudar a explicar a pronunciada inflamação periodontal nos camundongos diabéticos com DP. O tratamento com Alisk diminuiu a expressão de Masr em ambos os animais, mas especialmente em diabéticos.

Alguns estudos já mostraram que inibidores de SRA são capazes de aumentar a resposta do eixo Eca2/Ang1-7/Masr em diferentes modelos experimentais, atenuando vários efeitos deletérios de diferentes patologias, como obesidade, resistência à insulina e nefropatia diabética (Frantz, Crespo-Mascarenhas et al. 2013, Callera, Antunes et al. 2016). Em nosso estudo, a

redução drástica do MasR promovida pelo tratamento com Alisk pode ser explicada em parte pelo bloqueio completo da renina na primeira etapa da cascata do SRA, reduzindo todos os componentes subseqüentes do SRA e conseqüentemente a ligação com este receptor. Além disso, o modelo experimental, assim como o modo de indução da doença utilizado neste trabalho, pode ser um fator importante nesta diferença de resposta. Embora, novos estudos possam ser necessários para elucidar a participação do eixo Eca2/Ang1-7/MasR sobre o desenvolvimento da DP e sua relação com a condição diabética, essas evidências e o perfil diferencial da expressão de genes e proteínas do componente SRA no tecido gengival observado no presente estudo podem ajudar a explicar, pelo menos em parte, porque os animais diabéticos apresentaram maior destruição periodontal e porque o tratamento com Alisk teve efeitos protetores mais pronunciados no modelo diabético. Além disso, novos estudos demonstrando a participação das vias alternativas da cascata do SRA, como a via da tonina, catepsina G, quimase, elastase-2, dentre outras, na geração de AngII, seria extremamente importante para elucidar/compreender a participação do SRA local em diferentes patologias, como na DP.

Resumidamente, nossos resultados demonstraram que a DP é capaz de aumentar a expressão gênica e a produção dos componentes da cascata do SRA, aumentando Agt e Eca, bem como a ativação dos receptores ATR1 e ATR2, além de reduzir a resposta do eixo Eca2. O tratamento com Alisk por sua vez, apresentou resultados bem interessantes, no qual a inibição de renina sistêmica foi capaz de reduzir todos os peptídeos da cascata do SRA principalmente no modelo diabético. O uso de drogas anti-hipertensivas em

modelos com periodontite experimental, comumente é observado na prática clínica. Logo, o uso destas drogas nestes modelos experimentais pode ser uma excelente alternativa terapêutica, já que a inibição de componentes do SRA parece contribuir com a prevenção da resposta inflamatória induzida pela DP.

Nosso próximo passo foi avaliar a resposta inflamatória induzida pela DP, bem como o efeito do tratamento do Alisk sobre esta resposta. Para tanto, os níveis de CRP, um marcador específico do processo inflamatório foi avaliado. Nossos resultados demonstram que a DP aumentou a resposta inflamatória tanto em animais normoglicêmicos quanto em diabéticos. Corroborando com nossos achados, diferentes estudos tem demonstrado que pacientes diabéticos com periodontite também apresentam níveis elevados de CRP (Fronczyk, Moleda et al. 2014, Peng, Wang et al. 2015). Este aumento de CPR, está intimamente relacionado com a interação complexa entre as ações bacterianas e a resposta imunológica do hospedeiro, as quais envolvem secreção de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas e quimiocinas, que são responsáveis por exacerbar a resposta inflamatória (Sandros, Karlsson et al. 2000, Takahashi, Honda et al. 2010).

O tratamento com Alisk reduziu os níveis de CRP, apenas em animais diabéticos. Dados da literatura tem demonstrado que bloqueadores dos receptores de AngII, como Candesartan suprimem os mediadores da inflamação, como IL-6, MCP-1 e CRP, em pacientes DM tipo 2, corroborando com os nossos resultados (Pavlatou, Mastorakos et al. 2011). Da mesma maneira, Dandona e colaboradores (2007) relataram que inibidores de receptor de AngII, diminuem as EROs, CRP e aumentam a inibição do fator nuclear de transcrição kappa- β , possivelmente pela estimulação sem oposição

do receptor ATR2 da AngII. Esta redução da resposta inflamatória promovida pelo Alisk, pode ser explicada em parte, devido à redução da estimulação do receptor ATR1, diminuindo os efeitos deletérios no organismo, como a inflamação. Além disso, vias alternativas na geração de AngII, e consequentemente ativação de receptores de Ang II, como MasR e ATR2 podem estar sendo estimulados, sobressaindo os efeitos anti-inflamatórios, e reduzindo assim o processo inflamatório induzido pela DP.

A produção gengival da quimiocina C-X-C do ligante 2 (CXCL2), um quimioatraente crucial para o recrutamento de neutrófilos (Zenobia, Luo et al. 2013), e o ligante 8 do quimiocina C-C (CCL8), relacionado à quimiotaxia de monócitos também foi avaliada (Asano, Takahashi et al. 2015, Panezai, Ghaffar et al. 2017). A DP aumentou significativamente a produção dessas quimiocinas em ambos os animais, mas a CCL8 foi mais evidente em camundongos normoglicêmicos do que nos diabéticos, o que nos permite sugerir menor recrutamento de monócitos no tecido gengival diabético. Um balanceamento correto entre neutrófilos e monócitos/macrófagos é crucial para a resolução da inflamação e tentativa de reparo tecidual (Chapple, Srivastava et al. 1998, Cekici, Kantarci et al. 2014), bem como, já foi demonstrado que o diabetes não reduz o recrutamento de leucócitos, mas prejudica a capacidade fagocitária e a depuração bacteriana (Pettersson, Christoffersson et al. 2011). Assim, essas diferenças na produção de quimiocinas observadas no presente estudo podem representar um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da destruição periodontal durante a inflamação em diabéticos.

O tratamento com Alisk preveniu o aumento de CXCL2 em diabéticos, mas não em camundongos normoglicêmicos, mas reduziu a produção de CCL8

em ambos os animais. Estudos já mostraram que o eixo AngII/Agtr1 está envolvido no recrutamento de neutrófilos em diferentes modelos experimentais, através de quimiocinas CXC (Nabah, Mateo et al. 2004, Shimada, Murayama et al. 2011). Poucos estudos relacionam o SRA e a quimiocina CCL8, mas um estudo in vitro já demonstrou que o AngII pode estimular a expressão de CCL8 em macrófagos humanos (Tone, Shikata et al. 2007). Nossos dados corroboram com a literatura, evidenciando um papel visível do SRA na produção de quimiocinas, principalmente no modelo diabético, ajudando a explicar o aumento pronunciado das consequências da DP e os efeitos protetores da inibição da renina induzida pelo tratamento com Alisk obtidos no presente estudo.

Nosso objetivo final foi avaliar o papel da inibição da renina na expressão gênica de marcadores do remodelamento tecidual na gengiva dos animais na presença de DP induzida. A DP leva à destruição da matriz extracelular (MEC), ruptura da arquitetura tecidual e perda de coesão, favorecendo o infiltrado inflamatório e a invasão patogênica (Seguier, Godeau et al. 2000). O colágeno é um dos componentes da matriz extracelular mais importante e abundante. O colágeno tipo 1, composto por uma estrutura de hélice helicoidal de três cadeias de peptídeos ($\alpha 1$, $\alpha 1$ e $\alpha 2$) (Shoulders and Raines 2009) e colágeno tipo 3, consistindo de apenas uma cadeia α (Karsdal, M.A), já foi relacionado à progressão da DP e outras condições inflamatórias (Lorencini, Silva et al. 2009). Em seguida, analisamos a expressão dos genes Col1a1, Col1a2 e Col3a1 nas condições experimentais propostas.

DP levou a um aumento significativo da expressão do gene Col1a1, Col1a2 e Col3a1, sendo mais pronunciado em camundongos diabéticos.

Estudos já relataram aumento da expressão de colágeno no modelo DP, como mecanismo compensatório e tentativa de reparo devido ao aumento da degradação da MEC (Larjava, Sandberg et al. 1989, Larjava, Sandberg et al. 1990). Já foi mostrado que a AngII estimula a síntese de colágeno em células musculares lisas vasculares humanas (Ford, Li et al. 1999), fibroblastos cardíacos (Lijnen, Petrov et al. 2001) e fibroblastos diabéticos da pele (Ren, Hao et al. 2013), e nossos resultados mostraram que o tratamento com Alisk reduziu Col1a1, Col1a2 em ambos os animais, provavelmente devido uma diminuição nos níveis de AngII, no entanto, Col3a1 não foi alterada, sugerindo que ela não é regulada por produtos derivados da renina.

Também avaliamos a expressão de fibronectina (Fn), uma glicoproteína da MEC relacionada ao reparo tecidual e adesão/migração celular (Singh, Carraher et al. 2010). Estudos já relataram alterações de Fn na condição diabética (Roy, Sala et al. 1990, Stanley, Wang et al. 2008), corroborando com nossos resultados, onde observamos uma expressão constitutiva aumentada de Fn no controle diabético, comparado ao controle normoglicêmico. A DP aumentou significativamente a expressão de Fn em camundongos normoglicêmicos e diabéticos. O tratamento da Alisk foi capaz de impedir essa resposta em ambos os animais. Estudos recentes já mostraram que AngII estimula a síntese de Fn em células tubulares proximais (Alexander, Ding et al. 2014) e coletoras (Cuevas, Gonzalez et al. 2015) por diferentes vias. Em conjunto, nossos resultados sugerem um importante papel do SRA na remodelação tecidual, uma vez que a inibição da renina reduz drasticamente os níveis de Fn, possivelmente pela redução dos níveis de AngII, demonstrando uma atividade modulatória na síntese de Fn.

Por fim, analisamos o TGF- β 1, um importante fator de crescimento envolvido no processo de reparo tecidual, sendo responsável por regular a produção de moléculas da MEC, aumentando a cicatrização tecidual, acelerando a remodelação do tecido conjuntivo e angiogênese (Branton and Kopp 1999, Tuxhorn, Ayala et al. 2002, Babel, Cherepnev et al. 2006). As baixas atividades biológicas do TGF- β 1 resultam em remodelação e perfusão insuficientes dos tecidos de suporte dos dentes, contribuindo para a destruição periodontal (Babel, Cherepnev et al. 2006). Embora os níveis de TGF- β 1 estejam elevados na doença moderada, a progressão da DP diminuiu essa resposta em amostras de líquido obtidas nas bolsas periodontais (Skaleric, Kramar et al. 1997). Esses achados corroboram com nossos resultados, nos quais a DP reduziu significativamente a expressão de TGF- β 1 nos dois animais, possivelmente contribuindo para uma maior resposta inflamatória induzida pela DP. Além disso, o tratamento com Alisk foi capaz de reverter essa resposta, aumentando esses níveis principalmente em camundongos diabéticos. Estes resultados sugerem que a produção de TGF- β 1 é dependente da interação da cascata de SRA, possivelmente em associação a outros mediadores inflamatórios, independente de AngII, que podem estar participando desta resposta. Novos estudos são necessários para elucidar a relação entre os componentes do SRA e a produção de TGF- β na progressão da DP.

Em resumo, no presente estudo, sugerimos que a renina sistêmica pode estar exacerbando a resposta inflamatória na DP induzida. Além disso o tratamento com Alisk foi capaz de promover um efeito protetor na resposta inflamatória e na perda óssea alveolar, podendo ser uma alternativa eficiente

no controle da DP. Verificamos também que os componentes do SRA local no tecido gengival, estão mediando o remodelamento tecidual. Finalmente, o uso de inibidores de renina, como o Alisquireno, pode ser uma nova alternativa na prevenção e severidade da DP, principalmente na presença de condições de doenças sistêmicas, visto que, na prática clínica, comumente observamos pacientes diabéticos fazendo uso de drogas anti-hipertensivas, tornando o uso deste inibidor promissor na prática odontológica, principalmente por apresentar efeitos benéficos sobre a destruição periodontal.

CONCLUSÃO

6.0 Conclusão

A renina, possivelmente sistêmica, bem como os componentes do SRA desempenham um papel importante na exacerbação da resposta inflamatória e do remodelamento tecidual na DP induzida em camundongos normoglicêmicos e principalmente em diabéticos. Finalmente, o uso de inibidores de renina, como o Alisquireno, pode ser uma nova alternativa na prevenção e severidade da DP, uma vez que, na prática clínica, comumente observamos pacientes diabéticos fazendo uso de drogas anti-hipertensivas, tornando o uso deste inibidor promissor na prática odontológica, principalmente por apresentar efeitos benéficos sobre a destruição periodontal.

REFERÊNCIAS

7.0 Referências

- Abadir, P. M., J. D. Walston, R. M. Carey and H. M. Siragy (2011). "Angiotensin II Type-2 receptors modulate inflammation through signal transducer and activator of transcription proteins 3 phosphorylation and TNF α production." J Interferon Cytokine Res **31**(6): 471-474.
- Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "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 **15**(7): 539-553.
- Alexander, L. D., Y. Ding, S. Alagarsamy and X. Cui (2014). "Angiotensin II stimulates fibronectin protein synthesis via a Gbetagamma/arachidonic acid-dependent pathway." Am J Physiol Renal Physiol **307**(3): F287-302.
- Alvarez, A., M. Cerda-Nicolas, Y. Naim Abu Nabah, M. Mata, A. C. Issekutz, J. Panes, R. R. Lobb and M. J. Sanz (2004). "Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II." Blood **104**(2): 402-408.
- Amemiya, S., T. Ishihara, K. Higashida, S. Kusano, K. Ohyama and K. Kato (1990). "Altered synthesis of renin in patients with insulin-dependent diabetes: plasma prorenin as a marker predicting the evolution of nephropathy." Diabetes Res Clin Pract **10**(2): 115-122.
- Araujo, A. A., T. O. Souza, L. M. Moura, G. A. Brito, K. S. Aragao, L. S. Araujo, C. A. Medeiros, M. S. Alves and R. F. Araujo, Jr. (2013). "Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model." J Clin Periodontol **40**(12): 1104-1111.
- Asano, K., N. Takahashi, M. Ushiki, M. Monya, F. Aihara, E. Kuboki, S. Moriyama, M. Iida, H. Kitamura, C. H. Qiu, T. Watanabe and M. Tanaka (2015). "Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes." Nat Commun **6**: 7802.
- Atkinson, M. A. and G. S. Eisenbarth (2001). "Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment." Lancet **358**(9277): 221-229.
- Atlas, S. A. (2007). "The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition." J Manag Care Pharm **13**(8 Suppl B): 9-20.
- Babel, N., G. Cherepnev, D. Babel, A. Tropmann, M. Hammer, H. D. Volk and P. Reinke (2006). "Analysis of tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , interleukin-10, IL-6, and interferon- γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis." J Periodontol **77**(12): 1978-1983.

Bagdade, J. D., R. K. Root and R. J. Bulger (1974). "Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes." Diabetes **23**(1): 9-15.

Bascones-Martinez, A., P. Matesanz-Perez, M. Escribano-Bermejo, M. A. Gonzalez-Moles, J. Bascones-Ilundain and J. H. Meurman (2011). "Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **16**(6): e722-729.

Beam, H. A., J. R. Parsons and S. S. Lin (2002). "The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus." J Orthop Res **20**(6): 1210-1216.

Beklen, A., M. Ainola, M. Hukkanen, C. Gurgan, T. Sorsa and Y. T. Konttinen (2007). "MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis." J Dent Res **86**(4): 347-351.

Benndorf, R. A., C. Krebs, B. Hirsch-Hoffmann, E. Schwedhelm, G. Cieslar, R. Schmidt-Haupt, O. M. Steinmetz, C. Meyer-Schwesinger, F. Thaiss, M. Haddad, S. Fehr, A. Heilmann, U. Helmchen, L. Hein, H. Ehmke, R. A. Stahl, R. H. Boger and U. O. Wenzel (2009). "Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice." Kidney Int **75**(10): 1039-1049.

Berggreen, E. and K. J. Heyeraas (2003). "Role of K⁺ATP channels, endothelin A receptors, and effect of angiotensin II on blood flow in oral tissues." J Dent Res **82**(1): 33-37.

Berggreen, E., H. Wiig and K. J. Heyeraas (2003). "Blood flow and interstitial fluid pressure in the rat submandibular gland during changes in perfusion." J Dent Res **82**(11): 899-902.

Berglundh, T., B. Liljenberg and J. Lindhe (2002). "Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis." J Clin Periodontol **29**(8): 705-709.

Bonato, C. F., C. C. do-Amaral, L. Belini, L. M. Salzedas and S. H. Oliveira (2012). "Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis." J Periodontal Res **47**(6): 783-792.

Branton, M. H. and J. B. Kopp (1999). "TGF-beta and fibrosis." Microbes Infect **1**(15): 1349-1365.

Brenner, B. M., M. E. Cooper, D. de Zeeuw, W. F. Keane, W. E. Mitch, H. H. Parving, G. Remuzzi, S. M. Snapinn, Z. Zhang, S. Shahinfar and R. S. Investigators (2001). "Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy." N Engl J Med **345**(12): 861-869.

Callera, G. E., T. T. Antunes, J. W. Correa, D. Moorman, A. Gutsol, Y. He, A. N. Cat, A. M. Briones, A. C. Montezano, K. D. Burns and R. M. Touyz (2016).

"Differential renal effects of candesartan at high and ultra-high doses in diabetic mice-potential role of the ACE2/AT2R/Mas axis." Biosci Rep **36**(5).

Campbell, D. J. (1987). "Circulating and tissue angiotensin systems." J Clin Invest **79**(1): 1-6.

Campbell, D. J. and J. F. Habener (1986). "Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat." J Clin Invest **78**(1): 31-39.

Carey, R. M. and H. M. Siragy (2003). "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation." Endocr Rev **24**(3): 261-271.

Cassis, L. A., S. B. Police, F. Yiannikouris and S. E. Thatcher (2008). "Local adipose tissue renin-angiotensin system." Curr Hypertens Rep **10**(2): 93-98.

Cekici, A., A. Kantarci, H. Hasturk and T. E. Van Dyke (2014). "Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease." Periodontol 2000 **64**(1): 57-80.

Chang, Y. and W. Wei (2015). "Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis." Clin Exp Immunol **179**(2): 137-145.

Chapple, C. C., M. Srivastava and N. Hunter (1998). "Failure of macrophage activation in destructive periodontal disease." J Pathol **186**(3): 281-286.

Chavarry, N. G., M. V. Vettore, C. Sansone and A. Sheiham (2009). "The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis." Oral Health Prev Dent **7**(2): 107-127.

Chen, C., C. Hemme, J. Beleno, Z. J. Shi, D. Ning, Y. Qin, Q. Tu, M. Jorgensen, Z. He, L. Wu and J. Zhou (2018). "Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy." ISME J **12**(5): 1210-1224.

Clarke, N. E. and A. J. Turner (2012). "Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade." Int J Hypertens **2012**: 307315.

Cordonnier, D. J., P. Zaoui and S. Halimi (2001). "Role of ACE inhibitors in patients with diabetes mellitus." Drugs **61**(13): 1883-1892.

Cuevas, C. A., A. A. Gonzalez, N. C. Inestrosa, C. P. Vio and M. C. Prieto (2015). "Angiotensin II increases fibronectin and collagen I through the beta-catenin-dependent signaling in mouse collecting duct cells." Am J Physiol Renal Physiol **308**(4): F358-365.

Dalla Vestra, M., N. Simioni and A. Masiero (2009). "Aliskiren: a new inhibitor of renin-angiotensin aldosterone system activity." Minerva Endocrinol **34**(4): 333-338.

Dandona, P., S. Dhindsa, H. Ghanim and A. Chaudhuri (2007). "Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade." J Hum Hypertens **21**(1): 20-27.

Darveau, R. P., G. Hajishengallis and M. A. Curtis (2012). "Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease." J Dent Res **91**(9): 816-820.

de Araujo Junior, R. F., T. O. Souza, C. A. de Medeiros, L. B. de Souza, L. Freitas Mde, H. F. de Lucena, M. do Socorro Costa Feitosa Alves and A. A. de Araujo (2013). "Carvedilol decrease IL-1beta and TNF-alpha, inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis." PLoS One **8**(7): e66391.

De Mello, W. C. (2006). "Cardiac intracrine renin angiotensin system. Part of genetic reprogramming?" Regul Pept **133**(1-3): 10-12.

de Molon, R. S., V. I. Mascarenhas, E. D. de Avila, L. S. Finoti, G. B. Toffoli, D. M. Spolidorio, R. M. Scarel-Caminaga, S. Tetradis and J. A. Cirelli (2015). "Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice." Clin Oral Investig. **20** (6), 1203–1216.

Delamaire, M., D. Maugendre, M. Moreno, M. C. Le Goff, H. Allannic and B. Genetet (1997). "Impaired leucocyte functions in diabetic patients." Diabet Med **14**(1): 29-34.

Dhande, I., W. Maand T. Hussain (2015). "Angiotensin AT2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production." Hypertens Res **38**(1): 21-29.

Diao, T. Y., H. Pan, S. S. Gu, X. Chen, F. Y. Zhang, M. S. Wong and Y. Zhang (2014). "Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes." J Bone Miner Metab **32**(3): 261-270.

Drachman, R. H., R. K. Root and W. B. Wood, Jr. (1966). "Studies on the effect of experimental nonketotic diabetes mellitus on antibacterial defense. I. Demonstration of a defect in phagocytosis." J Exp Med **124**(2): 227-240.

Eke, P. I., B. A. Dye, L. Wei, G. O. Thornton-Evans, R. J. Genco and G. D. R. P. Cdc Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (2012). "Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010." J Dent Res **91**(10): 914-920.

Faustino, S. E., D. T. Oliveira, S. Nonogaki, G. Landman, A. L. Carvalho and L. P. Kowalski (2008). "Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma." Int J Oral Maxillofac Surg **37**(4): 372-378.

Ford, C. M., S. Li and J. G. Pickering (1999). "Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(8): 1843-1851.

Frantz, E. D., C. Crespo-Mascarenhas, A. R. Barreto-Vianna, M. B. Aguilá and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2013). "Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice." PLoS One **8**(7): e67192.

Fronczyk, A., P. Moleda, K. Safranow, W. Piechota and L. Majkowska (2014). "Increased concentration of C-reactive protein in obese patients with type 2 diabetes is associated with obesity and presence of diabetes but not with macrovascular and microvascular complications or glycemic control." Inflammation **37**(2): 349-357.

Fyhrquist, F. and O. Saijonmaa (2008). "Renin-angiotensin system revisited." J Intern Med **264**(3): 224-236.

Ganten, D., A. Marquez-Julio, P. Granger, K. Hayduk, K. P. Karsunky, R. Boucher and J. Genest (1971). "Renin in dog brain." Am J Physiol **221**(6): 1733-1737.

Geerlings, S. E. and A. I. Hoepelman (1999). "Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM)." FEMS Immunol Med Microbiol **26**(3-4): 259-265.

Genco, R. J. and W. S. Borgnakke (2013). "Risk factors for periodontal disease." Periodontol 2000 **62**(1): 59-94.

Gomes, A. C., J. E. Filho and S. H. de Oliveira (2008). "MTA-induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, MIP-2, and LTB4." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **106**(3): 450-456.

Grossi, S. G. and R. J. Genco (1998). "Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship." Ann Periodontol **3**(1): 51-61.

Hajishengallis, G. (2015). "Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation." Nat Rev Immunol **15**(1): 30-44.

Hajishengallis, G., R. P. Darveau and M. A. Curtis (2012). "The keystone-pathogen hypothesis." Nat Rev Microbiol **10**(10): 717-725.

Health Quality, O. (2015). "Pancreas Islet Transplantation for Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Clinical Evidence Review." Ont Health Technol Assess Ser **15**(16): 1-84.

Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. "Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart

Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators." Lancet **355**(9200): 253-259.

Iacopino, A. M. (2001). "Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation." Ann Periodontol **6**(1): 125-137.

Itinteang, T., R. Marsh, P. F. Davis and S. T. Tan (2015). "Angiotensin II causes cellular proliferation in infantile haemangioma via angiotensin II receptor 2 activation." J Clin Pathol **68**(5): 346-350.

Joshi, N., G. M. Caputo, M. R. Weitekamp and A. W. Karchmer (1999). "Infections in patients with diabetes mellitus." N Engl J Med **341**(25): 1906-1912.

Katz, S., B. Klein, I. Elian, P. Fishman and M. Djaldetti (1983). "Phagocytotic activity of monocytes from diabetic patients." Diabetes Care **6**(5): 479-482.

Kemink, S. A., A. R. Hermus, L. M. Swinkels, J. A. Lutterman and A. G. Smals (2000). "Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology." J Endocrinol Invest **23**(5): 295-303.

Khader, Y. S., A. S. Dauod, S. S. El-Qaderi, A. Alkafajei and W. Q. Batayha (2006). "Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis." J Diabetes Complications **20**(1): 59-68.

Kim, J. J., J. Choi, M. K. Lee, K. Y. Kang, M. J. Paik, S. K. Jo, U. Jung, H. R. Park and S. T. Yee (2014). "Immunomodulatory and Antidiabetic Effects of a New Herbal Preparation (HemoHIM) on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice." Evid Based Complement Alternat Med **2014**: 461685.

Kobori, H., L. M. Harrison-Bernard and L. G. Navar (2001). "Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension." Hypertension **37**(5): 1329-1335.

Kramkowski, K., A. Mogielnicki and W. Buczko (2006). "The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production." J Physiol Pharmacol **57**(4): 529-539.

Larjava, H., M. Sandberg, R. P. Happonen and E. Vuorio (1990). "Differential localization of type I and type III procollagen messenger ribonucleic acids in inflamed periodontal and periapical connective tissues by in situ hybridization." Lab Invest **62**(1): 96-103.

Larjava, H., M. Sandberg and E. Vuorio (1989). "Altered distribution of type I collagen mRNA in periodontal disease." J Periodontal Res **24**(3): 171-177.

Lastra, G., S. Syed, L. R. Kurukulasuriya, C. Manrique and J. R. Sowers (2014). "Type 2 diabetes mellitus and hypertension: an update." Endocrinol Metab Clin North Am **43**(1): 103-122.

- Lely, A. T., P. T. Luik and G. Navis (2007). "Angiotensin I-converting enzyme: a pathogenetic role in diabetic renal damage?" Curr Diabetes Rev **3**(1): 41-52.
- Lester, S. R., J. L. Bain, R. B. Johnson and F. G. Serio (2007). "Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss." J Periodontol **78**(8): 1545-1550.
- Li, B., Y. H. Liao, X. Cheng, H. Ge, H. Guo and M. Wang (2006). "Effects of carvedilol on cardiac cytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction." Int J Cardiol **111**(2): 247-255.
- Lijnen, P. J., V. V. Petrov and R. H. Fagard (2001). "Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **2**(2): 117-122.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Llambes, F., S. Arias-Herrera and R. Caffesse (2015). "Relationship between diabetes and periodontal infection." World J Diabetes **6**(7): 927-935.
- Loe, H. (1993). "Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus." Diabetes Care **16**(1): 329-334.
- Lorencini, M., J. A. Silva, C. A. Almeida, A. Bruni-Cardoso, H. F. Carvalho and D. R. Stach-Machado (2009). "A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening." Tissue Cell **41**(1): 43-50.
- Marhoffer, W., M. Stein, E. Maeser and K. Federlin (1992). "Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes." Diabetes Care **15**(2): 256-260.
- Mascitelli, L. and F. Pezzetta (2007). "Renin-angiotensin system and cardiovascular risk." Lancet **370**(9581): 24; author reply 24-25.
- Muller, L. M., K. J. Gorter, E. Hak, W. L. Goudzwaard, F. G. Schellevis, A. I. Hoepelman and G. E. Rutten (2005). "Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus." Clin Infect Dis **41**(3): 281-288.
- Mumghamba, E. G., H. A. Markkanen and E. Honkala (1995). "Risk factors for periodontal diseases in Ilala, Tanzania." J Clin Periodontol **22**(5): 347-354.
- Nabah, Y. N., T. Mateo, R. Estelles, M. Mata, J. Zagorski, H. Sarau, J. Cortijo, E. J. Morcillo, P. J. Jose and M. J. Sanz (2004). "Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines." Circulation **110**(23): 3581-3586.

- Nazir, M. A. (2017). "Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention." Int J Health Sci (Qassim) **11**(2): 72-80.
- Negrato, C. A., O. Tarzia, L. Jovanovic and L. E. Chinellato (2013). "Periodontal disease and diabetes mellitus." J Appl Oral Sci **21**(1): 1-12.
- Nobuhiko, A., E. Suganuma, V. R. Babaev, A. Fogo, L. L. Swift, M. F. Linton, S. Fazio, I. Ichikawa and V. Kon (2004). "Angiotensin II amplifies macrophage-driven atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2143-2148.
- Ohuchi, N., K. Hayashi, K. Koike, Y. Kizawa, T. Kusama, M. Ohsawa, Y. Taniguchi, K. Iwamoto, M. Sano and H. Murakami (2004). "Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **137**(3): 281-289.
- Ohuchi, N., K. Koike, M. Sano, T. Kusama, Y. Kizawa, K. Hayashi, Y. Taniguchi, M. Ohsawa, K. Iwamoto and H. Murakami (2002). "Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **132**(4): 451-460.
- Okada, H. and S. Murakami (1998). "Cytokine expression in periodontal health and disease." Crit Rev Oral Biol Med **9**(3): 248-266.
- Palma, P. V. and I. C. Leite (2014). "Epidemiology and social inequalities of periodontal disease in Brazil." Front Public Health **2**: 203.
- Panezai, J., A. Ghaffar, M. Altamash, K. G. Sundqvist, P. E. Engstrom and A. Larsson (2017). "Correlation of serum cytokines, chemokines, growth factors and enzymes with periodontal disease parameters." PLoS One **12**(11): e0188945.
- Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." Physiol Rev **86**(3): 747-803.
- Pavlatou, M. G., G. Mastorakos, A. Margeli, E. Kouskouni, N. Tentolouris, N. Katsilambros, G. P. Chrousos and I. Papassotiropou (2011). "Angiotensin blockade in diabetic patients decreases insulin resistance-associated low-grade inflammation." Eur J Clin Invest **41**(6): 652-658.
- Peach, M. J. (1977). "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action." Physiol Rev **57**(2): 313-370.
- Peng, D., J. Wang, R. Zhang, S. Tang, F. Jiang, M. Chen, J. Yan, X. Sun, T. Wang, S. Wang, Y. Bao, C. Hu and W. Jia (2015). "C-reactive protein genetic variant is associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes." BMC Endocr Disord **15**: 8.
- Pettersson, U. S., G. Christofferson, S. Massena, D. Ahl, L. Jansson, J. Henriksnas and M. Phillipson (2011). "Increased recruitment but impaired

function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes." PLoS One **6**(7): e22480.

Piqueras, L., P. Kubes, A. Alvarez, E. O'Connor, A. C. Issekutz, J. V. Esplugues and M. J. Sanz (2000). "Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation." Circulation **102**(17): 2118-2123.

Prabhakar, S. S. (2013). "Inhibition of renin-angiotensin system: implications for diabetes control and prevention." J Investig Med **61**(3): 551-557.

Preshaw, P. M., A. L. Alba, D. Herrera, S. Jepsen, A. Konstantinidis, K. Makrilakis and R. Taylor (2012). "Periodontitis and diabetes: a two-way relationship." Diabetologia **55**(1): 21-31.

Rao, M. S. (2010). "Inhibition of the renin angiotensin aldosterone system: focus on aliskiren." J Assoc Physicians India **58**: 102-108.

Re, R. N. and J. L. Cook (2007). "Mechanisms of disease: Intracrine physiology in the cardiovascular system." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4**(10): 549-557.

Ren, M., S. Hao, C. Yang, P. Zhu, L. Chen, D. Lin, N. Li and L. Yan (2013). "Angiotensin II regulates collagen metabolism through modulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in diabetic skin tissues." Diab Vasc Dis Res **10**(5): 426-435.

Ribeiro-Oliveira, A., Jr., A. I. Nogueira, R. M. Pereira, W. W. Boas, R. A. Dos Santos and A. C. Simoes e Silva (2008). "The renin-angiotensin system and diabetes: an update." Vasc Health Risk Manag **4**(4): 787-803.

Rodrigues Prestes, T. R., N. P. Rocha, A. S. Miranda, A. L. Teixeira and E. S. A. C. Simoes (2017). "The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research." Curr Drug Targets **18**(11): 1301-1313.

Romero-Nava, R., J. E. Rodriguez, A. A. Resendiz-Albor, F. Sanchez-Munoz, A. Ruiz-Hernandez, F. Huang, E. Hong and S. Villafana (2016). "Changes in protein and gene expression of angiotensin II receptors (AT1 and AT2) in aorta of diabetic and hypertensive rats." Clin Exp Hypertens **38**(1): 56-62.

Roy, S., R. Sala, E. Cagliero and M. Lorenzi (1990). "Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 404-408.

Saadi-Thiers, K., O. Huck, P. Simonis, P. Tilly, J. E. Fabre, H. Tenenbaum and J. L. Davideau (2013). "Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and Porphyromonas gingivalis infection." J Periodontol **84**(3): 396-406.

Sadjadi, J., G. L. Kramer, C. H. Yu, M. B. Welborn, 3rd and J. G. Modrall (2005). "Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism." J Surg Res **129**(2): 272-277.

Sakuta, T., Y. Morita, M. Satoh, D. A. Fox and N. Kashihara (2010). "Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers." Arthritis Rheum **62**(5): 1319-1328.

Sandros, J., C. Karlsson, D. F. Lappin, P. N. Madianos, D. F. Kinane and P. N. Papapanou (2000). "Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection." J Dent Res **79**(10): 1808-1814.

Santos, C. F., A. E. Akashi, T. J. Dionisio, C. R. Sipert, D. N. Didier, A. S. Greene, S. H. Oliveira, H. J. Pereira, C. Becari, E. B. Oliveira and M. C. Salgado (2009). "Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue." J Periodontol **80**(1): 130-139.

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

Santos, R. A., K. B. Brosnihan, M. C. Chappell, J. Pesquero, C. L. Chernicky, L. J. Greene and C. M. Ferrario (1988). "Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem." Hypertension **11**(2 Pt 2): 1153-1157.

Santos, S. H. and A. C. Simoes e Silva (2014). "The therapeutic role of Renin-Angiotensin System blockers in obesity-related renal disorders." Curr Clin Pharmacol **9**(1): 2-9.

Schunkert, H., J. R. Ingelfinger, A. T. Hirsch, Y. Pinto, W. J. Remme, H. Jacob and V. J. Dzau (1993). "Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II." Circ Res **72**(2): 312-318.

Segawa, M., S. Nakao, Y. Ogata, H. Sugiya and S. Furuyama (2003). "Angiotensin II induces prostaglandin E(2) release in human gingival fibroblasts." Life Sci **72**(7): 795-803.

Seguier, S., G. Godeau and N. Brousse (2000). "Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis." J Periodontol **71**(7): 1079-1085.

Sernia, C. (2001). "A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system." JOP **2**(1): 50-55.

Shah, B. R. and J. E. Hux (2003). "Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes." Diabetes Care **26**(2): 510-513.

Shibukawa, Y., K. Fujinami and S. Yamashita (2012). "Clinical case report of long-term follow-up in type-2 diabetes patient with severe chronic periodontitis and nifedipine-induced gingival overgrowth." Bull Tokyo Dent Coll **53**(2): 91-99.

Shimada, K., T. Murayama, M. Yokode, T. Kita, M. Fujita and C. Kishimoto (2011). "Olmesartan, a novel angiotensin II type 1 receptor antagonist, reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice associated with reducing superoxide production." Nutr Metab Cardiovasc Dis **21**(9): 672-678.

Shoulders, M. D. and R. T. Raines (2009). "Collagen structure and stability." Annu Rev Biochem **78**: 929-958.

Sima, C. and M. Glogauer (2013). "Diabetes mellitus and periodontal diseases." Curr Diab Rep **13**(3): 445-452.

Singh, P., C. Carraher and J. E. Schwarzbauer (2010). "Assembly of fibronectin extracellular matrix." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 397-419.

Skaleric, U., B. Kramar, M. Petelin, Z. Pavlica and S. M. Wahl (1997). "Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs." Eur J Oral Sci **105**(2): 136-142.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." J Clin Periodontol **25**(2): 134-144.

Souza, P. P., S. Y. Fukada, F. Q. Cunha, C. A. Costa and C. M. Costa-Neto (2007). "Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis." Regul Pept **140**(1-2): 27-31.

Stanley, C. M., Y. Wang, S. Pal, R. J. Klebe, L. B. Harkless, X. Xu, Z. Chen and B. Steffensen (2008). "Fibronectin fragmentation is a feature of periodontal disease sites and diabetic foot and leg wounds and modifies cell behavior." J Periodontol **79**(5): 861-875.

Taiyeb-Ali, T. B., R. P. Raman and R. D. Vaithilingam (2011). "Relationship between periodontal disease and diabetes mellitus: an Asian perspective." Periodontol 2000 **56**(1): 258-268.

Takahashi, K., T. Azuma, H. Motohira, D. F. Kinane and S. Kitetsu (2005). "The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease." J Clin Periodontol **32**(4): 369-374.

Takahashi, N., T. Honda, H. Domon, T. Nakajima, K. Tabeta and K. Yamazaki (2010). "Interleukin-1 receptor-associated kinase-M in gingival epithelial cells attenuates the inflammatory response elicited by *Porphyromonas gingivalis*." J Periodontal Res **45**(4): 512-519.

Teng, Y. T. (2003). "The role of acquired immunity and periodontal disease progression." Crit Rev Oral Biol Med **14**(4): 237-252.

Tikellis, C., K. Bialkowski, J. Pete, K. Sheehy, Q. Su, C. Johnston, M. E. Cooper and M. C. Thomas (2008). "ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes." Diabetes **57**(4): 1018-1025.

Tikellis, C., R. Pickering, D. Tsorotes, X. J. Du, H. Kiriazis, T. P. Nguyen-Huu, G. A. Head, M. E. Cooper and M. C. Thomas (2012). "Interaction of diabetes and ACE2 in the pathogenesis of cardiovascular disease in experimental diabetes." Clin Sci (Lond) **123**(8): 519-529.

Tojo, A., S. Kinugasa, T. Fujita and C. S. Wilcox (2016). "A local renal renin-angiotensin system activation via renal uptake of prorenin and angiotensinogen in diabetic rats." Diabetes Metab Syndr Obes **9**: 1-10.

Tone, A., K. Shikata, D. Ogawa, S. Sasaki, R. Nagase, M. Sasaki, K. Yozai, H. K. Usui, S. Okada, J. Wada, Y. Shikata and H. Makino (2007). "Changes of gene expression profiles in macrophages stimulated by angiotensin II--angiotensin II induces MCP-2 through AT1-receptor." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **8**(1): 45-50.

Trask, A. J. and C. M. Ferrario (2007). "Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments." Cardiovasc Drug Rev **25**(2): 162-174.

Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala, M. J. Smith, V. C. Smith, T. D. Dang and D. R. Rowley (2002). "Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling." Clin Cancer Res **8**(9): 2912-2923.

Unal, H. and S. S. Karnik (2014). "Constitutive activity in the angiotensin II type 1 receptor: discovery and applications." Adv Pharmacol **70**: 155-174.

Underwood, P. C. and G. K. Adler (2013). "The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans." Curr Hypertens Rep **15**(1): 59-70.

Ustundag, B., H. Canatan, N. Cinkilinc, I. Halifeoglu and I. H. Bahcecioglu (2000). "Angiotensin converting enzyme (ACE) activity levels in insulin-independent diabetes mellitus and effect of ACE levels on diabetic patients with nephropathy." Cell Biochem Funct **18**(1): 23-28.

Wagner, J., F. Gehlen, A. Ciechanowicz and E. Ritz (1999). "Angiotensin II receptor type 1 gene expression in human glomerulonephritis and diabetes mellitus." J Am Soc Nephrol **10**(3): 545-551.

Wang, T. N., X. Chen, R. Li, B. Gao, Z. Mohammed-Ali, C. Lu, V. Yum, J. G. Dickhout and J. C. Krepinsky (2015). "SREBP-1 Mediates Angiotensin II-Induced TGF-beta1 Upregulation and Glomerular Fibrosis." J Am Soc Nephrol **26**(8): 1839-1854.

- Wu, Y. Y., E. Xiao and D. T. Graves (2015). "Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease." Int J Oral Sci **7**(2): 63-72.
- Xiong, X., L. D. Saunders, F. L. Wang and N. N. Demianczuk (2001). "Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes." Int J Gynaecol Obstet **75**(3): 221-228.
- Xue, B., Y. Yu, Z. Zhang, F. Guo, T. G. Beltz, R. L. Thunhorst, R. B. Felder and A. K. Johnson (2016). "Leptin Mediates High-Fat Diet Sensitization of Angiotensin II-Elicited Hypertension by Upregulating the Brain Renin-Angiotensin System and Inflammation." Hypertension **67**(5): 970-976.
- Ye, Y., J. Qian, A. C. Castillo, J. R. Perez-Polo and Y. Birnbaum (2011). "Aliskiren and Valsartan reduce myocardial AT1 receptor expression and limit myocardial infarct size in diabetic mice." Cardiovasc Drugs Ther **25**(6): 505-515.
- Yu, L. Z. and C. R. Shi (2014). "[Effect of tanshinone II(A) on expression of different components in renin-angiotensin system of left ventricles of hypertensive rats]." Zhongguo Zhong Yao Za Zhi **39**(8): 1468-1472.
- Zablocki, D. and J. Sadoshima (2013). "Angiotensin II and oxidative stress in the failing heart." Antioxid Redox Signal **19**(10): 1095-1109.
- Zenobia, C., X. L. Luo, A. Hashim, T. Abe, L. Jin, Y. Chang, Z. C. Jin, J. X. Sun, G. Hajishengallis, M. A. Curtis and R. P. Darveau (2013). "Commensal bacteria-dependent select expression of CXCL2 contributes to periodontal tissue homeostasis." Cell Microbiol **15**(8): 1419-1426.
- Zhang, J., H. Y. Qu, J. Song, J. Wei, S. Jiang, L. Wang, L. Wang, J. Buggs and R. Liu (2017). "Enhanced hemodynamic responses to angiotensin II in diabetes are associated with increased expression and activity of AT1 receptors in the afferent arteriole." Physiol Genomics **49**(10): 531-540.