



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

THAIS FRANCINI GARBIERI

**Investigação da modulação da resposta inflamatória em células
orais humanas por Angiotensina II**

BAURU

2021

THAIS FRANCINI GARBIERI

**Investigação da modulação da resposta inflamatória em células
orais humanas por Angiotensina II**

Tese de doutoramento em regime de cotutela entre a Universidade do Porto e a Universidade de São Paulo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração: Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia e à Faculdade de Medicina Dentária para obtenção do título de Doutor em Medicina Dentária.

Orientador do Brasil: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

Orientadora de Portugal: Profa. Dra. Maria Helena Raposo Fernandes.

BAURU

2021

Garbieri, Thais Francini

Investigação da modulação da resposta inflamatória em células orais humanas por Angiotensina II / Thais Francini Garbieri -- Bauru, 2021.

128p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e Profa. Dra. Maria Helena Raposo Fernandes.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: CAAE 77365617.3.0000.5417
Data: 21 de fevereiro de 2018

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico à minha querida avó, **Virginia Lata Garbieri** (*in memoriam*).

Dedico também aos meus orientadores e a todos os amigos, familiares e profissionais que cruzaram meu caminho e que, de alguma forma, participaram desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos, pelas pessoas que coloca em meu caminho e pelas oportunidades de aprendizado que me permite viver.

Ao meu orientador do Brasil, **Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, por quem tenho imensa admiração e apreço. Obrigada por acreditar em mim e apoiar meus sonhos. Ao senhor, minha eterna gratidão! Jamais esquecerei de tudo o que me ensinou. E foi durante o doutorado também, que tive a honra de dividir a bancada com o senhor e acompanhar, lado a lado, a maestria de suas mãos na execução e condução de experimentos. Faltam-me palavras para expressar o tamanho de minha gratidão e admiração pelo senhor! Obrigada querido Professor, que Deus continue abençoando sua vida e seus planos, e que o senhor siga transformando vidas. Muito obrigada de todo o meu coração!

À minha orientadora de Portugal, **Dra. Maria Helena Raposo Fernandes**, a qual eu admiro e tenho imensa gratidão! Obrigada pelo carinho que me recebeu, e por todo cuidado que teve comigo no momento em que estive a enfrentar um dos maiores desafios da minha vida. A imensidão de seu conhecimento vai além do que sou capaz de expressar! A senhora me ensinou mais do que fazer ciência, ensinou-me sobre a vida e me fez sentir em família! À senhora, minha eterna gratidão de todo o meu coração!

Ao **Dr. Thiago José Dionísio**, pessoa e profissional que admiro tanto! Obrigada por todo o conhecimento que dividiu comigo e por acreditar na qualidade do meu trabalho. Obrigada também pelos conselhos profissionais, pelo incentivo, por toda a contribuição neste estudo e em minha vida. Que Deus abençoe sua vida, sua família e sua caminhada. Muito obrigada!

À querida **Dra. Bella Luna Colombini-Ishikiriama**, que foi minha companheira nesta jornada! O meu muito obrigada por tudo que contribuiu neste trabalho, por todo conhecimento que dividiu comigo, como pesquisadora, professora e amiga. Obrigada por ser luz, aconchego e alegria. Te agradeço de todo coração! Saiba que essa amizade e os dias ao seu lado estarão sempre nas minhas melhores lembranças. Que Deus abençoe sua vida, sua família e todos os seus caminhos!

À “**Família Farmaco**” da **FOB-USP**! Agradeço imensamente todo apoio e carinho de cada um de vocês em meus dias de Doutoranda. Obrigada queridas amigas **Thaís Bernardes de Queiroz, Gabriela de Moraes Oliveira, Isadora Prado Cano e Giovana Maria Weckwerth** por proporcionarem tanta alegria aos meus dias e por serem luz nos momentos difíceis. Obrigada também, **Maria Carolina, Carolina e Flávia** pela amizade. Aos Professores **Dr. Flávio Augusto de Faria, Dra. Adriana Maria Calvo e Dra. Lucimara Teixeira da Neves**, pessoas e profissionais que eu tanto admiro e sou grata por terem cruzado meu caminho. E aos queridos funcionários **Dra. Marina, Dra. Elza e Viviane**. Muito obrigada!

Aos amigos da FOB, em especial a **Cintia Kazuko Tokuhara**, com quem sempre foi tão bom conversar e dividir as experiências da Pós-Graduação! Também aos queridos **Rafael Ortiz, Karen Pinke, Nádia Amôr e Nathália Lopes**. E também aos funcionários **Thelma, Patrícia, Alexandre e Teresa**. Vocês são especiais!

Ao CIP e a seus funcionários **Dra. Márcia Graeff, Marcelo Milanda** e em especial a **Dra. Rafaela Alves Silva** por todo conhecimento compartilhado e aos cursos que fizemos juntas, obrigada!

Aos colegas que conheci e convivi no **Bonelab**. Obrigada **dona Glória, Maria Gomes, Carla Baptista, Wanderson, Lorena, Victor, Luísa, Laura, Rita, Nataly, João Victor e Mariana**, por tudo o que vivi com cada um de vocês. E um agradecimento especial ao **Prof. Dr. Pedro de Sousa Gomes** pela confiança e ensinamentos. À querida **Dra. Liliana Grenho**, por quem tenho imenso carinho e gratidão! Obrigada por ter feito meus dias em Portugal mais felizes desde o primeiro momento. E à querida **Delfina Alves e sua família**, que trouxeram alegria e aconchego para os meus dias longe de casa.

Aos amigos **Débora Foger, Inês e Manuel** por toda alegria e ajuda que me proporcionaram. À prima **Priscila**, quem fez o final de ano ser mais feliz. À querida **Rita**, de coração tão doce e gentil, junto de quem senti como se estivesse na presença de uma irmã.

Aos **participantes desta pesquisa**, obrigada por aceitarem participar e contribuir com este trabalho e com o desenvolvimento da ciência.

Aos meus pais **Luiz Antônio e Julineide** e também ao **Eduardo e Débora**, todo meu amor e gratidão a vocês!

Ao meu querido irmão **João Garbieri**, quem eu sempre posso contar, obrigada por ser tão especial!

Ao meu amado marido, **Alexandre Miazaki**, o qual sempre apoiou todas as minhas escolhas e ofereceu suporte, carinho e compreensão. Obrigada por ser meu companheiro de vida, apoiar meus sonhos e pela nossa família! Te amo e admiro muito! A você, todo meu carinho, amor e gratidão!

A **todos os meus familiares**, que sempre estão presentes e tornam a caminhada mais feliz. Obrigada **Dete e Leu**, por serem tão especiais em minha vida! Obrigada por tudo o que sempre fizeram por mim e por acreditarem que eu seria capaz de enfrentar tudo que enfrentei até aqui!

E um enorme agradecimento a minha querida avó **Virginia Lata Garbieri**, meu porto seguro, quem nunca me desamparou em nenhum momento! Obrigada por ser luz, força, fé, amor e alegria. A senhora me quis voando e fui voar, mas o adeus dessa vida, foi de repente e de uma maneira que jamais imaginei! É algo que teremos de lidar, pois tudo tem um propósito. A saudade da senhora é grande, mas a gratidão e o amor são os maiores do mundo!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de financiamento 001.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) (Processos número: 2017/19227-6 e 2018/23934-2), que contribuíram em momentos distintos, sendo bolsa no país e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. E também ao Processo número 2015/03965-2 do Projeto Temático, ao qual está vinculado o presente Projeto. Muito obrigada!

Ao **Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)** pela oportunidade de aprendizado em assuntos relacionados à Universidade, ao ensino superior e à docência, que contribuíram de maneira valiosa para minha formação.

Ao **Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S)**, da Universidade do Porto, pelas oportunidades e aprendizado que enriqueceram minha estadia em Portugal, bem como aos colegas que lá fiz. Obrigada!

À **Universidade de São Paulo (USP)** e aos seus **funcionários**, em especial à **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB)** e à **Pós-Graduação**, e a todos que me auxiliaram de maneira singular em todas as etapas deste processo. Em especial às queridas **Dalva, Ana Letícia e Edna**, as quais sempre estiveram dispostas a ajudar e exercerem seu trabalho com extremo zelo e dedicação. Também gostaria de agradecer aos funcionários que me deram suporte e apoio na elaboração e nos trâmites do Acordo de Doutorado em Regime de Cotutela Internacional com a Universidade do Porto, a **Pró Reitoria de Pós-Graduação (PRPG)**, em especial ao Professor **Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara** ao Pró-Reitor de Pós-Graduação **Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior**. O meu mais sincero agradecimento a todos!

À **Universidade do Porto (UP)**, à **Reitoria da Universidade do Porto** e à **Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP)** por terem me recebido e contribuído de maneira tão importante na minha formação. Os dias que lá estive foram de muito aprendizado profissional, pessoal e cultural. Obrigada a todos os funcionários, em especial ao senhor Diretor **Dr. Miguel Pinto**, a **Dra. Carla Pinto**, ao senhor **Manuel** e aos queridos **funcionários da cantina**, que tornaram o horário do lanche sempre muito agradável. O meu muito obrigada a todos!

*“Somewhere,
something incredible is
waiting to be known”.*

Carl Sagan

RESUMO

Além da capacidade de regular, de maneira sistêmica, diversas funções essenciais do organismo, como as relacionadas à pressão sanguínea e à homeostase cardiovascular, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) tem sido relatado como um importante imunomodulador de atuação local, em diferentes tecidos. Seus componentes podem exercer atividades pró ou anti-inflamatórias, colaborando com a recuperação do tecido lesionado ou com a manutenção e evolução da inflamação, ocasionando danos teciduais. O fibroblasto é o tipo celular mais abundante do tecido conjuntivo que, dentre outras funções, atuam como sentinela, sendo capazes de expressar diversos mediadores inflamatórios na presença de diferentes estímulos. A hipótese do presente estudo foi que a Angiotensina II (Ang II), uma vez ligada aos seus receptores AT1 em células orais humanas, seria capaz de promover a liberação de mediadores inflamatórios, colaborando com o estabelecimento e/ou manutenção do processo inflamatório local. Por outro lado, a Ang II, ligada aos receptores AT2, atuaria de maneira oposta às características citadas sobre os receptores AT1. Sendo assim, para melhor compreender o papel da Ang II nas doenças inflamatórias orais, este trabalho teve como objetivo investigar, *in vitro*, o potencial pró-inflamatório e/ou anti-inflamatório da Ang II em culturas primárias de fibroblastos orais humanos, após interação com os receptores AT1 e AT2 em condições basais e após pré-estímulo com interleucina 1 β (IL1 β). Culturas primárias de fibroblastos foram obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária (n = 3) e foram caracterizados pela análise morfológica e expressão de FSP (*fibroblast surface protein*) por imunofluorescência (IF). Citotoxicidade e viabilidade celular foi verificada pelo ensaio AlamaBlue[®]. A expressão gênica relativa foi investigada por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) precedida da Transcrição Reversa (RT), após estímulos com Ang II, IL1 β e drogas antagonistas dos receptores AT1 (valsartan) e AT2 (PD123319). A imunofenotipagem dos receptores AT1 e AT2 foi verificada por citometria de fluxo em situações basais de cultivo e após estímulo com IL1 β . Estímulo com Ang II por 24h, não foi capaz de modular a expressão de mediadores inflamatórios em nenhum dos tipos celulares. Em tempos menores de estímulo, as células responderam para alguns mediadores (P<0,05), entretanto, os bloqueadores não foram capazes de antagonizar as respostas observadas. Quando as células

receberam a IL1 β por 24h antes da Ang II, e foi mantida por mais 3, 6 e 24h, não se observou efeito aditivo ou sinérgico entre estas moléculas. Tanto o receptor AT1, quanto AT2 foram detectados por citometria de fluxo. Os resultados deste estudo sugerem que, nas condições experimentais adotadas, os fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária não demonstraram um papel importante no estabelecimento e/ou manutenção do processo inflamatório local, frente ao estímulo com Ang II.

Palavras-chave: Sistema Renina-Angiotensina. Angiotensina II. Receptores de Angiotensina. Antagonistas de Receptores de Angiotensina. Cultura Primária de Células. Fibroblastos. Humanos. Biologia Molecular.

ABSTRACT

Investigation of the modulation of the inflammatory response in human oral cells by Angiotensin II

In addition to the ability to regulate, in a systemic manner, several essential functions of the body, such as those related to blood pressure and cardiovascular homeostasis, the Renin-Angiotensin System (RAS) has been reported as an important immunomodulator of local action in different tissues. Its components can exert pro or anti-inflammatory activities, collaborating with recovery of injured tissue or with the maintenance and evolution of inflammation, causing tissue damage. Fibroblast is the most abundant cellular type of connective tissue, which, among other functions, acts as a sentinel, being able to express several inflammatory mediators in the presence of different stimuli. The hypothesis of the present study was that Angiotensin II (Ang II), once bound to AT1 receptors in human oral cells, would be able to promote the release inflammatory mediators, helping to establish and/or maintain the local inflammatory process. On the other hand, Ang II, linked to AT2 receptors, would act in the opposite way to the characteristics mentioned about AT1 receptors. Therefore, to better understand the role of Ang II in oral inflammatory diseases, this study aimed to investigate, in vitro, the pro-inflammatory and/or anti-inflammatory potential of Ang II in primary cultures of human oral fibroblasts, after interaction with AT1 and AT2 receptors under baseline conditions and after pre-stimulation with interleukin 1 β (IL1 β). Primary cultures of fibroblasts were obtained from explants of gingiva, periodontal ligament and dental pulp (n = 3) and were characterized by morphological analysis and expression of FSP (fibroblast surface protein) by immunofluorescence (IF). Cytotoxicity and cell viability was verified by the AlamaBlue[®] assay. The relative gene expression was investigated by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) preceded by Reverse Transcription (RT), after stimuli with Ang II, IL1 β and AT1 (valsartan) and AT2 receptor antagonist drugs (PD123319). The immunophenotyping of AT1 and AT2 receptors was verified by flow cytometry in baseline culture situations and after stimulation with IL1 β . Stimulus with Ang II for 24h, was not able to modulate the expression of inflammatory mediators in any of the cell types. In shorter times of stimulus, the cells responded to some mediators (P <0.05), however, the blockers were not able to antagonize the observed responses. When the cells received IL1 β for 24h before Ang II, and was

maintained for another 3, 6 and 24h, there was no additive or synergistic effect between these molecules. Both the AT1 and AT2 receptors were detected by flow cytometry. The results of this study suggest that, in the experimental conditions adopted, the gingival, periodontal ligament and dental pulp fibroblasts did not demonstrate an important role in the establishment and/or maintenance of the local inflammatory process, when stimulated with Ang II.

Keywords: Renin-Angiotensin System. Angiotensin II. Receptors, Angiotensin. Angiotensin Receptor Antagonists. Primary Cell Culture. Fibroblasts. Humans. Molecular Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática do SRA.....	24
Figura 2:	Esquema experimental com estímulo adicional de IL1 β	45
Figura 3:	Estabelecimento de cultura de primária de células orais obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária, do participante da pesquisa de número 1.....	49
Figura 4:	Estabelecimento de cultura de primária de células orais obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária do participante da pesquisa de número 2.....	50
Figura 5:	Estabelecimento de cultura de primária de células orais obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária do participante da pesquisa de número 3.....	50
Figura 6:	Detecção da expressão de <i>Fibroblast Surface Protein</i> (FSP) em células oriundas da gengiva, do LP e da polpa dentária, por meio de imunofluorescência.....	51
Figura 7:	Porcentagem da viabilidade celular das células orais, após adição de 10 ⁻⁵ M e 10 ⁻⁶ M de Ang II pelo período de 24h comparadas ao grupo não estimulado (controle sem estímulo) por meio do ensaio AlamarBlue®.....	52
Figura 8:	Porcentagem da viabilidade celular das células orais, após adição de diferentes concentrações dos fármacos bloqueadores dos receptores AT1 (valsartan) e AT2 (PD123319), pelo período de 1h, por meio do ensaio AlamarBlue®.....	53
Figura 9:	Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas de gengiva, após estímulo com Ang II a 10 ⁻⁶ M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo).....	55

Figura 10: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas do ligamento periodontal, após estímulo com Ang II a 10 ⁻⁶ M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo).	56
Figura 11: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da polpa dentária, após estímulo com Ang II a 10 ⁻⁶ M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo).....	57
Figura 12: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da gengiva, após estímulo com Ang II a 10 ⁻⁶ M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo) previamente ou não tratadas com os antagonistas Valsartan (Val) e PD123319 (PD) por 1h.	59
Figura 13: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas do ligamento periodontal, após estímulo com Ang II a 10 ⁻⁶ M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo) previamente ou não tratadas com os antagonistas Valsartan (Val) e PD123319 (PD) por 1h.....	60
Figura 14: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da polpa dentária, após estímulo com Ang II a 10 ⁻⁶ M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo) previamente ou não tratadas com os antagonistas Valsartan (Val) e PD123319 (PD) por 1h.....	61

Figura 15: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da gengiva, após estímulo com 0,1ng/mL de IL1 β isolado ou seguido da Ang II a 10 ⁻⁶ M comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo).....	63
Figura 16: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas do ligamento periodontal, após estímulo com 0,1ng/mL de IL1 β isolado ou seguido da Ang II a 10 ⁻⁶ M comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo).....	64
Figura 17: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da polpa dentária, após estímulo com 0,1ng/mL de IL1 β isolado ou seguido da Ang II a 10 ⁻⁶ M comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo).....	65
Figura 18: Imagem representativa das estratégias para determinação das células marcadas a partir das não marcadas.	66
Figura 19: Imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 da Ang II em células da gengiva dos participantes da pesquisa 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E e F) em condições basais de cultivo, obtidas após análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter.	67
Figura 20: Imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 da Ang II em células do ligamento periodontal dos participantes da pesquisa 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E e F) em condições basais de cultivo, obtidas após análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter.....	68
Figura 21: Imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 da Ang II em células da polpa dentária dos participantes da pesquisa 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E e F) em condições basais de cultivo, obtidas após análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter.....	69

Figura 22:	Esquema da metodologia realizada para avaliar o efeito da Ang II e da Ang 1-7 no comportamento de monoculturas das linhagens osteoblásticas deste estudo.	90
Figura 23:	Esquema do modelo de co-cultura indireta utilizado.	91
Figura 24:	Representação gráfica do ensaio MTT.....	93
Figura 25:	Representação gráfica da atividade de ALP.....	94
Figura 26:	Microscopia de fluorescência das MG-63 em meio basal e osteogênico e das Saos-2 em meio basal, após imunomarcagem do citoesqueleto em verde (AlexaFluor ® 488 green – 1:100 em 1% BSA) e núcleo celular em azul (Hoechst). Barra representativa de 100µm.....	94
Figura 27:	Representação gráfica da expressão gênica dos componentes do SRA pelas linhagens celulares osteoblásticas.	96
Figura 28:	Representação gráfica da expressão gênica dos marcadores osteoblásticos pelas linhagens celulares osteoblásticas.	97
Figura 29:	Imagens representativas das culturas de THP-1, previamente diferenciadas em macrófagos, e mantidas em co-cultura indireta com MG-63 cultivadas em meio osteogênico, na presença ou ausência (sem estímulo) de Ang II ou Ang 1-7 (10^{-6} M). Imagens obtidas em microscópio invertido.....	98
Figura 30:	Imagens representativas das culturas de THP-1, previamente diferenciadas em macrófagos, e mantidas em co-cultura indireta com MG-63 cultivadas em meio osteogênico, na presença ou ausência (sem estímulo) de Ang II ou Ang 1-7 (10^{-6} M). Imagens obtidas em microscópio invertido.....	99
Figura 31:	Representação gráfica da atividade de ALP.....	100
Figura 32:	Representação gráfica da atividade da TRAP.....	100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Identificação e código dos ensaios TaqMan® utilizados nos experimentos de RT-qPCR desta pesquisa..... 43
- Tabela 2:** Fármacos bloqueadores dos receptores AT1 e AT2 da Ang II, a concentração selecionada para este trabalho e outros trabalhos da literatura científica que também as utilizaram..... 53
- Tabela 3:** Média geométrica da intensidade de fluorescência da imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 nas células orais..... 70
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ang 1	Angiotensina I Ang 1
Ang II	Angiotensina I Ang II
AGT	Angiotensinogênio
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCL3	<i>C-C motif chemokine ligand 3</i>
CXCL8	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>
COL1	colágeno tipo 1
CT	<i>Cicle threshold</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase - 2</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
cDNA	DNA complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FSP	<i>Fibroblast Surface Protein</i>
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
ALP	Fosfatase alcalina
IF	Imunofluorescência
ICAM-1	<i>Intercellular cell adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LAFFIC	Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B
LPS	Lipolissacarídeo
MIP1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
Min	Minutos
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
OPG	Osteoprotegerina
PAMP	Padrões de moléculas associadas a patógenos
PD	PD123319
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
mRNA	RNA mensageiro
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
SFB	Soro fetal bovino
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
RT	Transcrição reversa
TGF	<i>Transforming growth fator</i>
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i>
Val	Valsartan
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA) SISTÊMICO E LOCAL ...	23
1.2	O SRA RELACIONADO ÀS DOENÇAS	26
1.3	ATUAÇÃO DO SRA NA MODULAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM TECIDOS ORAIS.....	29
1.4	FIBROBLASTOS ORAIS	29
2	PROPOSIÇÃO.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO	37
3.2	ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA DAS CÉLULAS ORAIS.....	38
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ORAIS HUMANAS	39
3.4	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR.....	40
3.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	41
3.5.1	Extração do RNA total	42
3.5.2	Quantificação e análise da qualidade do RNA total obtido	42
3.5.3	Normalização da quantidade de RNA obtido e transcrição reversa (RT).....	42
3.5.4	Análise por Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	42
3.6	IMUNOFENOTIPAGEM DOS RECEPTORES AT1 E AT2 DA ANG II	44
3.7	EFEITO DA IL1 β SOBRE A EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DOS RECEPTORES AT1 E AT2 E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	45
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS	49
4.1	CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS ORAIS HUMANAS.....	49
4.2	IMUNOMARCAÇÃO PARA FSP.....	51
4.3	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR.....	52
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	54
4.4.1	Expressão gênica de mediadores inflamatórios após estímulo com Ang II	54

4.4.2	Bloqueio farmacológico dos receptores AT1 e AT2 previamente ao estímulo com Ang II	58
4.4.3	Estímulo com IL1 β previamente ao estímulo com Ang II	62
4.5	IMUNOFENOTIPAGEM DOS RECEPTORES AT1 E AT2	66
4.5.1	Expressão dos receptores AT1 e AT2 após estímulo com IL-1 β	70
5	DISCUSSÃO	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7	COTUTELA	85
7.1	INTRODUÇÃO.....	85
7.2	OBJETIVOS.....	87
7.3	MATERIAIS E MÉTODOS	87
7.3.1	Linhagens celulares	87
7.3.2	Otimização das condições experimentais de cultura	87
7.3.3	Caracterização das linhagens osteoblásticas e osteoclasticas.....	88
7.3.3.1	Ensaio MTT	88
7.3.3.2	Quantificação da proteína total	88
7.3.3.3	Atividade da ALP	88
7.3.3.4	Imunomarcção de citoesqueleto e núcleo celular	89
7.3.3.5	Atividade da TRAP.....	89
7.3.4	Ang II e Ang 1-7 nas monoculturas osteoblásticas	89
7.3.5	Análise de expressão gênica por RT- qPCR dos componentes do SRA e marcadores osteoblásticos	90
7.3.6	Co-cultura inditera de osteoblastos e osteoclastos humanos	91
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
7.4.1	Caracterização do efeito da Ang II e Ang 1-7 nas monoculturas osteoblásticas	93
7.4.2	Análise de expressão gênica por qPCR dos componentes do SRA e marcadores osteoblásticos	95
7.4.3	Co-cultura inditera de osteoblastos e osteoclastos humanos	98
7.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXOS	115

1

Introdução e Revisão de Literatura

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA) SISTÊMICO E LOCAL

O SRA é um sistema endócrino, formado por peptídeos, enzimas e receptores, responsável, dentre outras funções, pela liberação de Angiotensina II (Ang II), uma molécula que exerce suas funções por meio da interação com receptores específicos, nos tecidos alvo (PEACH, 1977; SALDANHA DA SILVA et al., 2017).

Suas principais funções estão relacionadas a regulação da pressão sanguínea, vasoconstrição, ingestão de sódio e excreção de potássio, no entanto, outras funções têm sido atribuídas ao SRA, principalmente à sua principal molécula efetora a Ang II, tais quais, efeito vasoconstritor e estimulatório sobre a secreção de aldosterona e ação cronotrópica e inotrópica positiva sobre o coração, além de funções pró-inflamatórias e pró-fibróticas (contribui para a deterioração progressiva da função do órgão na doença), com implicações na inflamação, autoimunidade e envelhecimento (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; PEACH, 1977).

O processo de formação da Ang II inicia com a síntese da renina, nos rins, que é liberada na circulação e atua clivando o angiotensinogênio (AGT), liberado pelo fígado, produzindo o decapeptídeo Angiotensina I (Ang 1) ou Ang 1-10 (Asp¹, Arg², Val³, Tyr⁴, Ile⁵, His⁶, Pro⁷, Phe⁸, His⁹, Leu¹⁰), que por sua vez, é convertida no octapeptídeo Ang II ou Ang 1-8 (Asp¹, Arg², Val³, Tyr⁴, Ile⁵, His⁶, Pro⁷, Phe⁸) por meio da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Além da ECA, outras enzimas estão relacionadas com a formação de Ang II, como a elastase-2 (SANTOS et al., 2002, 2003) e a quimase (TAKAI et al., 2004).

As funções da Ang II são exercidas via receptores AT1 e AT2. Ambos são classificados como receptores de membrana acoplados a proteína G (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010) e possuem, em princípio, ações opostas, no entanto, a relevância clínica ainda não foi bem estabelecida (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Ao interagir com o receptor AT1, a Ang II é capaz de provocar: vasoconstrição, hipertensão, diminuição do fluxo renal e aumento da atividade noradrenérgica

periférica e regular mecanismos de fibrose, crescimento e migração celular. Já a interação com o receptor AT2 ocasiona efeitos opostos, tais quais: vasodilatação, inibição da proliferação, crescimento celular e modulação da matriz extracelular (SKRBIC; IGIC, 2009). Tanto o receptor AT1, quanto o AT2, estão envolvidos na ativação do NF-κB pela Ang II, entretanto, não está totalmente caracterizado, o processo biológico pelo qual cada receptor medeia esse processo (ALIQUE et al., 2015).

Ao longo do tempo, a visão mais simplificada do SRA, que também é considerada clássica, vêm sofrendo expansão e continuamente aumentando sua complexidade por meio de diversos estudos, o que pode ser observado na **Figura 1** (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; SANTOS et al., 2015). Além disso, SRA locais em tecidos e inclusive a produção intracelular de Ang II, tem sido evidenciada, expandindo o conhecimento em relação ao SRA, e atribuindo a ele, além das funções endócrinas, funções parácrinas (nas células vizinhas) e intracrininas também (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

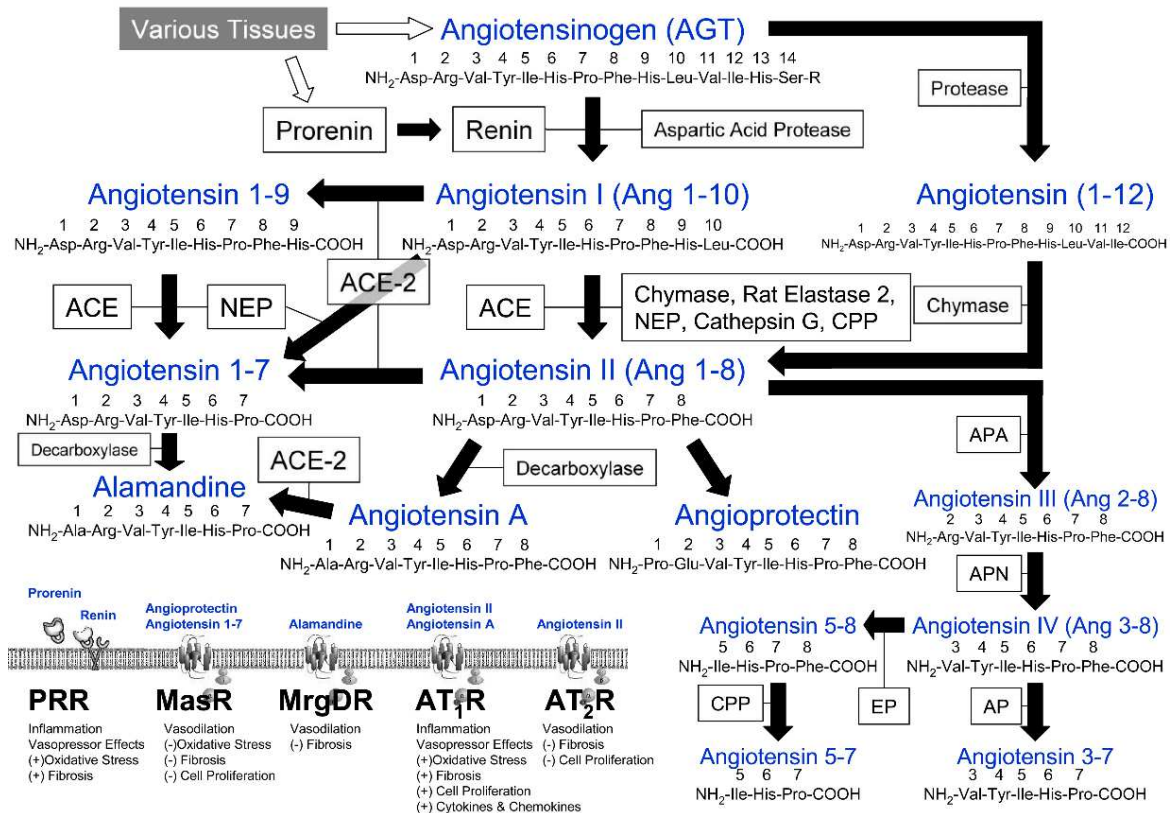


Figura 1 - Representação esquemática do SRA.

Fonte: SANTOS et al., (2015).

O SRA local, tem sido identificado em diversos órgãos e tecidos, contendo, inclusive, todos os componentes necessários para a produção de Ang II, outros peptídeos de angiotensinas e seus respectivos receptores (GABRIELE et al., 2017; SANTOS et al., 2009, 2015). Dentre as diversas ações que podem exercer, nos diferentes tecidos, o SRA local pode operar de maneira independente do SRA sistêmico ou de maneira complementar a ele, sendo que, os componentes do SRA sistêmico podem ainda ser absorvidos pelos tecidos (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Enquanto o SRA sistêmico é principalmente caracterizado por ser um sistema regulador do balanço eletrolítico e da pressão sanguínea, estudos recentes indicam, que as ações do SRA local, estão envolvidas com a proliferação e o crescimento celular, com a síntese proteica e com funções fisiológicas dos órgãos e tecidos (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006), além de ter um papel importante como modulador das respostas inflamatórias (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; GABRIELE et al., 2017).

Ohuchi et al. (2004) elucidaram a presença de ambos receptores da Ang II (AT1 e AT2) em fibroblastos de coelhos em cultura, pela técnica de *western blot*, e adicionalmente, atribuíram ao receptor AT1 a função proliferativa da Ang II, neste mesmo tipo celular. Souza et al. (2007), verificaram a modulação dos receptores AT1 e AT2 na inflamação pulpar, em dentes de ratos. Em células mesangiais de ratos, a aldosterona foi capaz de aumentar significativamente os níveis dos receptores AT1a e AT2, de maneira dose-dependente (HAO et al., 2015). Santos et al. (2009) mostraram a existência de um SRA local tecidual em gengiva de ratos, por meio da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para componentes do SRA (AGT, renina, receptor AT1, receptor AT2 e ECA). Além disso, os homogenatos deste tecido, incubados com diferentes precursores de Ang II, gerou a própria Ang II e outros peptídeos vasoativos, *in vitro*. mRNA e a proteína do receptor AT1, foram identificados em fibroblastos de gengiva humana, por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e *western blot* (NAKAMURA et al., 2011). A presença do receptor AT1 e outros componentes do SRA, foi identificada em tecidos orais humanos, tanto em homogenatos de gengiva, quanto em culturas primárias de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal, sendo que, estes fibroblastos cultivados, apresentaram expressão de mRNA para: AGT, ECA, ECA-2, receptor AT1, receptor MAS e renina, além disso, também apresentaram imunoreatividade fluorescente para a presença de receptor AT1 e MAS (SANTOS et al., 2015)

1.2 O SRA RELACIONADO ÀS DOENÇAS

Diversos agentes farmacológicos foram sintetizados e aplicados na prática médica, para minimizar a biossíntese e antagonizar as respostas biológicas da Ang II, gerada de maneira endógena (SKRBIC; IGIC, 2009), tais como os inibidores da ECA, os antagonistas dos receptores AT1 e o inibidores da enzima renina. Para doenças cardiovasculares, por exemplo, a importância do SRA, tem sido demonstrada por meio de benefícios clínicos, atingidos pela utilização de inibidores de ECA e bloqueadores de receptor AT1 (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

O envolvimento do SRA na inflamação, tem sido cada vez mais investigado, sendo que, suas moléculas têm demonstrado envolvimento na síntese de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, em diversos tipos celulares (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; MEZZANO; RUIZ-ORTEGA; EGIDO, 2001). As citocinas, são mediadores necessários para a condução da resposta inflamatória, aos locais de lesão e infecção e podem ter ações pró-inflamatórias (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), favorecendo ou atenuando a resposta. Sendo assim, uma lesão pode caminhar para a cicatrização, ou, em caso da produção exacerbada e persistente de citocinas Th1, podem ocasionar danos no tecido alvo. Elas atuam por mecanismos parácrinos e autócrinos, além de regular a produção e atividade de outras citocinas, também influenciam na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células do sistema imune (OLIVEIRA et al., 2011). Diferentes estímulos são capazes de desencadear a produção de citocinas, e estas, por sua vez, são capazes de estimular uma série de respostas, em células relacionadas a imunidade e inflamação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A interleucina (IL) 1 β , é uma importante citocina derivada de macrófagos, que possui a capacidade de regular processos imunoinflamatórios, por meio da ativação de vias intracelulares compartilhadas com Ang II, incluindo o *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) (ALIQUE et al., 2015).

De acordo com as funções que desempenham, *in vivo*, podem ser divididas em pró ou anti-inflamatórias, hematopoiéticas, mitogênicas e quimiotáticas (sendo denominadas quimiocinas) (NEDOSZYTKO et al., 2014). As quimiocinas inflamatórias, são citocinas que tem como função principal, o recrutamento de leucócitos, desempenhando, portanto, um papel importante na inflamação e dano tecidual (BROUTY-BOYÉ et al., 2000; DESHMANE et al., 2009). A *C-X-C motif*

chemokine ligand 8 (CXCL8) ou IL8, é um exemplo de quimiocina que possui grande importância no processo inflamatório, devido a sua capacidade de atrair neutrófilos para o local da inflamação (MORANDINI et al., 2013a; SIPERT et al., 2010). Ela atua após ligação em seus receptores, CXCR1 e CXCR2 (DESHMANE et al., 2009). Outra quimiocina de grande importância, é a *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2) ou *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1), que pode ser produzida por uma variedade de células, e que possui um potente fator quimiotático de monócitos (DESHMANE et al., 2009).

Em células de músculo liso obtidas da carótida de ratos, a Ang II induziu a proliferação e migração, além de aumentar a expressão de IL18, uma citocina pró-inflamatória, membro da família da superfamília IL1, também conhecida por induzir a produção de Interferon γ (IFN γ) (VALENTE et al., 2012; YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019). Este octapeptídeo, além de ter contribuição patobiológica no estresse oxidativo e inflamação, também desempenha papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, sendo capaz ainda de aumentar a expressão de *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) e *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1), em células endoteliais de veia umbilical humanas (LIANG et al., 2015; VALENTE et al., 2012). Vogiatzi et al. (2013), propuseram que as propriedades pró-inflamatórias da Ang II, não se limitavam ao endotélio vascular, mas que se estendiam às células mononucleares circulantes, e confirmaram este dado ao verificarem um aumento da produção de IL8, em monócitos THP-1, após adição de Ang II, conferindo à Ang II, propriedades pré-aterogênicas também e que puderam ser revertidas via receptor AT1 com o uso de bloqueador, losartan.

Em células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos, estimulados com Ang II por 12 horas (10nM a 10 μ M), foi verificado aumento na expressão de mRNA de *tumor necrosis factor* (TNF) α , IL6, IL1 β e MCP1, de maneira dose dependente, sendo que a adição de 0,1mM de aspirina por 30 minutos (min) antes do estímulo com Ang II, foi capaz de inibir essa resposta (ZHANG et al., 2013a). Aumento de mRNA destes mesmos marcadores inflamatórios, foi observado com o estímulo de Ang II em células mesangiais humanas, além da *Cyclooxygenase-2* (COX-2) ou *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (PTGS2), sendo que a sinvastatina foi capaz de atenuar estas respostas (ZHANG et al., 2015).

O SRA tem demonstrado ser importante também, na patogênese da doença renal crônica, sendo que a Ang II é a principal molécula envolvida na patologia renal, como por exemplo no processo de fibrose, onde se comporta como uma citocina pró-inflamatória, atuando em várias etapas: ativando células mononucleares, aumentando a produção de mediadores pró-inflamatórios e também, modulando a matriz extracelular (MEZZANO; RUIZ-ORTEGA; EGIDO, 2001; ZHANG et al., 2015). É bem estabelecido que, algumas citocinas, como IL1 β , IL6 e TNF, estão associadas com a patofisiologia da doença crônica renal, enquanto que a IL10 é considerada um mediador anti-inflamatório (SALDANHA DA SILVA et al., 2017).

A ativação patológica do SRA, também está relacionada à síndrome metabólica e diabetes tipo 2. Em ilhotas pancreáticas humanas, a Ang II induziu a expressão de IL6 e MCP1, dependente de IL1, além de disfunções em células β (SAUTER et al., 2015).

Em adipócitos humanos, estímulo com Ang II induziu a expressão e produção de IL6 e IL8, sendo revertida pela incubação prévia por 1h com o antagonista de AT1, candersartan (SKURK; VAN HARMELEN; HAUNER, 2004).

Culturas de fibroblastos cardíacos de ratos, estimulados com Ang II, mostraram intensa expressão da proteína COX-2, de maneira tempo dependente. Adicionalmente, essa expressão foi correlacionada com um aumento significativo da liberação de prostaglandina E2 (PGE2) (SCHEUREN et al., 2002).

Ang II é capaz ativar o fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B em vários tipos celulares. E em adipócitos humanos, por exemplo, a Ang II foi capaz de estimular a expressão gênica e a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL6 e IL8, por meio da ativação desta via (SKURK; VAN HARMELEN; HAUNER, 2004). Foi por meio desta via também, que a Ang II ocasionou a produção de IL6 em células de músculo liso vascular humanas (HAN; RUNGE; BRASIER, 1999).

1.3 ATUAÇÃO DO SRA NA MODULAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM TECIDOS ORAIS

Objetivando melhor compreender o papel da Ang II em tecidos bucais humanos, alguns estudos vêm sendo realizados, e por meio deles, diversas funções têm sido atribuídas a essa molécula, tais quais: produção e liberação de PGE₂ via receptor AT₁ (SEGAWA et al., 2003), atividades proliferativas por meio do influxo de cálcio intracelular (OGURO; TSUCHIKAWA, 2009), indução da expressão de *transforming growth fator* (TGF) 1 β e fosfatase alcalina (ALP) (MONNOUCHI et al., 2011), envolvimento na regulação inflamatória por meio da modulação da produção de IL1 β e IL6 (NAKAMURA et al., 2011), e propriedades mitogênicas (LUNDERGAN et al., 1999).

Nakamura et al. (2011) e Gabriele et al. (2017), estimularam fibroblastos orais humanos com IL1 β , e verificaram regulação positiva para algumas citocinas pró-inflamatórias. O primeiro grupo de autores, verificou aumento da expressão de mRNA e produção de IL6. O segundo grupo, verificou regulação positiva de mRNA para AT₁R, IL-1 β , IL6, IL8, TNF α e osteoprotegerina (OPG). Ambos os grupos de pesquisadores, relataram envolvimento do receptor AT₁ da Ang II nas situações estudadas, entretanto, este envolvimento não se mostrou muito claro. Além disso, a relação destas respostas com a capacidade modulatória inflamatória da Ang II especificamente, foi verificada de maneira indireta.

1.4 FIBROBLASTOS ORAIS

O fibroblasto é o tipo celular predominante no tecido conjuntivo periodontal e na polpa dentária (KOKA; REINHARDT, 1997; SIPERT et al., 2010). Determinadas populações de fibroblastos atuam como sentinelas e participam da resposta imunológica, regulando tanto suas atividades metabólicas próprias, quanto a de outras células nos tecidos e órgãos em que estão presentes (CARVALHO, HERNANDES F. - COLLARES-BUZATO, 2005). Essas populações de fibroblastos são fortemente influenciadas por citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que elas próprias, inclusive, são capazes de expressar, mediando a resposta inflamatória. Elas também

expressam receptores de superfície, como receptores do tipo *toll* e possuem a capacidade também, de reconhecer padrões de moléculas associadas a patógenos (PAMP) (CARVALHO, HERNANDES F. - COLLARES-BUZATO, 2005; MORANDINI et al., 2013b). Fibroblastos orais, quando desafiados por determinados agentes, respondem por meio da liberação de citocinas, e são considerados células importantes em doenças como a gengivite, periodontite e em situações de lesão da polpa dentária resultantes da penetração de bactéria e/ou seus componentes de superfície por meio de cárie dentária ou exposição acidental, por exemplo (MORANDINI et al., 2010; SIPERT et al., 2010). Fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal humanos, quando em contato com lipolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), podem contribuir de maneira distinta para o balanço de citocinas como *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP1 α)/ *C-C motif chemokine ligand 3* (CCL3), *stromal derived factor-1* (SDF1) e IL6 no periodonto (MORANDINI et al., 2010). Frente a estímulos com produtos bacterianos, comuns em infecções endodônticas, os fibroblastos de diferentes tecidos orais, tais quais, gengiva, ligamento e polpa de dente decíduo e permanente tiveram a produção da quimiocina CCL3 induzida, e a síntese de CCL12 desbalanceada de maneira dependente do tecido de origem específico do fibroblasto (SIPERT et al., 2014).

Conforme observado, os fibroblastos orais humanos podem colaborar de maneira significativa com a modulação da resposta inflamatória local, entretanto, pouco se conhece sobre a capacidade da Ang II em modular essa resposta nestes tipos celulares.

2

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

A atual literatura e os resultados de nosso grupo de pesquisa, demonstraram a presença e funcionalidade dos componentes do SRA em células oriundas dos tecidos orais, tais como gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária. Logo, a hipótese do presente estudo é que a Ang II, uma vez ligada aos receptores AT1 de células orais humanas, estimula a liberação de mediadores pró-inflamatórios colaborando com o estabelecimento e/ou manutenção do processo inflamatório local. Por outro lado, a Ang II, ligada aos receptores AT2, modula de maneira oposta às características citadas sobre os receptores AT1.

Sendo assim, visando compreender os mecanismos envolvendo a ativação dos receptores AT1 e AT2, os **objetivos gerais** foram:

Investigar *in vitro*,

- O potencial pró-inflamatório e/ou anti-inflamatório da Ang II em fibroblastos orais humanos, oriundos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária, após interação com os receptores AT1 e AT2.

Objetivos específicos:

Avaliar *in vitro*,

- A expressão de mRNA de mediadores inflamatórios por RT-qPCR após estímulo com Ang II;
 - O papel dos receptores AT1 e AT2, por meio de fármacos antagonistas, na expressão gênica destes mediadores inflamatórios, por RT-qPCR;
 - A imunofenotipagem dos receptores AT1 e AT2, por citometria de fluxo;
 - A atuação da Ang II, após estímulo de IL1 β , na expressão de mRNA de mediadores inflamatórios;
 - O envolvimento da IL1 β na modulação da expressão e produção dos receptores AT1 e AT2 por RT-qPCR e citometria de fluxo;
-
-

3

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

Culturas primárias das células orais humanas foram estabelecidas por meio da técnica de *explant*, que consiste na obtenção de células a partir de biópsias dos tecidos, e vem sendo empregada com êxito por nosso grupo de pesquisadores (COLOMBINI-ISHIKIRIAMA et al., 2020; DE FARIA MORANDINI et al., 2011; GABRIELE et al., 2017; MORANDINI et al., 2013a, 2010; SANTOS et al., 2015; SIPERT et al., 2013).

Biópsias de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária, foram obtidas de 3 participantes da pesquisa (1 homem e 2 mulheres), com idade entre 22 e 25 anos, livre de doenças sistêmicas, submetidos a cirurgia de exodontia de terceiro molar, integrantes da pesquisa de Doutorado da cirurgiã dentista, Giovana Maria Weckwerth (CAAE: 59807716.9.0000.5417), no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica (LAFFIC) da FOB-USP. Eles foram convidados a participar deste estudo, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), após explanação dos objetivos do presente projeto de pesquisa (CAAE: 77365617.3.0000.5417, data da relatoria: 21 de fevereiro de 2018). Durante a exodontia, foi coletado um pequeno fragmento de gengiva, no momento da sutura da área cirúrgica. A biópsia de gengiva doada, foi colocada em tubo falcon com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), ambos da Gibco (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, USA), e acondicionado em isopor com gelo. Ainda na clínica, no referido dente, foi realizada a raspagem do LP, na região do terço médio radicular, com auxílio de uma cureta periodontal, e posterior acondicionamento nas mesmas condições já citadas para a gengiva. Em seguida, utilizando-se uma broca, foi realizado um desgaste na forma de canaleta na junção cimento esmalte, no mesmo dente, o qual também foi acondicionado para posterior remoção do tecido pulpar.

Os critérios de inclusão dos participantes na pesquisa foram: Indivíduos acima de 18 anos livres de doenças sistêmicas, tais como, diabetes, hipertensão e reumatismo. E os critérios de exclusão dos participantes foram: mulheres grávidas ou

lactantes e indivíduos que estavam em tratamento com anti-inflamatórios e/ou anti-hipertensivos. Foram excluídas ainda, pessoas que apresentaram sinais de infecção na região do dente a ser extraído.

3.2 ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA DAS CÉLULAS ORAIS

Imediatamente após a coleta dos 3 tecidos no LAFFIC, o isopor com os materiais biológicos doados, foram levados ao Laboratório de Farmacologia e Genética da FOB-USP, onde foi realizado o estabelecimento das culturas primárias das células orais, em cabine de segurança biológica. O dente previamente desgastado, foi clivado para obtenção da polpa dentária, que foi removida com o auxílio de limas endodônticas e curetas dentinárias estéreis. Todos os tecidos foram colocados em placas de petri de 100 x 10 mm (diâmetro x altura) separadas, foram picotados em tamanhos menores, seguido por incubação com soluções antibióticas e antifúngicas. Após este procedimento, os tecidos foram centrifugados e ressuspensos em novo meio de cultura, suplementado com DMEM 20% SFB, antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 µg/mL gentamicina) e antifúngico (0,25 µg/mL de anfotericina B), transferidos para uma garrafa de cultura de 25 cm² e mantidos a 37°C e a 5% de CO₂, até que as células alcancem confluência para serem subcultivadas. Após o primeiro subcultivo, as células passaram a ser cultivadas em meio de cultura basal de manutenção (DMEM suplementado com 10% de SFB, antibióticos e antifúngico). Para o uso nos experimentos, foram utilizadas células entre a 4^a e 8^a passagens, conforme protocolo estabelecido em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (MORANDINI et al., 2013a; SANTOS et al., 2015; SIPERT et al., 2013). Conforme os repiques e expansão, as células foram sendo criopreservadas, nas diferentes passagens, em meio de congelamento (DMEM suplementado com 20% de SFB + 5% *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)) e armazenados em nitrogênio líquido, para análises posteriores.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ORAIS HUMANAS

As células orais humanas do presente estudo foram caracterizadas como fibroblastos pela análise morfológica e pela técnica de imunofluorescência (IF), por meio da identificação de *Fibroblast Surface Protein* (FSP), conforme protocolo estabelecido em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Farmacologia e Genética da FOB-USP (COLOMBINI-ISHIKIRIAMA et al., 2020; MORANDINI et al., 2013b; SIPERT et al., 2013, 2014). Entretanto, assumimos a possibilidade da presença de outros tipos celulares como células mesenquimais estromais, em nossas culturas primárias, obtidas pela técnica de *explant*, tendo em vista que elas também expressam FSP (e outros marcadores fenotípicos de fibroblastos, como colágeno e fibronectina), em níveis similares aos observados em fibroblastos. Além disso, podem apresentar morfologia similar, e, portanto, serem considerados tipos celulares indistinguíveis fenotipicamente (DENU et al., 2016). Diante disso, se faz importante assumir que as culturas primárias utilizadas, podem conter células mesenquimais estromais em proporções variadas, e esta variabilidade pode influenciar nos resultados obtidos.

Para o experimento de IF, as células oriundas de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária humanas, foram semeadas com 24 horas de antecedência, numa quantidade de 10^4 células por poço, sobre lâminas específicas para este fim (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chambered Coverglass) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de aderência das células, as lâminas foram lavadas com *phosphate buffered saline* (PBS) 1x e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% (diluído em PBS 1x), por 30 min. As lâminas foram então lavadas 3 vezes com PBS 1x, e incubadas com *Triton x* por 15 min em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as lâminas foram bloqueadas com PBS BSA 3% (3 lavagens de 5 minutos cada). Após incubação por 3 horas com o anticorpo primário *anti-Fibroblast Surface Protein* (ab11333; abcam, USA), 2µg/mL (1:100), as lâminas foram lavadas com PBS 1x e um novo bloqueio foi realizado com PBS BSA 3% por 15 minutos. Seguiu-se então a incubação com o anticorpo secundário específico – para FSP (*Rabbit Anti-Mouse IgG- FITC*, ab97045, abcam, USA) (1:300), por 1 hora em TA, protegido da luz. Após 10 lavagens (3 minutos cada) com PBS 1x, as paredes que formavam os poços das lâminas foram removidas, assim como o

excesso de PBS, e estas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD Hard-Set Mounting Medium with DAPI (H-1500; Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). Posteriormente, estas foram analisadas no microscópio confocal a laser (TCS model, SPE, Leica®, Mannheim, Germany) com o auxílio de uma lente objetiva de 40x.

3.4 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

A fim de, determinar a concentração de Ang II a ser utilizada como estímulo nos experimentos deste trabalho, bem como a concentração dos fármacos bloqueadores dos receptores AT1 (valsartan) e AT2 (PD123319), foram realizados os ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular. Tanto a Ang II, quanto os fármacos bloqueadores de seus receptores, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). As concentrações de Ang II testadas foram: 10^{-6} M e 10^{-5} M (a concentração 10^{-7} M já havia sido testada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, e não se mostraram tóxicos às células, dados não mostrados). O ensaio utilizado foi o AlamarBlue® Cell Viability Reagent (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos), que é um ensaio considerado mais atual e não tóxico (MOHARAMZADEH et al., 2007), que permite verificar a viabilidade celular por meio da redução do ingrediente ativo do kit, a Resazurina (que apresenta cor azul e não fluorescente) em Resorufina (componente de cor vermelha e altamente fluorescente).

Para a realização deste ensaio, após a 4ª passagem, os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços (Corning Inc, Corning, Nova Iorque, EUA), em quadruplicata, na densidade de 10^4 células/poço com um volume final de 200µL de meio de cultura basal de manutenção. Após 18 a 24h para adesão das células, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com 200µL de PBS 1x estéril, pré aquecido a 37°C, e o estímulo/bloqueio ou DMEM suplementado com 1% de SFB (basal sem estímulo), foram adicionados aos poços em um volume final de 200µL. Para o controle morte, antes de adicionar os estímulos aos poços correspondentes, 50µL de metanol 70% foram adicionados e deixados agir pelo tempo de se adicionar estímulos aos outros poços, em seguida, foi lavado com PBS e 200µL de H₂O foi adicionado. As condições experimentais foram: **(1) Blank** (controle sem células); **(2)**

Basal (controle sem estímulo); **(3)** Ang II 10^{-6} M; **(4)** Ang II 10^{-5} M; **(5)** valsartan 10^{-3} M; **(6)** valsartan 10^{-4} M; **(7)** valsartan 10^{-5} M; **(8)** PD123319 10^{-3} M; **(9)** PD123319 10^{-4} M; **(10)** PD123319 10^{-5} M e **(11)** Controle morte.

O tempo experimental para o teste com Ang II foi de 24h, tendo em vista o tempo máximo experimental para este estímulo. Já para os bloqueadores, o tempo experimental testado foi de 1h, tendo em vista o tempo de bloqueio utilizado no presente trabalho. Sendo assim, seguido o tempo experimental correspondente, prosseguiu-se com o protocolo do kit conforme instruções do fabricante.

3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Após a 4^a passagem, os fibroblastos da gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária, foram semeadas em placas de 6 poços (Corning®), em triplicata, na densidade celular de 2×10^5 células/poço, em um volume final de 2 mL de meio de cultura basal de manutenção e deixadas aderir pelo período entre 18h a 24h. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS 1x estéril, previamente aquecido a 37°C, e novo meio DMEM suplementado com SFB 1%, foi adicionado aos poços e deixados por 24h na incubadora. Passado esse período, seguiu-se com a colocação dos bloqueadores e estímulos diluídos também em DMEM suplementado com 1% de SFB.

Tanto para o bloqueador do receptor AT1 (valsartan) quanto para o bloqueador do receptor AT2 (PD123319), o tempo de atuação nas células foi de 1h. Os tempos experimentais estabelecidos para atuação da Ang II foram de 3, 6 e 24h. As concentrações utilizadas foram: Ang II (10^{-6} M), valsartan (10^{-5} M) e PD123319 (10^{-5} M).

Passados os tempos experimentais, as placas foram removidas da incubadora, o sobrenadante foi coletado e armazenado em -80°C e as células foram lisadas em solução tampão de lise, conforme instruções do Kit de extração do RNA PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™), e também congeladas até o momento do processo de extração do RNA.

3.5.1 Extração do RNA total

O RNA total foi obtido a partir do lisado de células mencionado acima, por meio do PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* é baseado em um método de colunas, no qual é possível isolar RNA total de alta qualidade.

3.5.2 Quantificação e análise da qualidade do RNA total obtido

A quantidade e a qualidade do RNA total obtido foi verificada por meio de análise espectrofotométrica em Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Além da concentração em ng/μL, este equipamento fornece uma razão referente à qualidade da amostra por meio da leitura em comprimento de onda entre 260 (A260) e 280 nm (A280). Amostras de RNA com qualidade ideal para análises posteriores, devem ter uma relação entre A260 e A280 (A260/A280) entre 1,9 e 2,1.

3.5.3 Normalização da quantidade de RNA obtido e transcrição reversa (RT)

Imediatamente após a análise espectrofotométrica, a quantidade total de RNA das amostras foram normalizadas para 500ng em um volume final total de 14μL em água livre de DNase e RNase e a transcrição reversa (RT) foi realizada por meio do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), de acordo com instruções do fabricante em Termociclador Veriti – 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

3.5.4 Análise por Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

A expressão quantitativa do RNAm, para os alvos propostos neste estudo, foi analisada por meio de reações de PCR quantitativa, utilizando-se o sistema Taqman® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho ViiA7 (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA). Este equipamento faz parte dos

equipamentos multiusuários da FOB-USP, obtido por chamada FAPESP (Processo número 2009/53848-1). Foram utilizados *primers* e sondas inventoriados adquiridos na mesma empresa, e listados na **Tabela 1**. Como gene de referência, foi utilizada a amplificação do gene para RPL13A.

Foram utilizados 2 μ L de DNA complementar (cDNA), sintetizado a partir do RNA total de cada amostra juntamente com o TaqMan® Fast Advanced Master Mix e o ensaio TaqMan® Assay do alvo correspondente, ambos da Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA), totalizando um volume final de 5 μ L/reação. A reação de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, quarenta e cinco ciclos de 1 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C, conforme recomendado pelo fabricante. Os resultados foram analisados com base no valor de *cicle threshold* (CT). As médias dos valores de CT, das amostras em duplicatas, foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, normalizados em relação ao controle interno (RPL13A) e normalizadas também pelo grupo de células não estimuladas, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1: Identificação e código dos ensaios TaqMan® utilizados nos experimentos de RT-qPCR desta pesquisa.

Alvo	Código
RPL13A	Hs03043885_g1
CXCL8 - IL8	Hs00174103_m1
CCL2 - MCP1	Hs00234140_m1
COX-2 - PTGS2	Hs00153133_m1
IL6	Hs00174131_m1
IL1 β	Hs01555410_m1
TNF α	Hs00174128_m1
IFN γ	Hs00989291_m1
IL10	Hs00961622_m1
IL4	Hs00174122_m1
AGTR1	Hs99999095_m1
AGTR2	Hs02621316_s1

3.6 IMUNOFENOTIPAGEM DOS RECEPTORES AT1 E AT2 DA ANG II

É sabido que, a técnica de citometria de fluxo vem sendo amplamente utilizada para diversos fins, tais como, seleção de populações celulares positivas ou negativas para marcadores específicos, bem como, para determinar as proporções destas células (MAECKER; TROTTER, 2006). Esta técnica de análise foi adotada neste estudo, para além da imunofenotipagem dos receptores, também fornecer dados mais quantitativos a respeito de cada um dos receptores avaliados, nestes tipos celulares. Foi verificada a expressão fenotípica dos receptores AT1 e AT2 nas células oriundas dos 3 tecidos orais humanos (gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária), por meio da qual, foi possível ainda, quantificar as células que expressam os receptores e a intensidade da fluorescência obtida. Para isso, as células mantidas em cultura, em condições basais, foram soltas das garrafas de cultivo com TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e lavadas com PBS 1x estéril. Após a contagem, 10^6 de cada uma das células, foram separadas em tubos de citometria 12 x 75 mm (Falcon), e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min em TA. Para os tubos “não marcados”, as células foram ressuspensas em 500µL de PBS 1x estéril e seguiu-se para aquisição em equipamento BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter (BD Biosciences), que faz parte dos equipamentos multiusuários da FOB-USP (FAPESP 2013/07245-9 e 2015/12894-1). Para os demais tubos com marcação, após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de Stain Buffer, adicionado 1µL de Human BD Fc Block™ (ambos da BD Biosciences), incubado em TA por 15 min, e agitados brevemente para bloqueio de sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, os anticorpos AT1 sc-515884 PE (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e AT2 sc-518054 PE (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1:100), foram cuidadosamente adicionados, em cada um dos tubos correspondentes e incubados por 30 minutos em TA protegidos da luz. Após incubação, os tubos foram lavados com PBS 1x estéril, e centrifugados, utilizando-se a mesma configuração mencionada acima. Por fim, as células foram ressuspensas em 500uL de PBS 1x estéril e seguiu-se também para aquisição, sendo realizada a aquisição padrão de 50.000 eventos para cada tubo/condição avaliada. Dados foram analisados em *software* FlowJo™ (BD Bioscience).

3.7 EFEITO DA IL1 β SOBRE A EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DOS RECEPTORES AT1 E AT2 E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Foi investigado também o papel da IL1 β sobre a expressão e produção dos receptores AT1 e AT2 nestas células. Foi realizado um experimento para análise de expressão gênica, no qual, antes da adição da Ang II às células, foi adicionado o estímulo com IL1 β , a fim de se aumentar a expressão dos receptores da Ang II, e permitir avaliar se a Ang II foi capaz de (1) potencializar a resposta pró-inflamatória atuando após o estímulo de IL1 β ou (2) se houve um possível sinergismo entre essas moléculas. Investigando, portanto, um efeito aditivo ou sinérgico entre estas moléculas. Foi utilizada IL1 β recombinante (PeproTech®) na concentração de 0,1 ng/mL, pelo período de 24h antes da adição de Ang II e 24, 27, 30 e 48h de maneira isolada. As situações experimentais utilizadas estão descritas no esquema a seguir (Figura 2).

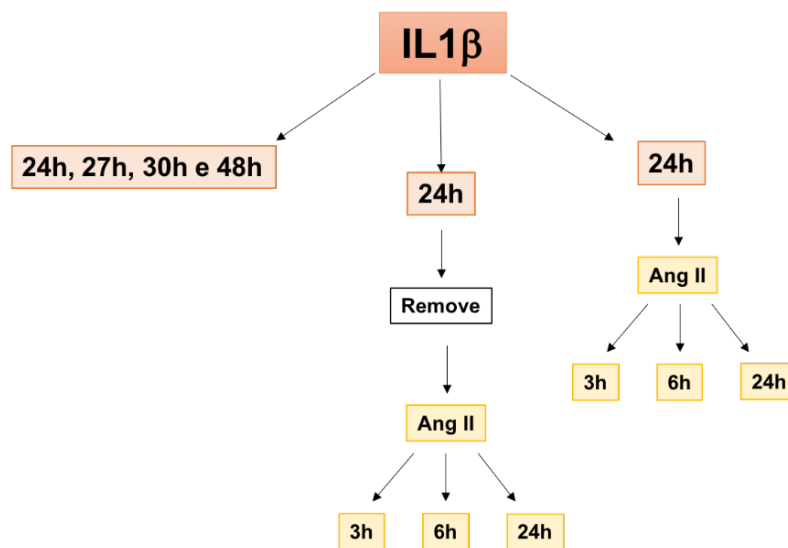


Figura 2: Esquema experimental com estímulo adicional de IL1 β .

Esquema das situações experimentais, para investigar o efeito da IL1 β (0,1ng/mL) associado ou não ao estímulo com Ang II (10^{-6} M), na expressão gênica de mediadores inflamatórios por fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária. Foram nomeados: IL1 β 24h, 27h, 30h e 48h, os grupos que receberam apenas estímulo com IL1 β ; IL1 β 24h/ Ang II 3h, IL1 β 24h/ Ang II 6h e IL1 β 24h/ Ang II 24h, os que receberam IL1 β por 24h, foram lavados os poços com PBS 1x estéril a 37°, seguida da adição da Ang II em novo meio de cultura e deixadas por mais 3, 6 e 24h; e IL1 β 24h com Ang II 3h, IL1 β 24h com Ang II 6h e IL1 β 24h com Ang II 24h, para os grupos que receberam 24h de estímulo com IL1 β , seguido da adição de Ang II, nos mesmos poços já com IL1 β .

Fonte: Elaborado pelo autor.

As células da gengiva, do ligamento periodontal e da polpa dentária de 1 dos participantes da pesquisa, também foram mantidas em meio de cultura basal ou estimuladas com IL1 β por 24h, antes da imunofenotipagem por citometria de fluxo, a fim de, verificar possível aumento da produção dos receptores AT1 e AT2. Após estímulo ou não, seguiu-se com o protocolo de preparo celular para aquisição em equipamento BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter, conforme citado anteriormente.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando *GraphPad Prism* (versão 9.0.2 (134)). Todos os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados foram apresentados como médias ou medianas e analisados por meio do teste de análise de variância ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* para múltiplas comparações para os dados paramétricos e por meio do teste *Kruskal-walis* seguido pelo pós-teste de *Dunn's*, para os dados não paramétricos. A significância estatística foi fixada em 5%.

4

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS ORAIS HUMANAS

Foi realizado o estabelecimento das culturas primárias das células orais humanas oriundas de gengiva, LP e polpa dentária. Nas figuras a seguir é possível acompanhar o processo de obtenção destas células ao longo do tempo (7, 14 e 21 dias), de cada um dos 3 participantes desta pesquisa: participante 1 (**Figura 3**), participante 2 (**Figura 4**) e participante 3 (**Figura 5**). Aos 7 dias de cultivo, é possível observar células aderidas à garrafa para a maioria dos tecidos. Aos 14 e 21 dias, observa-se a proliferação das células e aumento da densidade celular.

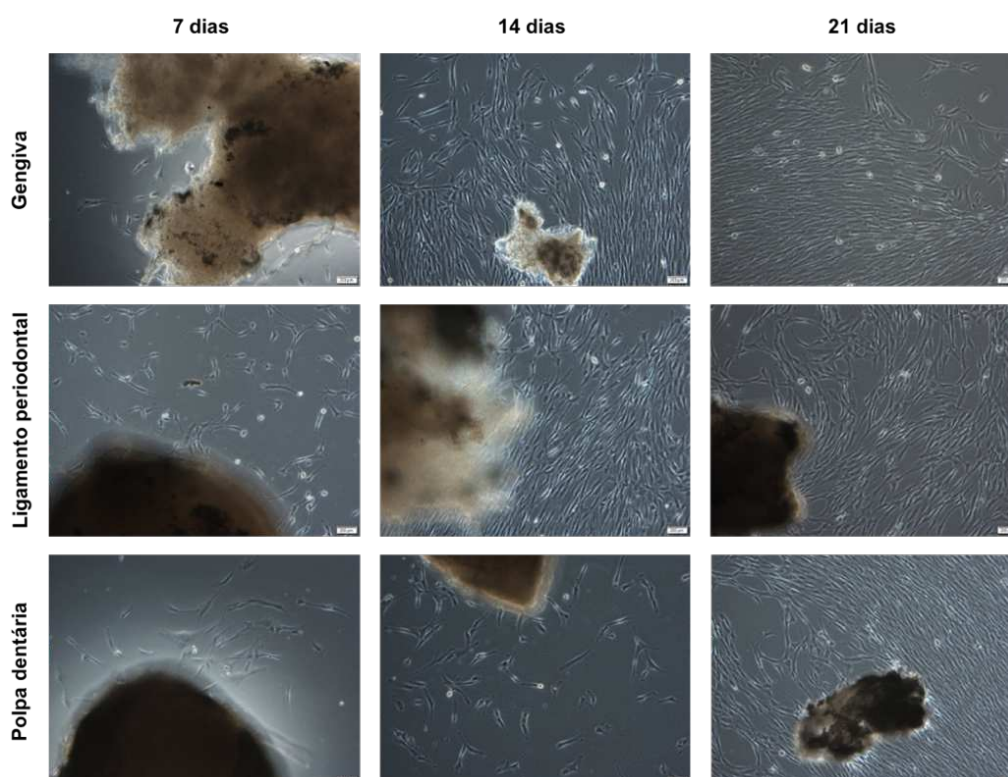


Figura 3: Estabelecimento de cultura de primária de células orais obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária, do participante da pesquisa de número 1. Imagens da cultura adquiridas nos dias 7, 14 e 21 dias de cultura em microscópio invertido Olympus CKX41 com aumento de 10X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

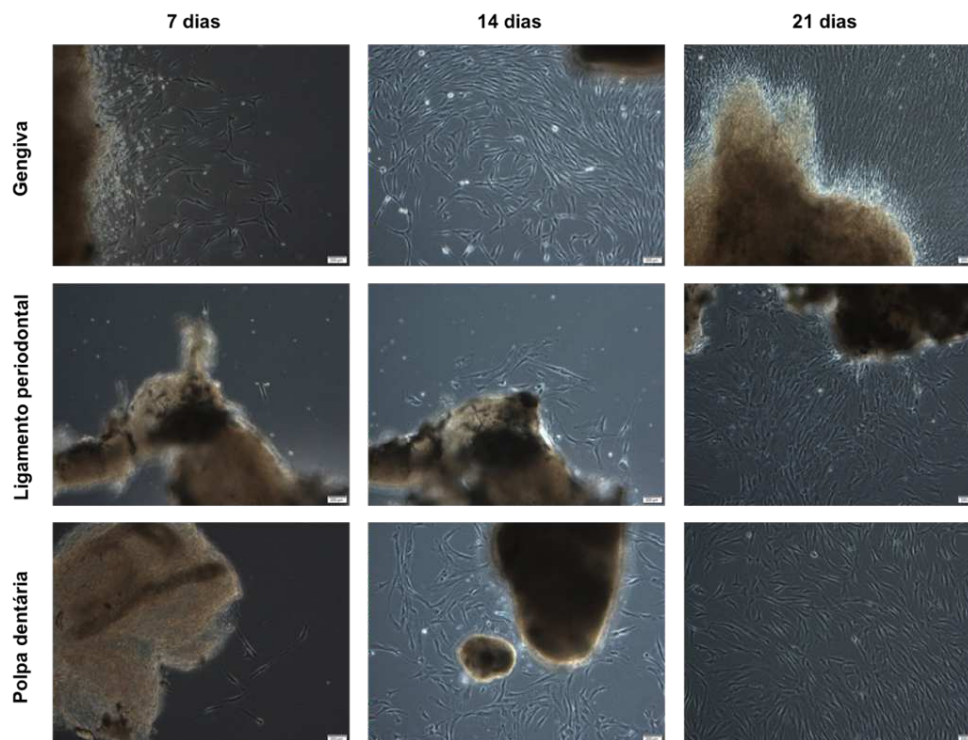


Figura 4: Estabelecimento de cultura de primária de células orais obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária do participante da pesquisa de número 2. Imagens da cultura adquiridas nos dias 7, 14 e 21 dias em microscópio invertido Olympus CKX41 com aumento de 10X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

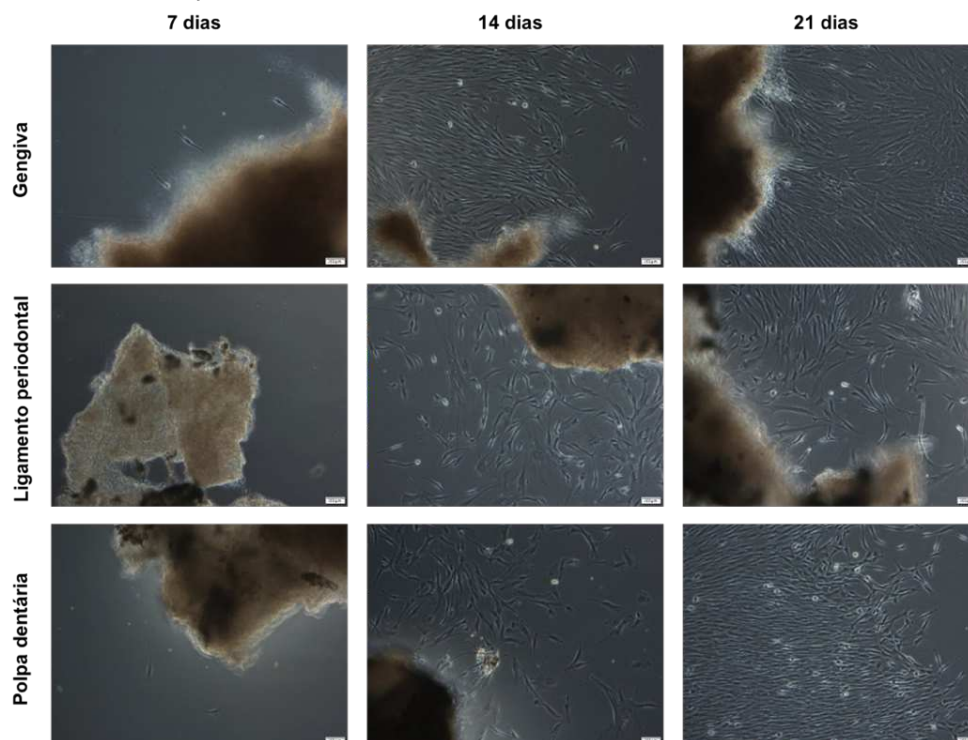


Figura 5: Estabelecimento de cultura de primária de células orais obtidas a partir de explantes de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária do participante da pesquisa de número 3. Imagens da cultura adquiridas nos dias 7, 14 e 21 dias em microscópio invertido Olympus CKX41 com aumento de 10X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 IMUNOMARCAÇÃO PARA FSP

As culturas primárias apresentaram imunomarcacão positiva para FSP, conforme representado na **Figura 6**. As células obtidas da gengiva e polpa dentária, apresentaram uma marcação mais intensa quando comparado às células do LP.

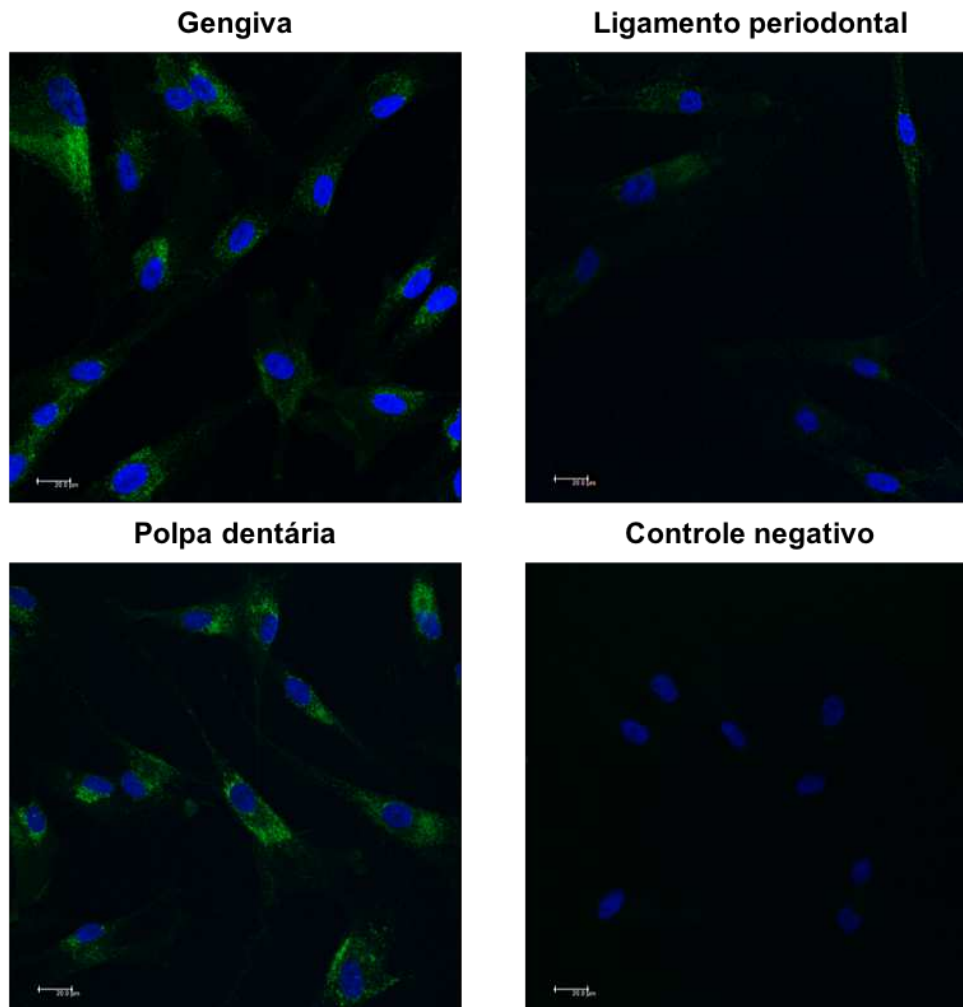


Figura 6: Detecção da expressão de *Fibroblast Surface Protein* (FSP) em células oriundas da gengiva, do LP e da polpa dentária, por meio de imunofluorescência. A cor verde (FITC) indica a presença do marcador FSP nas células, e os núcleos apresentam-se marcados em azul (DAPI). Imagens obtidas com objetiva de 40x. Barras representativas: 20 μ m.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

A análise de citotoxicidade e viabilidade celular, frente ao estímulo com Ang II nas concentrações do presente estudo, por meio do ensaio AlamarBlue®, não revelaram redução da porcentagem de viabilidade celular (**Figura 7**), sendo portanto, selecionada a concentração 10^{-6} M, a qual vem sendo amplamente utilizada na literatura científica relacionada (LU et al., 2017; MENG et al., 2014; NAKAI et al., 2013; SCHEUREN et al., 2002; SEGAWA et al., 2003; WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2013b).

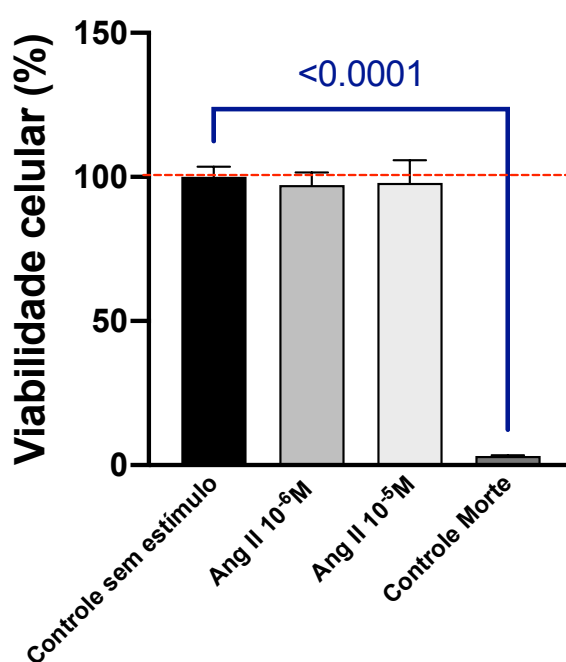


Figura 7: Porcentagem da viabilidade celular das células orais, após adição de 10^{-5} M e 10^{-6} M de Ang II pelo período de 24h comparadas ao grupo não estimulado (controle sem estímulo) por meio do ensaio AlamarBlue®. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem estímulo, estão evidenciadas com o valor de P em azul.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto a análise de citotoxicidade e viabilidade celular dos fármacos bloqueadores dos receptores AT1 e AT2 testados, só foi verificada redução da porcentagem de viabilidade celular, pelo teste de AlamarBlue®, para a concentração 10^{-3} M do fármaco valsartan (**Figura 8**). Para o restante, não foram observadas reduções que inviabilizassem a realização dos testes, sendo, portanto, escolhidas as concentrações de trabalho, conforme as mais frequentemente utilizadas na literatura científica relacionada (**Tabela 2**).

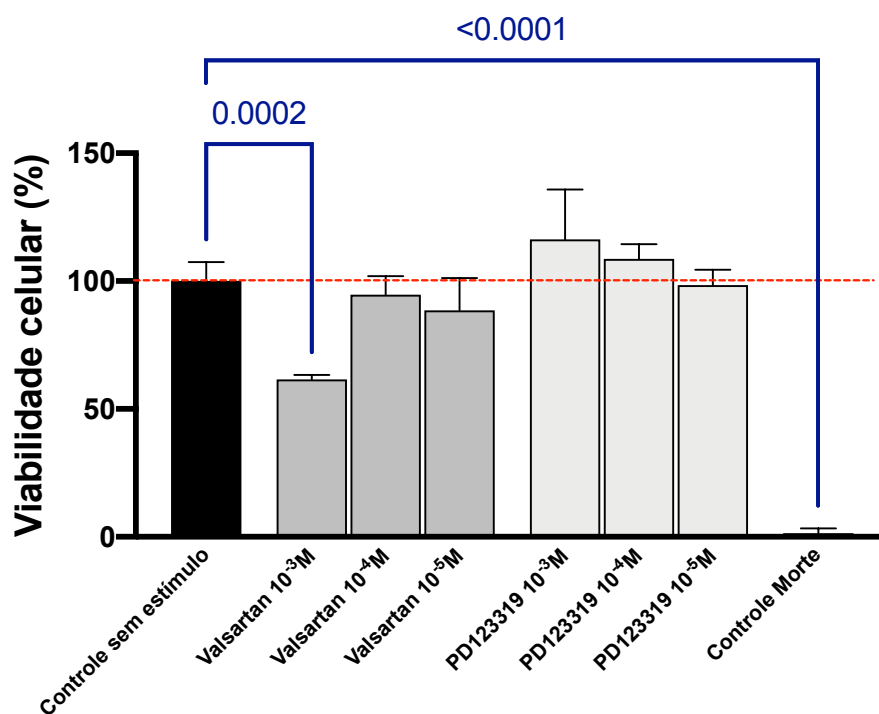


Figura 8: Porcentagem da viabilidade celular das células orais, após adição de diferentes concentrações dos fármacos bloqueadores dos receptores AT1 (valsartan) e AT2 (PD123319), pelo período de 1h, por meio do ensaio AlamarBlue®. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem estímulo, estão evidenciadas com o valor de P em azul.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2: Fármacos bloqueadores dos receptores AT1 e AT2 da Ang II, a concentração selecionada para este trabalho e outros trabalhos da literatura científica que também as utilizaram.

Fármaco e concentração utilizada	Trabalhos que também as utilizaram
Valsartan 10 ⁻⁵ M	ALIQUE et al., 2015
PD123319 10 ⁻⁵ M	ALIQUE et al., 2015; HAO et al., 2015; ZHOU et al., 2017; WANG et al., 2018

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados de expressão gênica relativa, por meio de RT-qPCR de cada um dos experimentos realizados, estão descritos a seguir.

4.4.1 Expressão gênica de mediadores inflamatórios após estímulo com Ang II

Em um primeiro experimento, foi investigado os possíveis tempos experimentais com estímulo de Ang II atuante na expressão de mRNA dos mediadores inflamatórios alvos desta pesquisa.

Não houve detecção ou houve tão baixa expressão de RNAm, a ponto de impossibilitar a análise dos resultados das citocinas $IFN\gamma$, IL10 e IL4 (dados não mostrados).

Comparando o estímulo de Ang II por 3, 6 e 24h, ao controle sem estímulo, observa-se em células oriundas da gengiva (**Figura 9**), que a Ang II parece ter sido responsável pela modulação positiva para CXCL8 e PTGS2. Por outro lado, ela não promoveu influência na modulação de IL6, $TNF\alpha$ e receptor AT2. Além disso, nota-se uma diminuição da expressão dos receptores AT1 para os tempos de 3 e 6h após estímulo com Ang II. Um padrão semelhante de resposta foi observado para as células oriundas do ligamento periodontal (**Figura 10**) e polpa dentária (**Figura 11**). A expressão de mRNA de CCL2 diminuiu em 3 e 6h de estímulo com Ang II nas células do ligamento periodontal, e apenas em 6h nas células da gengiva e da polpa dentária.

Diante destes resultados, principalmente em relação ao aumento da expressão de CXCL8, uma importante quimiocina para o estabelecimento do processo inflamatório, um novo experimento foi delineado, buscando investigar o papel dos receptores AT1 e AT2 nesse processo, por meio do uso de fármacos antagonistas.

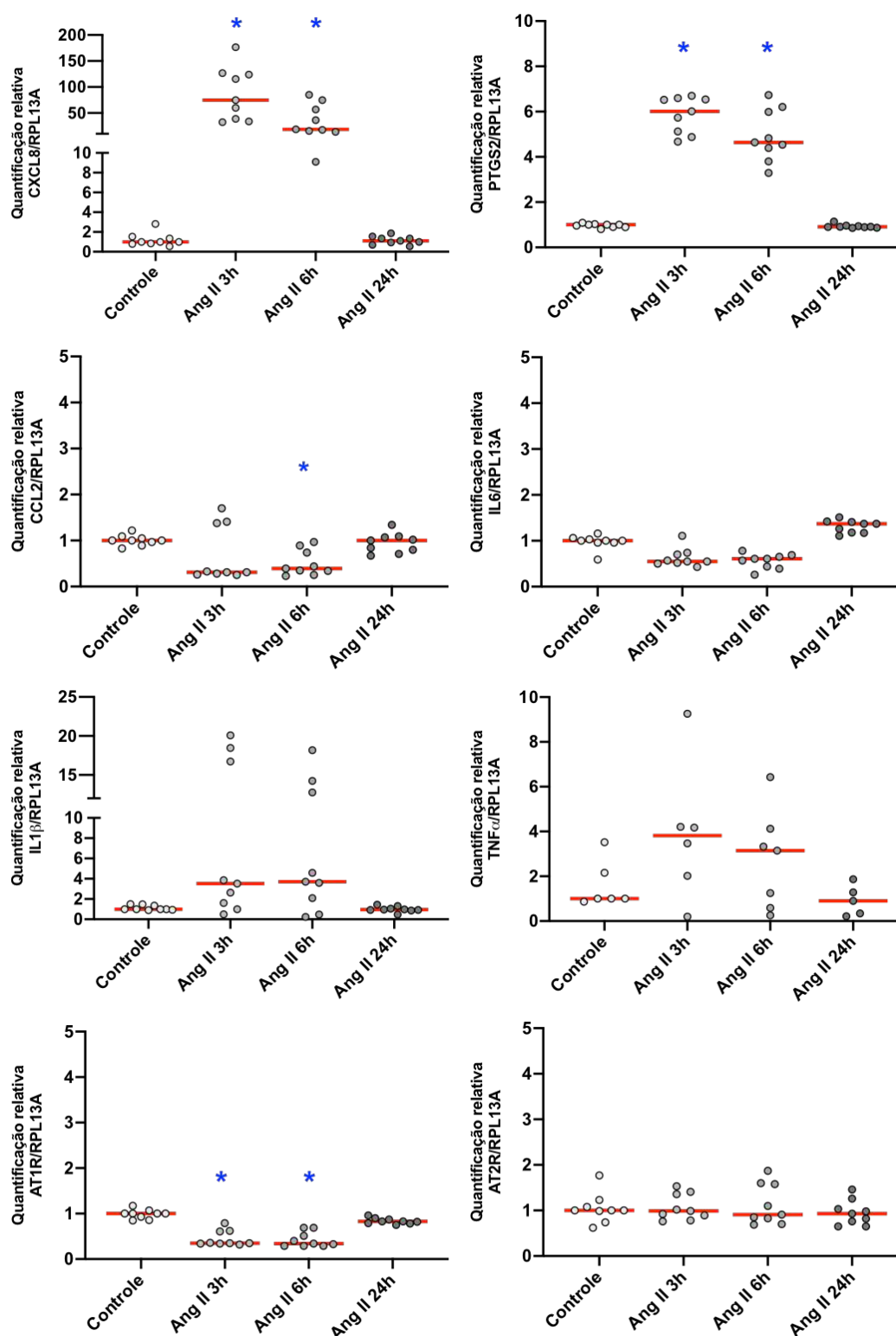


Figura 9: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas de gengiva, após estímulo com Ang II a 10^{-6} M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo). O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

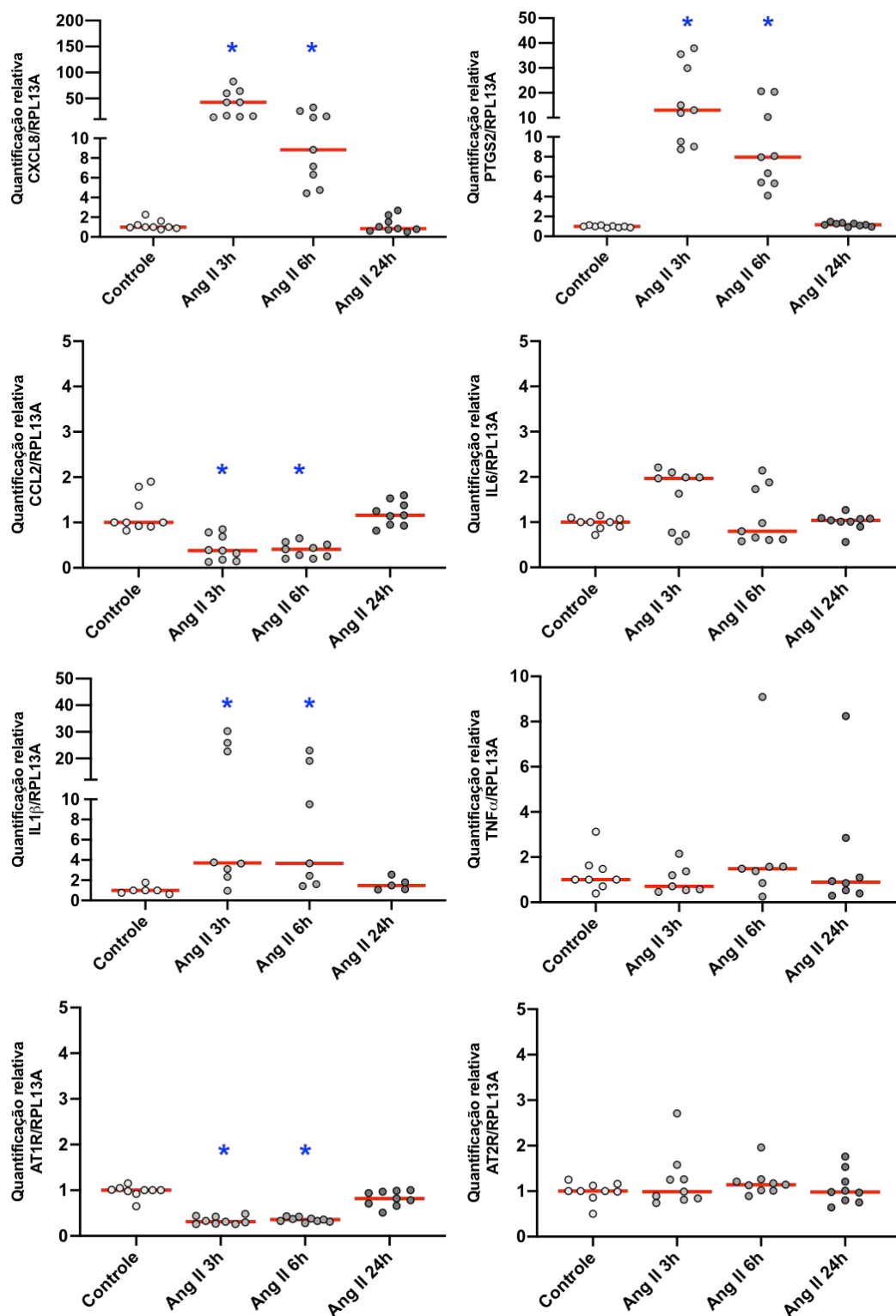


Figura 10: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas do ligamento periodontal, após estímulo com Ang II a 10^{-6} M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo). O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

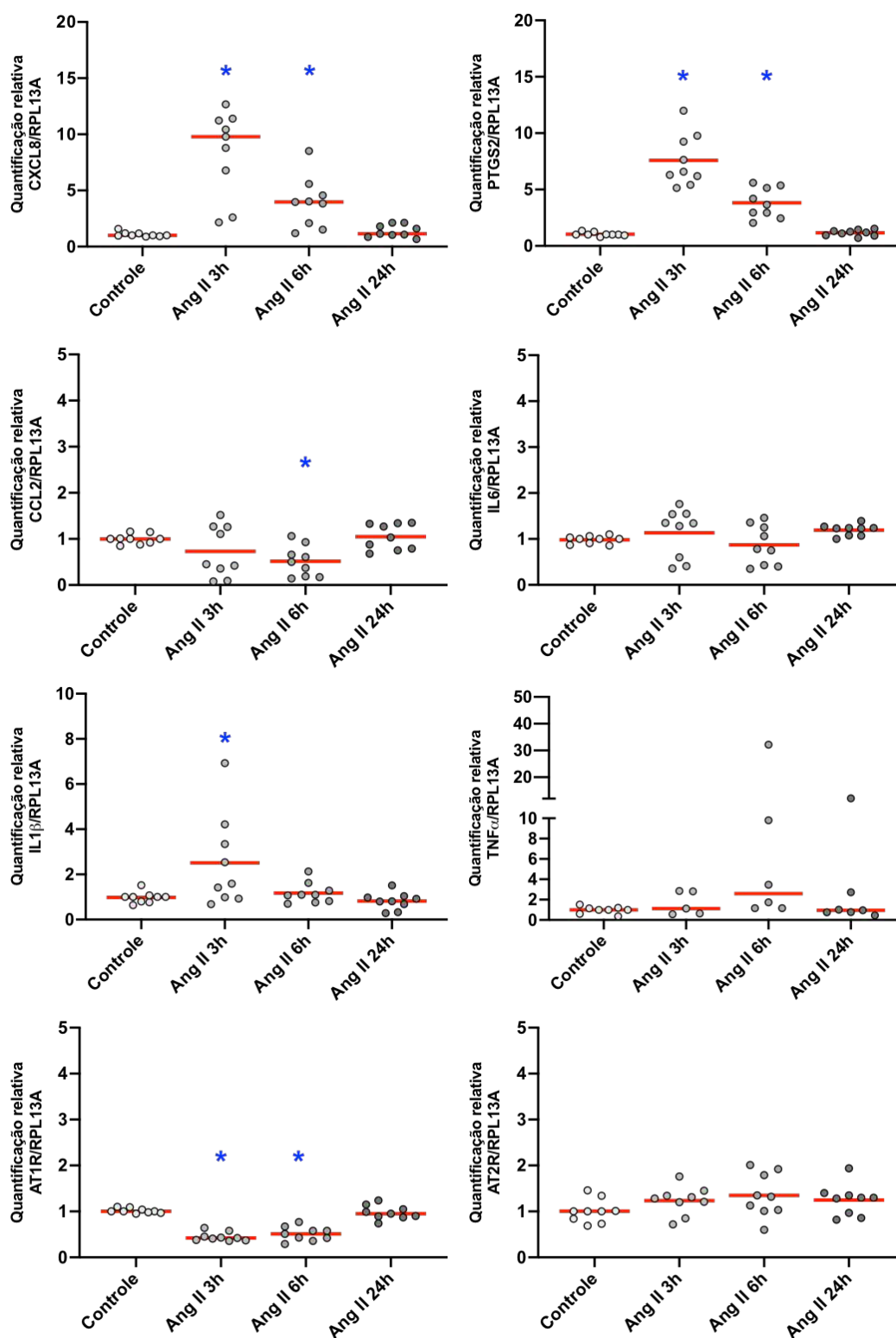


Figura 11: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da polpa dentária, após estímulo com Ang II a 10^{-6} M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo). O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Bloqueio farmacológico dos receptores AT1 e AT2 previamente ao estímulo com Ang II

Assim como observado nos experimentos anteriores, a adição de Ang II, mais uma vez, aumentou a expressão do mRNA dos mediadores inflamatórios (CXCL8, PTGS2) em células oriundas de gengiva (**Figura 12**), ligamento periodontal (**Figura 13**) e polpa dentária (**Figura 14**), sem, no entanto, ser observada a reversão deste efeito pelos fármacos antagonistas testados (Val, PD), para ambos os períodos estudados. Vale destacar que, estas células responderam a todos os estímulos, sejam eles com Ang II, os bloqueadores de seus receptores ou ambos, quando comparados ao Controle (células em meio de cultura basal sem estímulo).

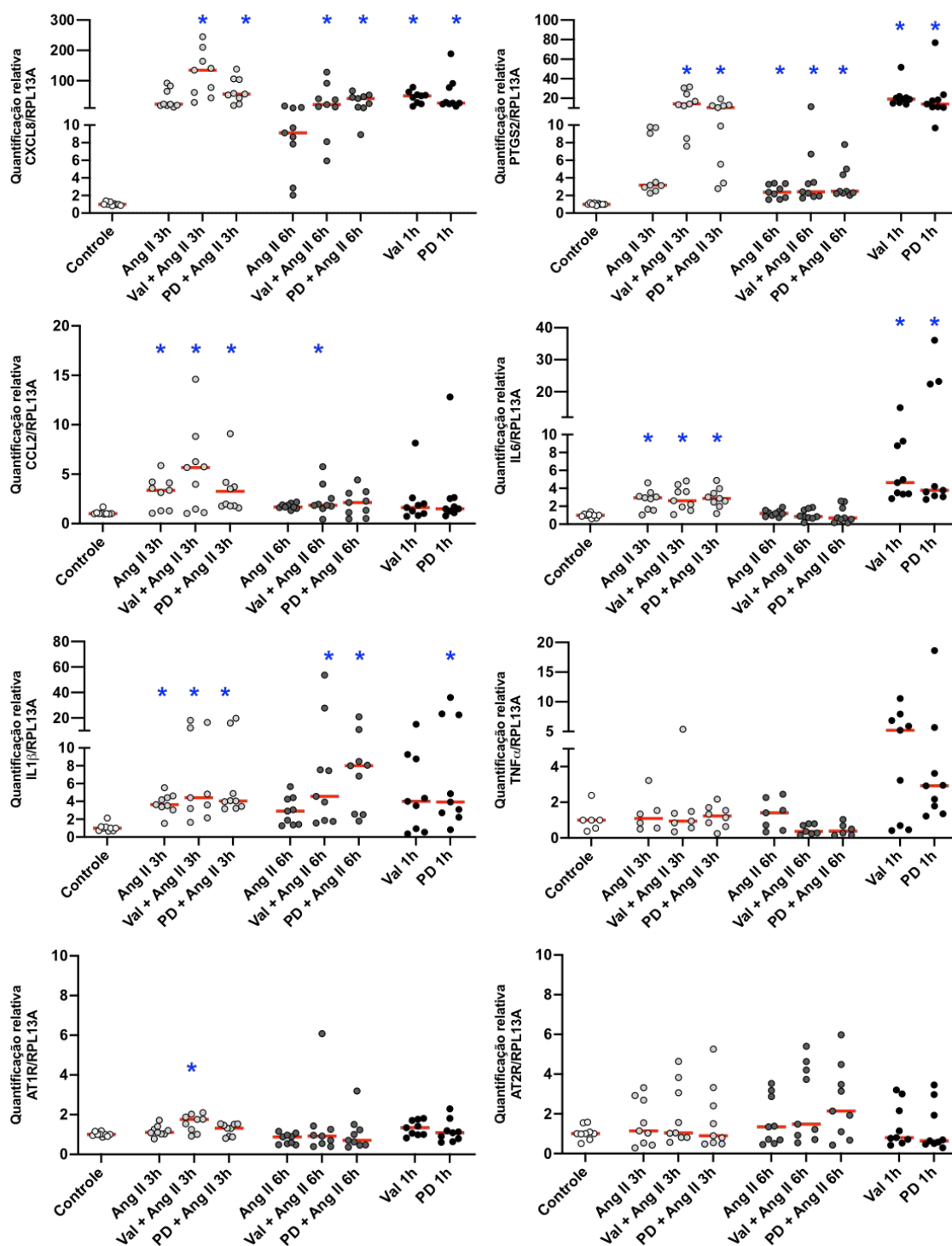


Figura 12: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da gengiva, após estímulo com Ang II a 10^{-6} M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo) previamente ou não tratadas com os antagonistas Valsartan (Val) e PD123319 (PD) por 1h. O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

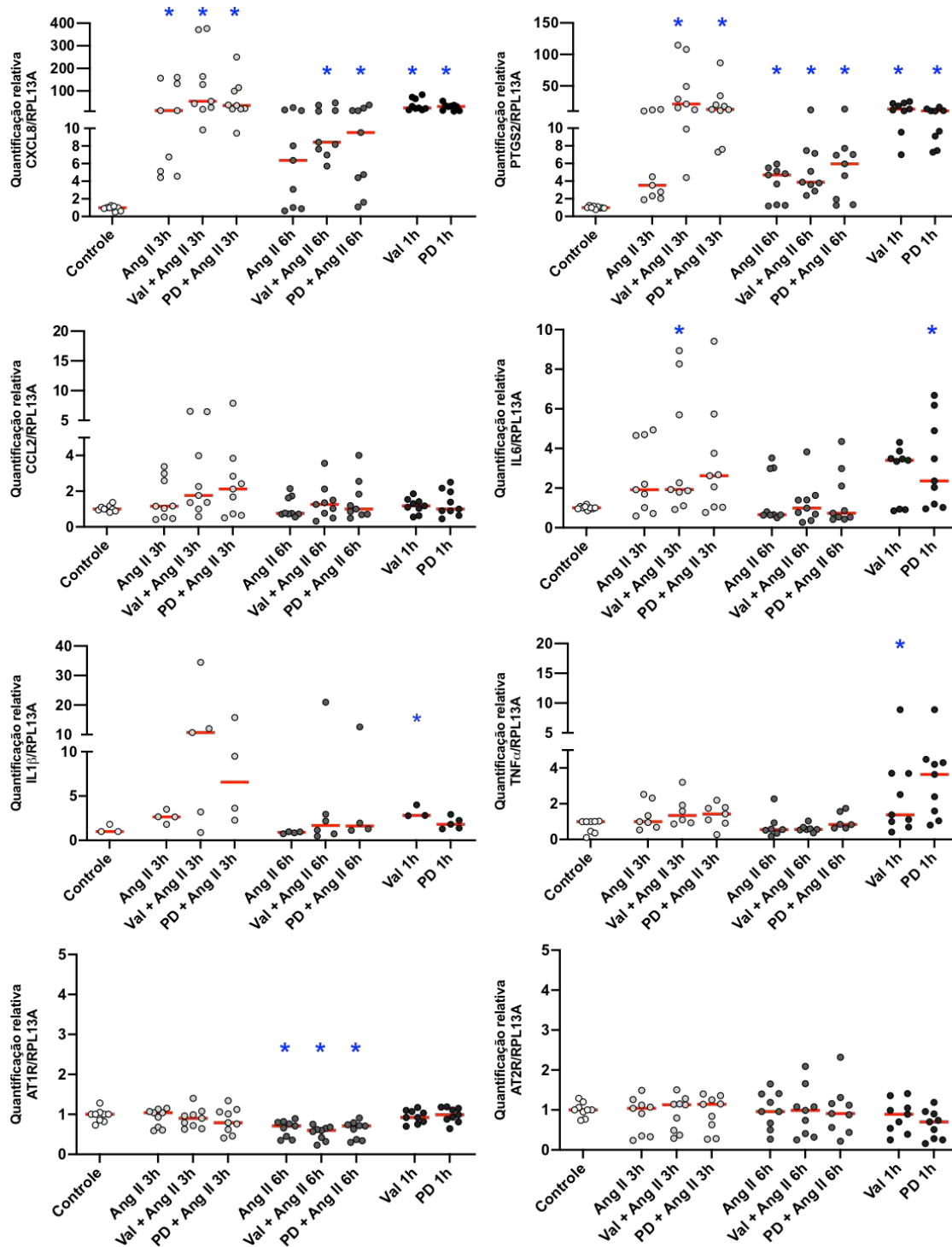


Figura 13: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas do ligamento periodontal, após estímulo com Ang II a 10⁻⁶M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo) previamente ou não tratadas com os antagonistas Valsartan (Val) e PD123319 (PD) por 1h. O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

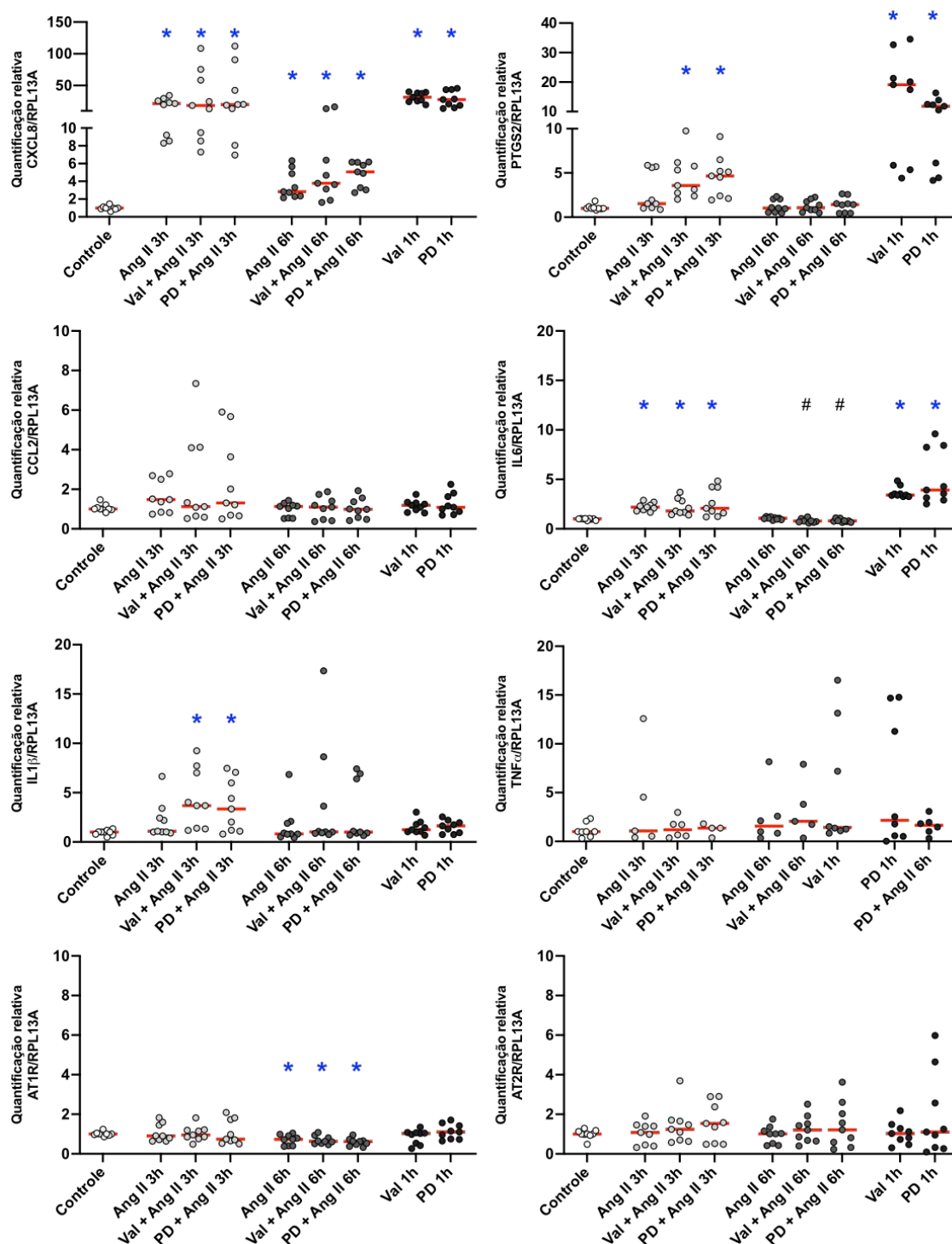


Figura 14: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da polpa dentária, após estímulo com Ang II a 10^{-6} M por 3h, 6h e 24h, comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo) previamente ou não tratadas com os antagonistas Valsartan (Val) e PD123319 (PD) por 1h. O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). # indica diferença em relação ao estímulo de Ang II dentro do mesmo grupo. Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3 Estímulo com IL1 β previamente ao estímulo com Ang II

O estímulo com IL1 β , nos diferentes períodos, tanto isolado (IL1 β por 24h, 27h, 30h, 48h), ou em situações em que o estímulo de IL1 β foi removido após 24h e seguiu-se com a adição da Ang II (IL1 β 24h/ Ang II 3h, IL1 β 24h/ Ang II 6h e IL1 β 24h/ Ang II 24h), quanto adicionado em conjunto com a Ang II (IL1 β 24h com Ang II 3h, IL1 β 24h com Ang II 6h e IL1 β 24h com Ang II 24h), foram capazes de aumentar a expressão de mRNA dos mediadores pró-inflamatórios CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6 e IL1 β nas células oriundas de gengiva (**Figura 15**), ligamento periodontal (**Figura 16**) e polpa dentária (**Figura 17**). Nas situações em que o estímulo de IL1 β foi removido após 24h e então adicionado a Ang II, é possível notar uma diminuição da resposta observada ao longo do tempo, sendo que há uma regressão dos valores próximos ao basal, após um período de 24h para a maioria destes mesmos mediadores supracitados, o que permite inferir a incapacidade da Ang II em manter a resposta inflamatória iniciada pela IL1 β . Para o grupo que recebeu ambos estímulos, de IL1 β e Ang II de maneira conjunta, não foi observado um aumento significativo em relação às demais condições, em que as células também foram tratadas com IL1 β , de maneira isolada, sugerindo não haver efeitos aditivos ou sinérgicos entre estas duas moléculas, sobre os tipos celulares estudados.

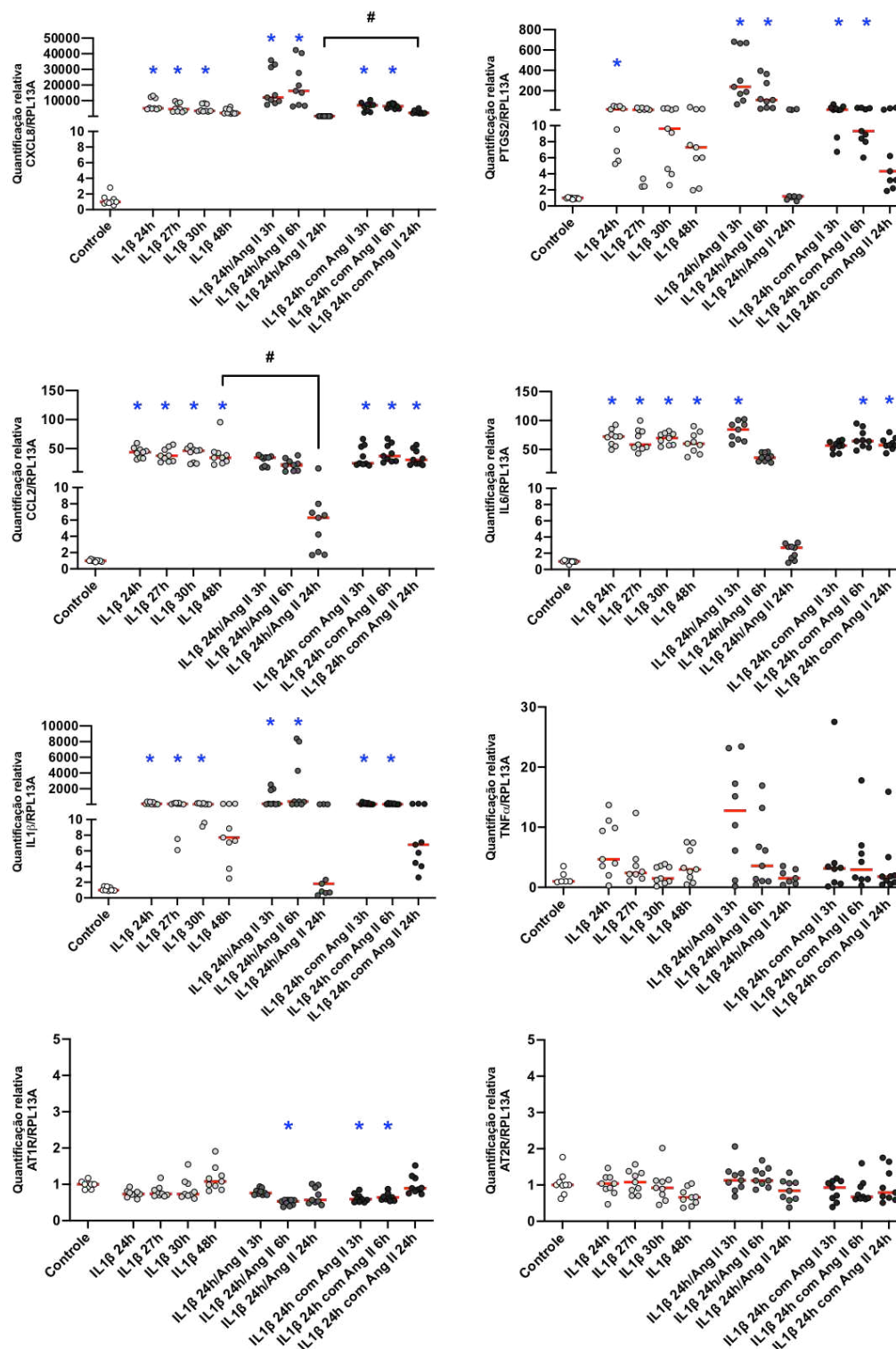


Figura 15: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da gengiva, após estímulo com 0,1ng/mL de IL1 β isolado ou seguido da Ang II a 10⁻⁶M comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo). O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). # indica diferença estatisticamente significativa indicada pela chave. Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

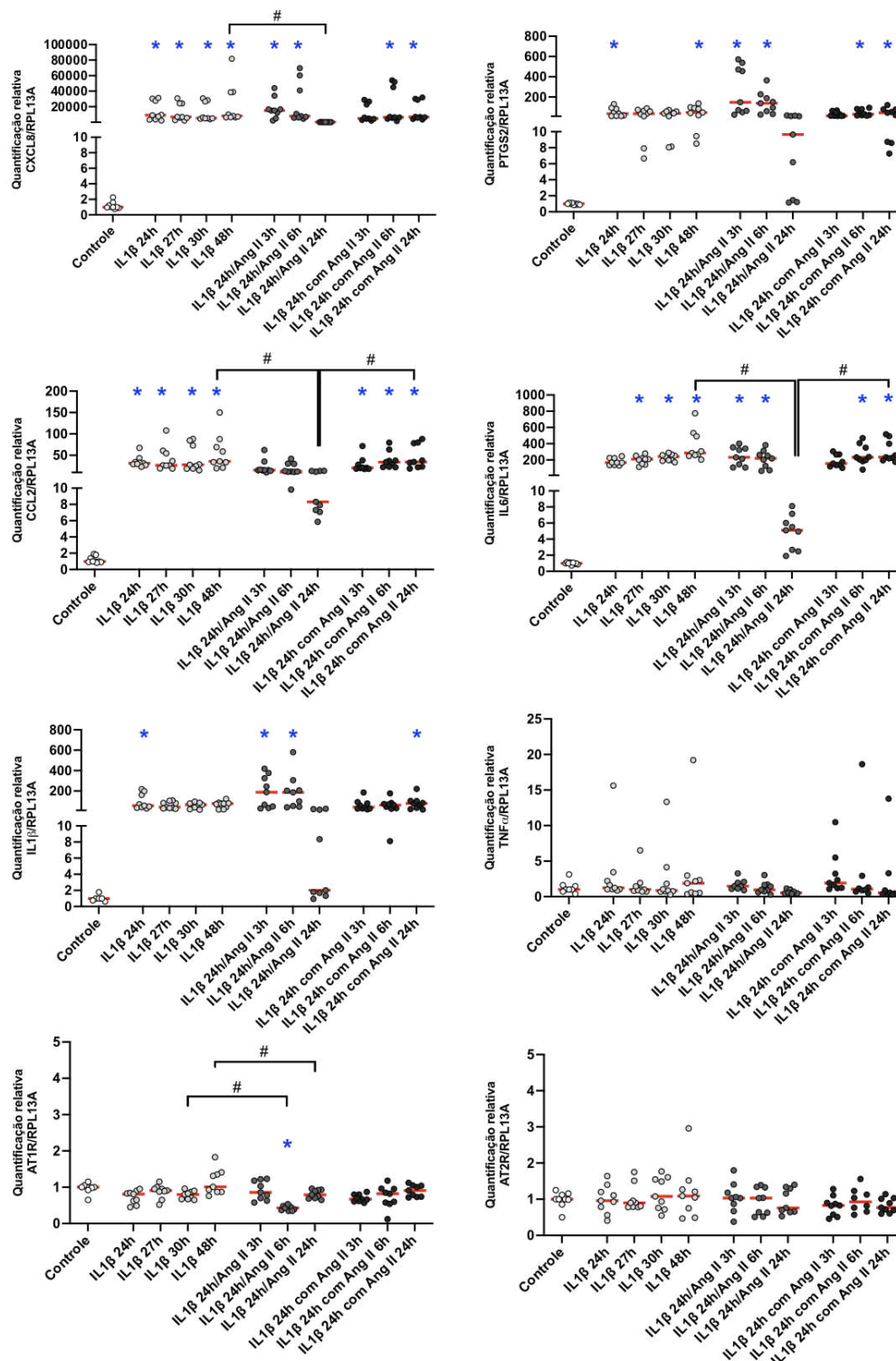


Figura 16: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas do ligamento periodontal, após estímulo com 0,1ng/mL de IL1 β isolado ou seguido da Ang II a 10⁻⁶M comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo). O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). # indica diferença estatisticamente significativa indicada pela chave. Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

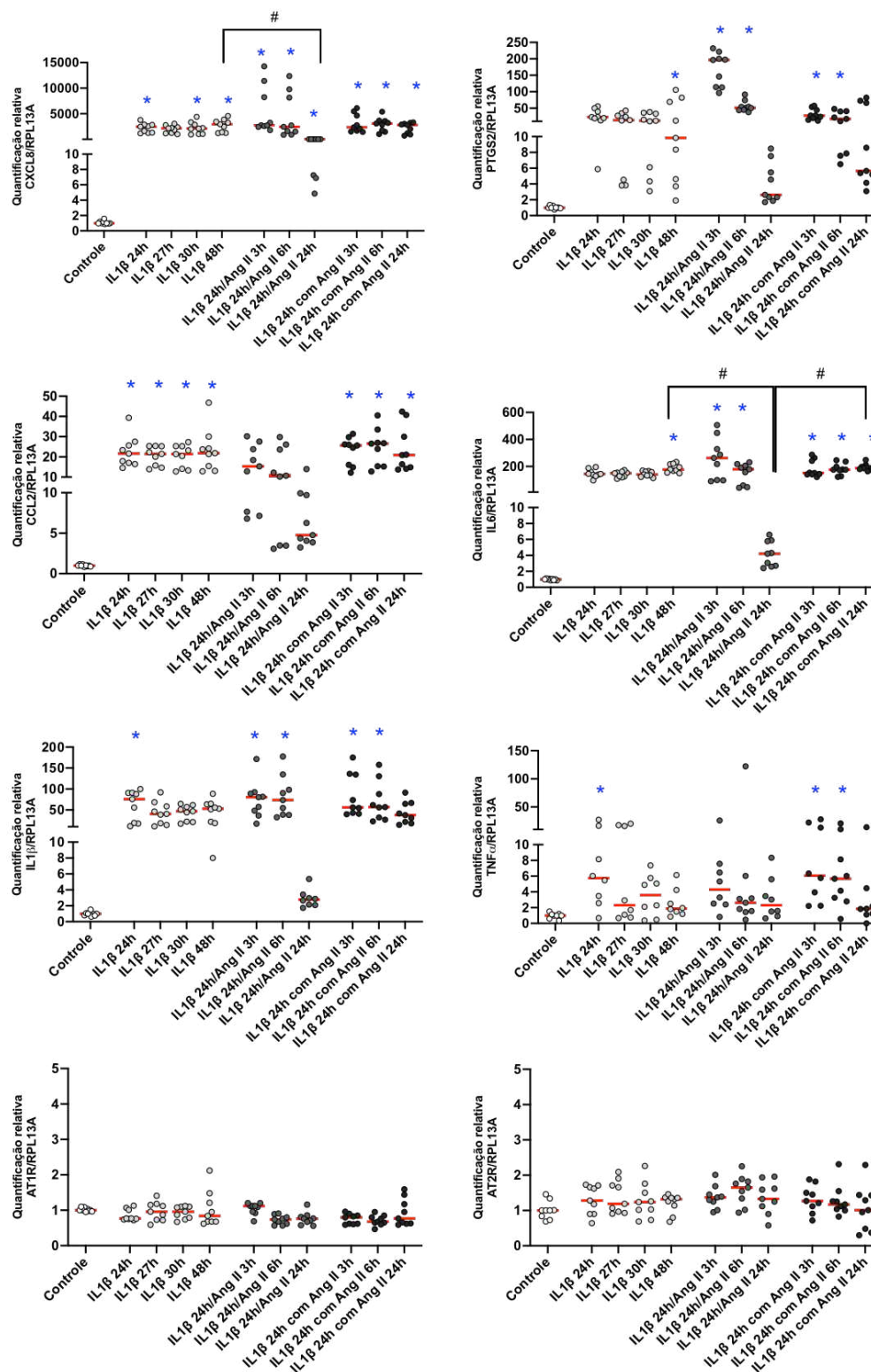


Figura 17: Representações gráficas das análises de expressão gênica para CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , TNF α , AT1R e AT2R, em células oriundas da polpa dentária, após estímulo com 0,1ng/mL de IL1 β isolado ou seguido da Ang II a 10⁻⁶M comparadas ao controle (células em meio basal sem estímulo). O experimento foi realizado em triplicata de cada um dos 3 participantes da pesquisa e os valores individuais estão representados nos gráficos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). # indica diferença estatisticamente significativa indicada pela chave. Médias (dados paramétricos) e medianas (dados não paramétricos), estão representadas pelo traço em vermelho em cada um dos grupos analisados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 IMUNOFENOTIPAGEM DOS RECEPTORES AT1 E AT2

Resultados das análises de imunofenotipagem para os receptores AT1 e AT2 mostram que, as células orais deste estudo expressam estes receptores em porcentagens variadas. A porcentagem de expressão do AT1 variou entre 3,11 e 7,43 % e do AT2 entre 2,48 e 7,89%.

Foi utilizada a mesma estratégia de *gates* para seleção da população de interesse (**Figura 18**). Para cada um dos tipos celulares, de cada um dos 3 participantes da pesquisa, foi realizada essa determinação inicial em células não marcadas e a porcentagem de células marcadas em relação às não marcadas, para gengiva (**Figura 19**), ligamento periodontal (**Figura 20**) e polpa dentária (**Figura 21**) e são apresentadas a seguir.

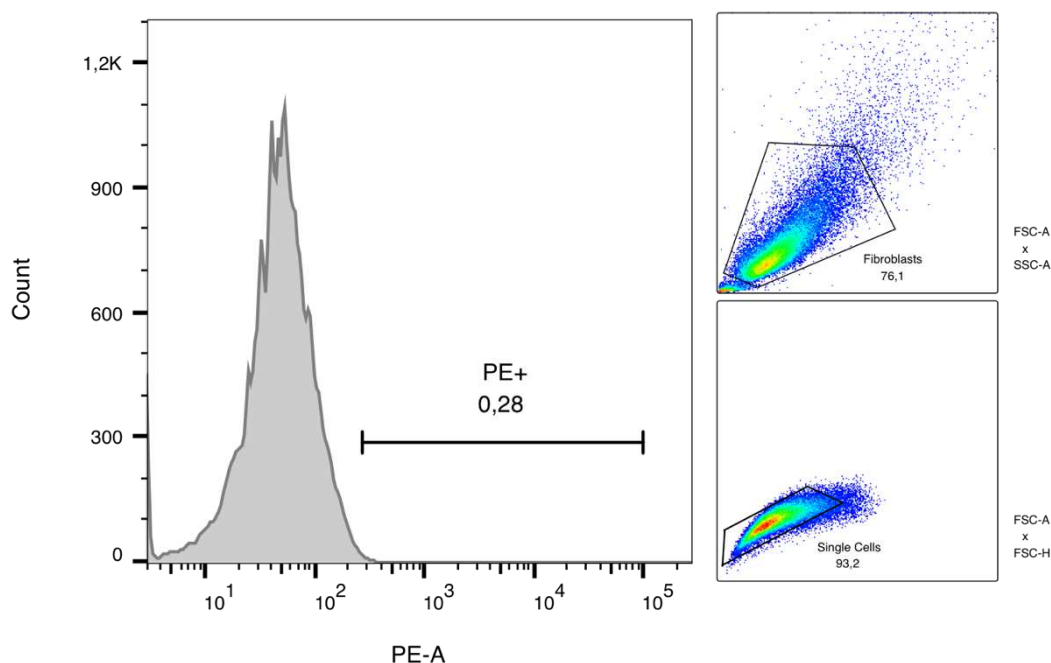


Figura 18: Imagem representativa das estratégias para determinação das células marcadas a partir das não marcadas. A população total de células não marcadas foi determinada a partir da separação por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) seguida da exclusão de agrupamentos celulares (FSC-A/ FSC-H) conforme observados nos gráficos menores a direita do histograma, o que possibilita determinar quantificação das populações de células positivas para marcação a partir do histograma de células não marcadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

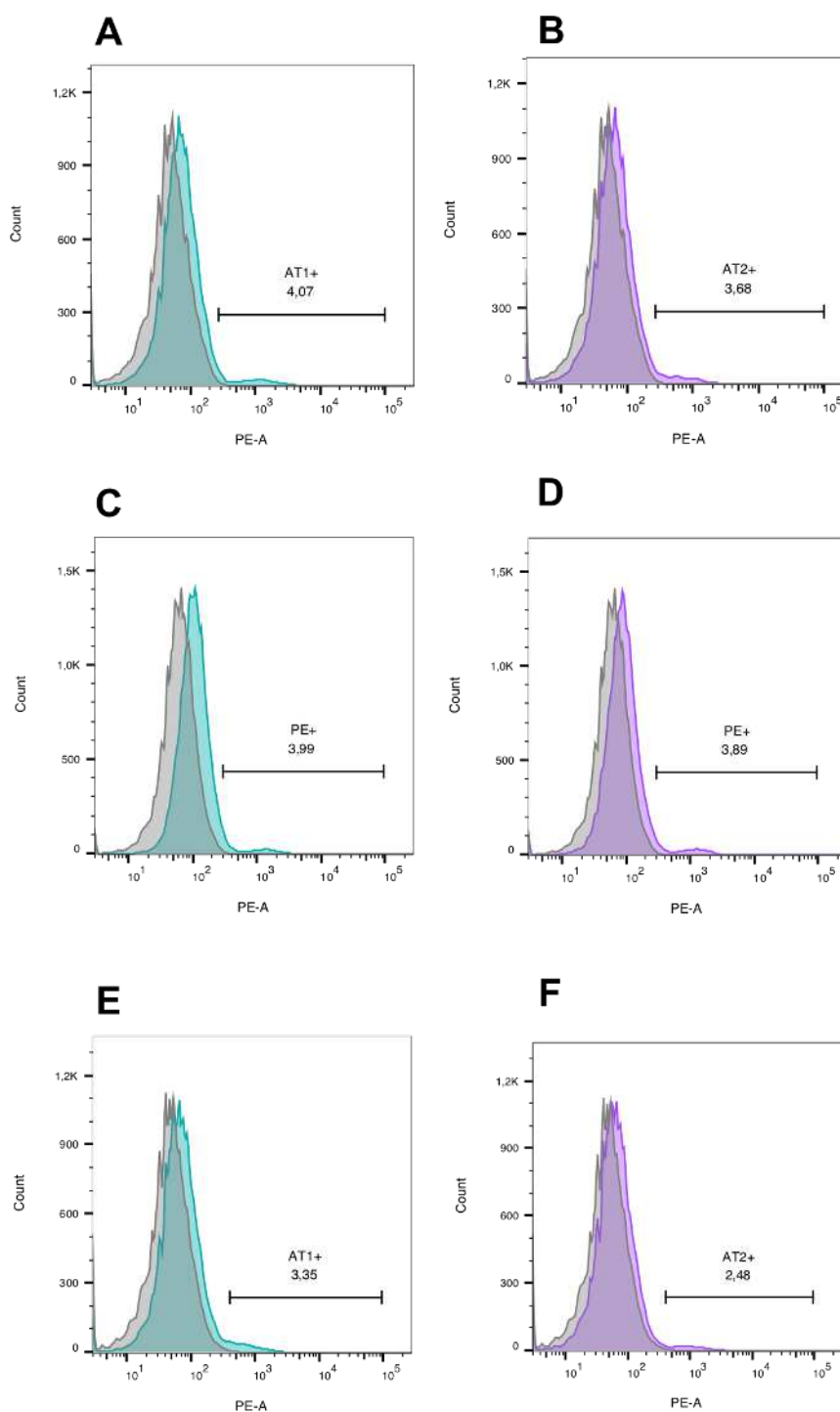


Figura 19: Imunomarcção dos receptores AT1 e AT2 da Ang II em células da gengiva dos participantes da pesquisa 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E e F) em condições basais de cultivo, obtidas após análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter. A, C e E correspondem a percentagem de células marcadas para o receptor AT1 da Ang II (histograma verde) em relação às células não marcadas (histograma cinza). B, D e F correspondem a percentagem de células marcadas para o receptor AT2 da Ang II (histograma roxo) em relação às células não marcadas (histograma cinza).

Fonte: Elaborado pelo autor.

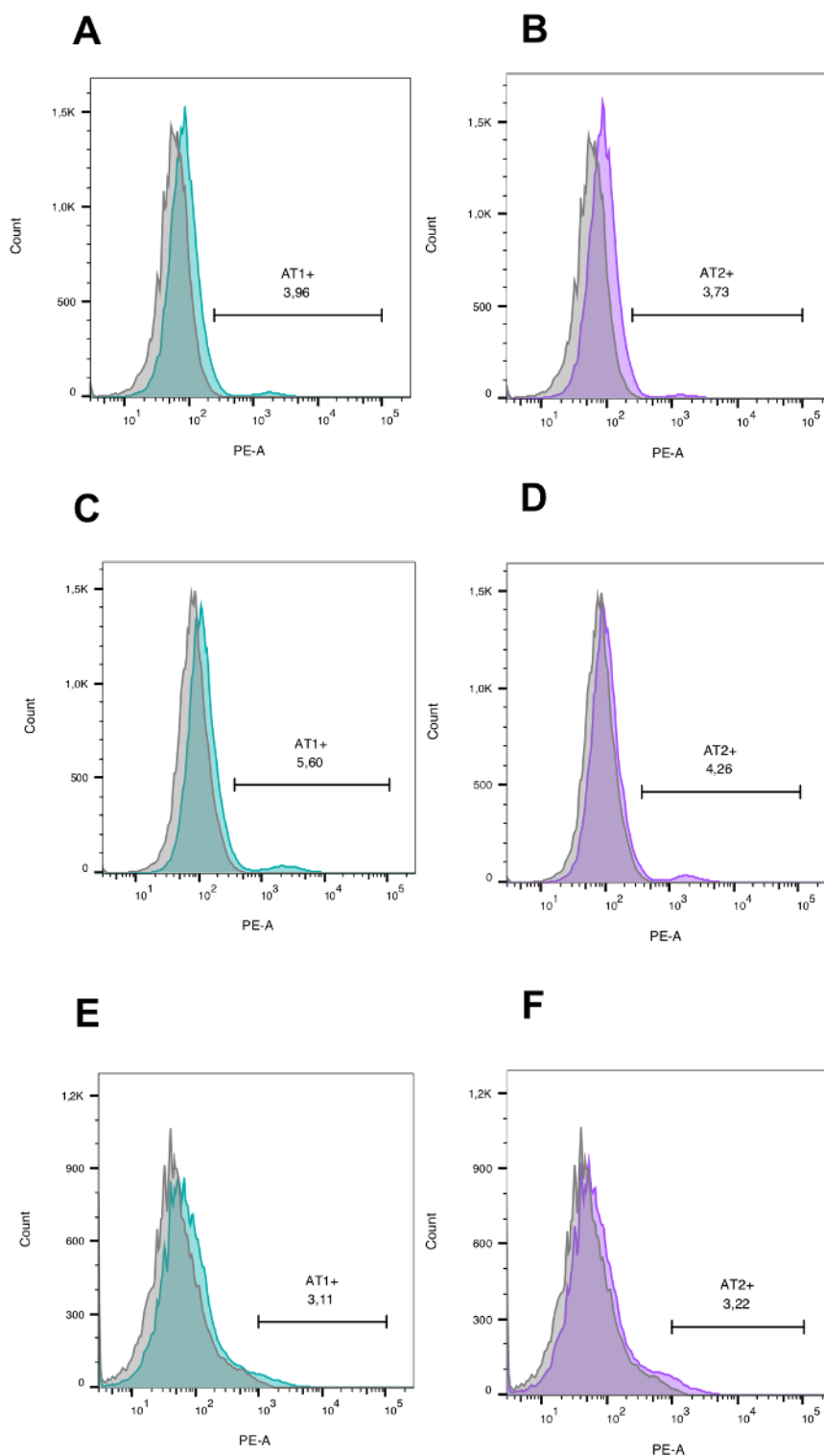


Figura 20: Imunomarcagem dos receptores AT1 e AT2 da Ang II em células do ligamento periodontal dos participantes da pesquisa 1 (**A e B**), 2 (**C e D**) e 3 (**E e F**) em condições basais de cultivo, obtidas após análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter. **A, C e E** correspondem a porcentagem de células marcadas para o receptor AT1 da Ang II (histograma verde) em relação às células não marcadas (histograma cinza). **B, D e F** Correspondem a porcentagem de células marcadas para o receptor AT2 da Ang II (histograma roxo) em relação às células não marcadas (histograma cinza).

Fonte: Elaborado pelo autor.

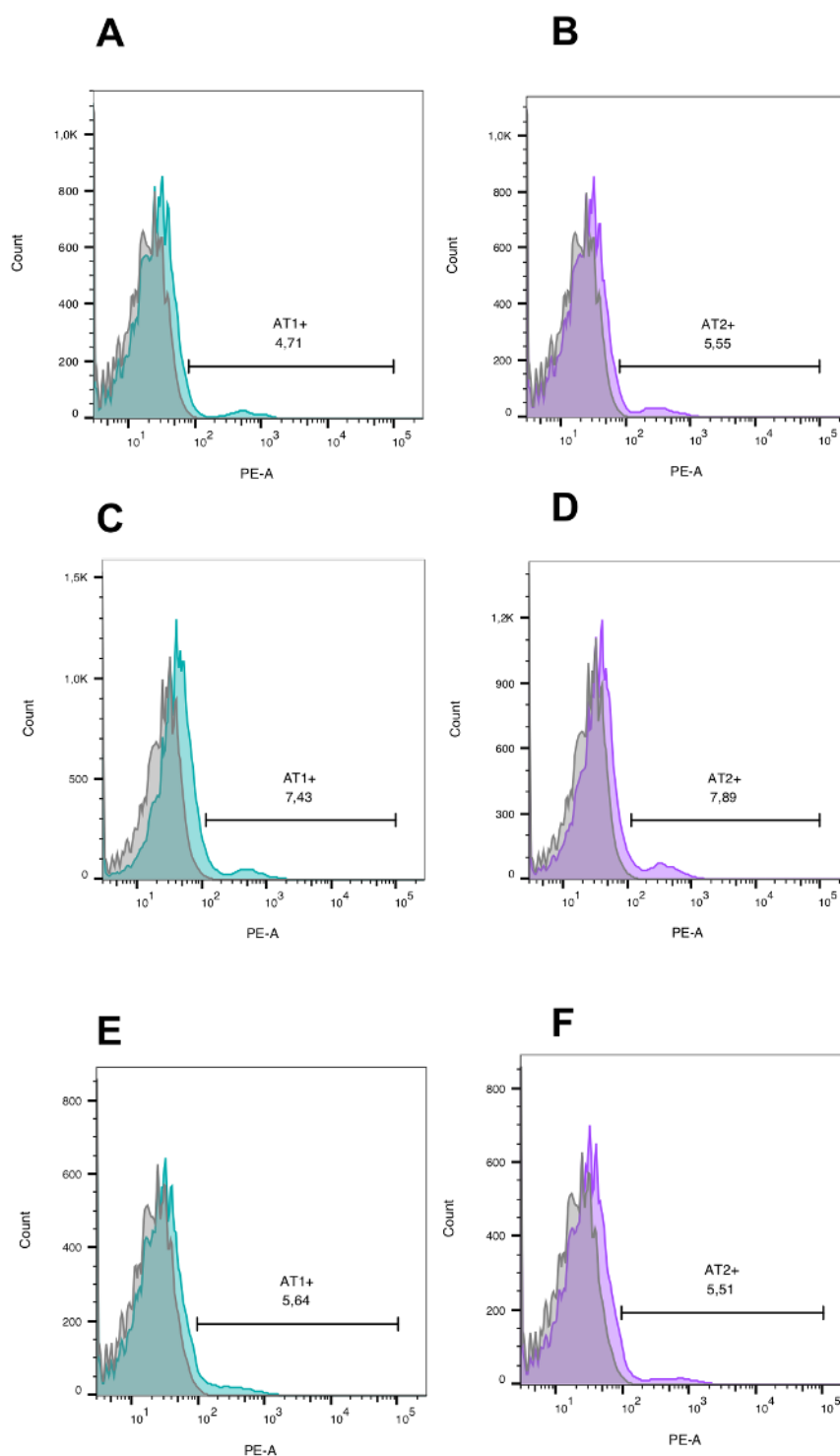


Figura 21: Imunomarcaco dos receptores AT1 e AT2 da Ang II em células da polpa dentária dos participantes da pesquisa 1 (**A e B**), 2 (**C e D**) e 3 (**E e F**) em condies basais de cultivo, obtidas após análise em citômetro de fluxo BD FACSAriaTM Fusion Cell Sorter. **A, C e E** correspondem a porcentagem de células marcadas para o receptor AT1 da Ang II (histograma verde) em relação às células não marcadas (histograma cinza). **B, D e F** Correspondem a porcentagem de células marcadas para o receptor AT2 da Ang II (histograma roxo) em relação às células não marcadas (histograma cinza).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez que foram observadas, baixas porcentagens dos receptores AT1 nestas células estudadas e, com o intuito de se obter uma amostra na qual houvesse uma maior porcentagem destas células AT1+, foi realizada uma tentativa de seleção das mesmas pela técnica de *sorting*, seguido de uma tentativa de cultivo *pós-sorting* e expansão das culturas celulares com as mesmas condições de cultivo realizadas previamente. No entanto, as células recuperadas não garantiram uma quantidade suficiente para o estabelecimento e expansão de uma nova cultura, o que inviabilizou a continuidade deste experimento.

4.5.1 Expressão dos receptores AT1 e AT2 após estímulo com IL-1 β

As células estimuladas com 0,1 ng/mL de IL1 β por 24h antes da análise de expressão dos receptores AT1 e AT2, por citometria de fluxo, no contexto geral, não apresentou grandes variações. Apenas a marcação de AT1, na gengiva e AT2 na polpa, foi verificado aumento da intensidade de fluorescência (**Tabela 3**).

Tabela 3: Média geométrica da intensidade de fluorescência da imunomarcação dos receptores AT1 e AT2 nas células orais.

Amostra	Média geométrica (intensidade da fluorescência)					
	AT1R			AT2R		
	Controle não marcado	Controle marcado	IL1 β 24h	Controle não marcado	Controle marcado	IL1 β 24h
Gengiva	489	598	642	489	543	540
Ligamento periodontal	217	317	306	217	295	289
Polpa	65	176	174	65	144	151

Fonte: Elaborado pelo autor.

5

Discussão

5 DISCUSSÃO

São diversos os relatos científicos acerca das funções inflamatórias exercidas pela Ang II quando ligadas, principalmente, aos receptores AT1 em diversas células e tecidos (SEGAWA et al., 2003; VALENTE et al., 2012; VOGIATZI et al., 2013). Logo, foi possível hipotetizar que a Ang II, ligada aos receptores AT1 de fibroblastos oriundos de tecidos orais, fosse capaz de modular processos imunoinflamatórios em patologias orais, tais como, gengivite, periodontite e pulpite. Porém, o que se observou neste estudo, foi que estas células, apesar de terem respondido aos estímulos de Ang II para alguns mediadores, em alguns tempos experimentais, também responderam, de maneira semelhante, estando em contato, com os antagonistas dos receptores AT1 (valsartan) e AT2 (PD123319), nas condições experimentais adotadas.

Os fibroblastos, além de serem células estruturais, importantes para integridade e reparo tecidual, as mais numerosas do tecido conjuntivo oral, também são considerados células sentinelas, desempenhando um papel importante no processo inflamatório, sendo capazes de expressar e produzir diversos mediadores inflamatórios, como MIP1 α , SDF1/CXCL12, IL6, CXCL8/IL8, TGF β , IL1 β , frente a estímulos de origem bacteriana como LPS de *P. gingivalis*, *Escherichia coli*, e ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis* e também, frente a outras citocinas, como IL1 β (COLOMBINI-ISHIKIRIAMA et al., 2020; DE FARIA MORANDINI et al., 2011; GABRIELE et al., 2017; MORANDINI et al., 2013a, 2010, 2013b; SIPERT et al., 2010). Além disso, a Ang II também tem sido responsável pela modulação de mediadores inflamatórios em células de diversos tecidos, como tecido adiposo, endotélio, rins e células de ilhotas pancreáticas (RUIZ-ORTEGA et al., 2002; SAUTER et al., 2015; SKURK; VAN HARMELEN; HAUNER, 2004; VALENTE et al., 2012). Levando-se em consideração este conjunto de evidências, bem como a expressão gênica dos receptores AT1 e AT2 e imunomarcagem fluorescente positiva do receptor AT1 em fibroblastos orais humanos (MONNOUCHI et al., 2011; SANTOS et al., 2015), foi estimulada e fundamentada a realização deste trabalho.

As células orais utilizadas, foram obtidas com sucesso pela técnica de *explant*, de todos os 3 tecidos (gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária), para

os 3 participantes da pesquisa, e caracterizados como fibroblastos pela morfologia e imunomarcagem positiva para FSP, apesar de não ter sido possível a exclusão da presença células mesenquimais estromais, e por isso, se faz importante assumir que as culturas primárias utilizadas, podem conter estas células em proporções variadas, e esta variabilidade possa vir a ter alguma influência nos resultados obtidos (DENU et al., 2016)

A concentração utilizada de Ang II (10^{-6} M) foi definida baseada na literatura, sendo escolhida a concentração efetiva mais utilizada (MENG et al., 2014; NAKAI et al., 2013; SCHEUREN et al., 2002; SEGAWA et al., 2003; WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2013a; ZHOU et al., 2017). Entretanto, tanto a concentração definida quanto uma mais concentrada (10^{-5} M), não se mostraram tóxicas nas análises de citotoxicidade e viabilidade celular. A dose próxima das condições fisiológicas seria de 10^{-9} M de Ang II, no entanto, em experimentos com este peptídeo, é comum o uso de doses suprafisiológicas, levando em consideração sua rápida degradação nas condições de cultivo (SKURK; VAN HARMELEN; HAUNER, 2004). A única concentração que mostrou efeito citotóxico foi a de valsartan a 10^{-3} M, fato que pode ser explicado devido ao veículo em que é recomendada sua reconstituição, o DMSO. É sabido que ele exerce efeitos deletérios às células, dependendo da concentração e condições utilizadas, devendo ser ajustado o volume utilizado à proporção limite de uso em culturas vivas, principalmente em experimentos que envolvam análises de expressão gênica, o qual a proporção de até 0,5% parece ter sido bem tolerada em hepatócitos humanos e de ratos (SUMIDA et al., 2011). Neste estudo, a proporção de valsartan/DMSO em meio de cultura, foi de 0,1%.

A escolha dos mediadores inflamatórios para a condução deste estudo, baseia-se em resultados de autores que detectaram o papel modulador da Ang II em fibroblastos renais, cardíacos e pulmonares (MATSUZUKA et al., 2009; SCHEUREN et al., 2002; YOKOYAMA et al., 1999).

Quanto aos resultados de expressão gênica, obtidos nas condições em que foram realizadas este estudo, é possível observar primeiramente que, em 24 h de estímulo, a Ang II não foi capaz de modular a expressão de nenhum dos mediadores inflamatórios estudados, este período experimental foi, portanto, excluído das análises futuras. Em 3 e 6h de estímulo, a Ang II parece ter sido responsável pelo aumento da expressão de CXCL8 e PTGS2 pelas células dos 3 tecidos dos 3 participantes da

pesquisa, quando comparadas ao grupo controle, que eram células em meio basal de cultivo, sem estímulo. Neste mesmo experimento, em todos os tecidos de todos os participantes, em 3 e 6h de estímulo com Ang II, houve diminuição da expressão do receptor AT1.

Em cada um dos experimentos de expressão de mRNA, foi utilizado apenas 1 grupo controle de células não estimuladas (em meio basal de cultivo, sem estímulo), em um único tempo experimental, para cada tipo celular avaliado. Considera-se que, isso pode ter influenciado algumas variações entre a resposta das células frente ao estímulo com Ang II. Entende-se, portanto que pode ter sido uma limitação do presente estudo, e a inclusão de 1 grupo controle de células não estimuladas deveria ser utilizado, em cada tempo experimental, medida que será adotada em experimentos futuros. Entretanto, isso parece nos fornecer a ideia de que a resposta destas células, frente ao estímulo com Ang II, se presente, é muito sutil. Por exemplo, no experimento em que foi adicionado o estímulo com IL1 β , a resposta por parte das células foi tão acentuada, que o fato de ter sido utilizado apenas 1 único tempo experimental para o grupo controle, não parece interferir na resposta obtida. Além disso, conforme citado anteriormente, os fibroblastos são células muito responsivas, além de estímulos de origem bacteriana, até mesmo o estresse mecânico é capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo, TNF α e TGF β , além de outros fatores biológicos, como ALP e AGT (MONNOUCHI et al., 2011; YOKOYAMA et al., 1999).

A escolha da IL1 β , como estímulo pró-inflamatório anterior ao estímulo com Ang II, é baseado em estudos prévios que demonstraram a capacidade desta citocina na indução da expressão do receptor AT1, em diferentes tipos celulares (GURANTZ et al., 2005; YOSHIDA et al., 2006). Fibroblastos gengivais humanos estimulados com 0,1 ng/mL de IL1 β , apresentaram aumento da expressão do receptor AT1 por RT-PCR e da proteína por *western blot*, quando comparados ao grupo não estimulado (NAKAMURA et al., 2011). Gabriele et al. (2017), também observaram aumento da expressão de mRNA para o receptor AT1, após estímulo com IL1 β . Neste trabalho, utilizamos 0,1ng/mL de IL1 β pelo período de 24h como estímulo prévio à adição de Ang II, com intuito de aumentar os sítios de ligação da Ang II e tentar verificar um possível efeito aditivo ou sinérgico entre estas duas moléculas, o que não foi

observado no presente estudo. Adicionalmente, após 24, 27, 30 e 48h de estímulo isolado de IL1 β , a expressão de mRNA para os receptores AT1 e AT2, se mantiveram semelhantes ao grupo controle, sem que tenha sido observada diferenças significativas, em nenhum dos tipos celulares deste estudo.

Após o estímulo com IL1 β nestas células, observou-se aumento de diversos mediadores inflamatórios, tais quais, CXCL8/IL8, PTGS2, CCL2, IL6, IL1 β , quando comparado com o grupo de células não estimulado. Gabrielle et al., 2017, também verificaram o aumento de CXCL8/IL8, IL6 e IL1 β , após estimular os fibroblastos orais com a mesma citocina. E no estudo de Nakamura et al. (2011), a produção de IL6 também foi aumentada em fibroblastos gengivais, a partir do mesmo estímulo. Percebe-se, portanto, grande capacidade pró-inflamatória desta citocina em células oriundas de tecidos orais. Embora haja relatos de sinergismo entre a IL1 β e Ang II, aumentando a produção de COX-2 em fibroblastos pulmonares (MATSUZUKA et al., 2009) e aumentando MCP1 e IL6 em células mesangiais (ALIQUE et al., 2015) por exemplo, este fenômeno não foi observado no presente estudo. O estímulo isolado de Ang II não foi capaz de gerar a mesma resposta na expressão de mRNA comprado ao estímulo com IL1 β , o qual aumentou de forma expressiva e significativa as expressões dos RNAm analisados. Como mencionado anteriormente, a Ang II, nas condições experimentais deste estudo, não foi capaz de sustentar a inflamação iniciada pela IL1 β ao longo do tempo, em quase todos alvos, pois há uma queda na expressão destes mesmos marcadores, sendo mais evidente em 24h após a remoção da IL1 β e adição de Ang II, chegando próximo dos níveis basais. Quando ambas moléculas foram mantidas nas culturas celulares, pelos tempos experimentais de 3, 6 e 24h de adição de Ang II, nas células que já estavam em contato com a IL1 β há 24h, e comparamos com os grupos de períodos experimentais de 27, 30 e 48h de estímulo com a IL1 β isolada, percebe-se que não houve mudança significativa na expressão, com a adição de Ang II, sugerindo que a resposta se manteve sustentada pela IL1 β . Logo, é possível inferir que não houve efeito sinérgico entre as moléculas. Adicionalmente, a IL1 β foi capaz de manter o processo inflamatório por um longo período após sua adição nas culturas celulares, sendo o tempo máximo deste estudo de 48h.

Há relatos de que, tanto o silenciamento quanto o bloqueio farmacológico, dos receptores AT1 foram capazes de atenuar a expressão de IL8 após estímulos como IL1 β e LPS em fibroblastos orais, (GABRIELE et al., 2017; VOGIATZI et al., 2013), conferindo assim a este receptor uma função pró-inflamatória. Contudo, até este momento não foram relatadas na literatura as respostas de expressão e produção de citocinas inflamatórias de fibroblastos orais estimulados com Ang II.

Após cuidadosa análise dos resultados obtidos neste trabalho, entende-se que, algumas modificações metodológicas poderiam ajudar a melhor compreensão dos resultados obtidos, como já mencionado em relação à adoção de mais grupo controles de células não estimuladas, conforme os tempos experimentais. Outro ponto importante seria testar diferentes concentrações, tanto de Ang II, quanto do valsartan. Estas adaptações metodológicas serão adotadas nos próximos experimentos do grupo de pesquisa.

Os resultados deste estudo sugerem, que, nas condições experimentais adotadas, os fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária não demonstraram um papel importante no estabelecimento e/ou manutenção do processo inflamatório local, frente ao estímulo com Ang II.

6

Considerações

Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das condições metodológicas utilizadas neste estudo, foi possível concluir que:

Nas culturas primárias de fibroblastos humanos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dentária:

- Em 24h de estímulo, Ang II não foi capaz de modular a expressão gênica de nenhum dos mediadores inflamatórios estudados;
 - A Ang II parece ter exercido um papel modulador sutil do processo inflamatório em 3 e 6h, principalmente para CXCL8 e COX2, sendo que os fármacos antagonistas de AT1 e AT2, não foram capazes de atenuar;
 - Tanto o estímulo de IL1 β isolado, quanto combinado com a Ang II, aumentaram a expressão de mRNA dos mediadores pró-inflamatórios CXCL8, PTGS2, CCL2, IL6 e IL1 β , sem que tenha sido observado efeito aditivo ou sinérgico entre elas;
 - Expressão de mRNA dos receptores AT1 e AT2 não se alterou com estímulos de IL1 β .
-
-

7

Cotutela

7 COTUTELA

De maneira complementar ao estudo realizado no Brasil, foi desenvolvido o projeto intitulado: “**Papel da Angiotensina II e da Angiotensina 1-7 no metabolismo de células ósseas humanas**”, na FMDUP em Portugal. Para além disso, o Acordo de Doutoramento em Regime de Cotutela Internacional estabelecido entre a Universidade do Porto e Universidade de São Paulo (Processo 2019.1.921.25.4), possibilitaram matrícula e a titulação Doutoral também por ambas instituições de ensino. Disciplinas e créditos foram cursadas e obtidas tanto na FOB-USP quanto na FMDUP.

7.1 INTRODUÇÃO

A reabsorção óssea alveolar, é uma característica importante da doença periodontal, uma patologia que acomete os tecidos de sustentação dos dentes e pode evoluir para a perda dentária (CHIANG et al., 1999; TANG et al., 2018). Embora seja iniciada por bactérias presentes na superfície do dente e no sulco gengival (como por exemplo, a *Phophyromonas gingivalis*), a resposta imunológica do hospedeiro, desempenha um papel fundamental no processo de degradação do tecido conjuntivo e ósseo, sendo as citocinas, um mecanismo intermediário, entre o estímulo bacteriano e o dano tecidual, responsáveis por estimular eventos inflamatórios que ativam mecanismos efetores (GRAVES, 2008). O SRA também vem sendo considerado uma via inflamatória e de influência óssea (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2015). Ang II, tem sido implicada na patogênese de desordens ósseas inflamatórias, como osteoporose (SHIMIZU et al., 2008), artrite (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2015) e doença periodontal (SANTOS et al., 2015; TANG et al., 2018). Estudos prévios mostraram que osteoblastos e osteoclastos expressam receptores de Ang II, no entanto, as ações da Ang II são controversas (IZU et al., 2009; NAKAI et al., 2013; SHIMIZU et al., 2008). Para além da Ang II, uma outra molécula do SRA, tem sido destacada no estudo do metabolismo ósseo, a Angiotensina 1-7 (Ang 1-7). A Ang 1-7 é um heptapeptídeo, que tem como principal via de formação pela ação de ECA2 a partir da Ang II, e exerce

suas funções quando ligado ao seu receptor MAS (ECA2/Ang 1-7/MAS), promovendo atividade protetora nas inflamações e doenças cardiovasculares, além de contrarregulador das funções clássicas da Ang II, após a ligação com o receptor AT1, inibindo o estresse oxidativo, fibrose e proliferação celular, além de estimular a vasodilatação (LIANG et al., 2015; MENG et al., 2014; SANTOS et al., 2015, 1988; TAMARGO; TAMARGO, 2017). Abuohashish e colaboradores (2017), verificaram que a Ang 1-7 foi capaz de melhorar o metabolismo ósseo alterado e a microarquitetura, além de acentuar o processo de mineralização e atenuar a osteoclastogênese, sendo que o bloqueio do receptor MAS, pelo antagonista A-779, eliminou acentuadamente os efeitos favoráveis da Ang 1-7 sobre a saúde óssea, sugerindo o papel importante do receptor MAS na mediação dos efeitos osteoprotetores da Ang (1-7).

A ação coordenada entre reabsorção óssea, por osteoclastos, e síntese óssea, por osteoblastos, está constantemente moldando o tecido ósseo (RODRIGUES et al., 2014). Osteoblastos e osteoclastos são células do tecido ósseo e pertencem a linhagem osteoblástica e osteoclástica, respectivamente, sendo que as primeiras são derivadas de células osteoprogenitoras de origem mesenquimal e as últimas originadas de monócitos, produzidos na medula hematopoiética. Os osteoblastos, são células que se dispõem lado a lado, lembrando um epitélio simples e sintetizam parte orgânica da matriz óssea (como colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas), além de fatores capazes de influenciar a função de outras células ósseas. Secretam também, altos níveis de ALP e participam da mineralização da matriz por serem capazes de concentrar fosfato de cálcio, além disso, sintetizam as metaloproteinases de matrix (MMPs), que são enzimas capazes de catalisar a renovação da matrix extracelular. Já os osteoclastos, são células móveis, grandes e multinucleadas, responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, e suas atividades são coordenadas por citocinas e hormônios. A interação entre esses dois tipos celulares, é importante no processo de remodelação óssea (JOLLY et al., 2018; NAKAI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014). Os osteoclastos, expressam elevados níveis de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e promovem a reabsorção óssea através da secreção de íons de hidrogênio e enzimas líticas, (como por exemplo a catepsina K), que iniciam eventos de remodelação óssea (RODRIGUES et al., 2014). Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), é um dos mais potentes indutores de formação e atividade osteoclástica, ele se liga ao receptor

ativador do fator nuclear kappa B (RANK), sendo que essa ligação pode ser inibida pela OPG.

7.2 OBJETIVOS

Realizar, *in vitro*, a caracterização do efeito da Ang II e da Ang 1-7 no comportamento de **(1)** monoculturas de linhagens celulares osteoblásticas, **(2)** monoculturas de linhagens celulares osteoclásticas e **(3)** co-culturas indiretas de células osteoblásticas e osteoclásticas.

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

7.3.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares osteoblásticas humanas utilizadas no estudo foram: Saos-2 (ATCC® HTB-85™) e MG-63 (ATCC® CRL-1427™), mantidas em MCCOY'S 5a (Sigma-Aldrich) e EMEM (ATCC®) respectivamente, suplementados com 10% de SFB, 100 UI/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B (meio de cultura basal completo). Ambas são células aderentes, e modelos de cultura amplamente utilizados para estudos *in vitro* da biologia celular dos osteoblastos. As MG-63 apresentam um modelo de estudo de osteoblastos imaturos, enquanto que, as Saos-2 possuem um fenótipo maduro com produção de altos níveis de fosfatase alcalina (ALP) e possuem um perfil de expressão de citocinas e fatores de crescimento semelhantes aos osteoblastos humanos normais (CZEKANSKA et al., 2012). O modelo celular utilizado para estudo osteoclástico, foi a linhagem celular monocítica em suspensão, THP-1 (ATCC® TIB-202™), que pode ser diferenciada em macrófagos e em osteoclastos (LI et al., 2017).

7.3.2 Otimização das condições experimentais de cultura

Uma série de experimentos foram conduzidos, a fim de, otimizar as condições de cultivo, como densidade celular, caracterização das populações

celulares, morfologia, padrão de crescimento, tempo de cultivo (dados não mostrados). Outra condição importante, é quanto a adição de fatores osteogênicos. Os fatores osteogênicos induzem a diferenciação osteoblástica e permitem o estudo de diferentes estágios do fenótipo osteoblástico (CZEKANSKA et al., 2012). Sendo assim, para além dos componentes do meio de cultura basal, também foi avaliada, apenas nas MG-63, a atuação das angiotensinas em estágios mais iniciais ou mais tardios da diferenciação osteoblástica, pela adição de ácido ascórbico (50 ug/mL), β -glicerofosfato (10 mM) e dexametasona (10 nM), denominado como meio de cultura osteogênico.

7.3.3 Caracterização das linhagens osteoblásticas e osteoclásticas

7.3.3.1 Ensaio MTT

A atividade metabólica das células foi verificada por meio do ensaio *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT). Para isso, nas células em cultura, foi adicionado 0,5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich), em volume correspondente a 10% da quantidade total de meio em cada poço. Após incubação de 4 horas, nas condições ideais de cultivo (37°C, 5% CO₂), o sobrenadante foi removido e DMSO (Panreac) foi adicionado por 15 min, em TA. A absorbância em 550nm, foi avaliada em leitor de placas Synergy HT (Biotek; Bad Friedrichshall, Germany)

7.3.3.2 Quantificação da proteína total

A proteína total de cada amostra foi quantificada a partir dos lisados celulares (obtidos após incubação com Triton X-100, por 30 min), por meio do kit DC™ Protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., seguindo instruções do fabricante.

7.3.3.3 Atividade da ALP

A atividade da ALP foi determinada a partir dos lisados celulares, obtidos após o tratamento com 0,1% Triton X-100 em H₂O por 30 minutos. O ensaio é baseado na hidrólise do *p-nitrophenyl phosphate* 25mM (p-NPP, 0,0066 g/mL, Sigma-Aldrich), em buffer alcalino (pH 10,3) incubados a 37°C, por 1 hora (placas de 96 poços). A

reação foi interrompida pela adição de 20µL de NaOH 5M (Sigma-Aldrich) em cada poço e determinação colorimétrica por leitura da absorbância em 405nm, em leitor de placa Synergy HT, Biotek. Os resultados foram normalizados pela proteína total e expressos em nmol/min/µg de proteína.

7.3.3.4 Imunomarcação de citoesqueleto e núcleo celular

Monoculturas de MG-63 e Saos-2 foram submetidas a marcação de filamentos de actina e núcleo celular. Para isso, após cultivo, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS. As células foram fixadas pela adição de formaldeído a 3,7%, por 10 min. Para a marcação, foi realizada a permeabilização celular com Triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich) em PBS, por 15 min, em TA. Seguiu-se com incubação com 1% BSA em PBS e posterior marcação dos filamentos de actina com AlexaFluor® 488 *phalloidin* (1:100, Molecular Probes), por 1h. A marcação do núcleo foi realizada com Hoechst (8µg/mL, Enzo Life Science). As imagens foram capturadas em Celena® S *digital image system* (Logos Biosystems).

7.3.3.5 Atividade da TRAP

Atividade da TRAP foi verificada nas células THP-1, previamente diferenciadas em macrófagos, ao longo dos tempos experimentais. Para isso, os poços das placas com as células foram lavados com PBS 1x e as células solubilizadas com Triton X-100 0,1% em água deionizada por 30 min. Em seguida, os extratos foram incubados com 12,5 mM pNPP em 0,04 M ácido tartárico e 0,09 M citrato (pH 4,8), por 1 h, a 37°C (COSTA-RODRIGUES et al., 2011). A reação foi interrompida com 5M NaOH e a absorbância (405nm) das amostras foi obtida com o leitor de placas Synergy HT, Biotek.

7.3.4 Ang II e Ang 1-7 nas monoculturas osteoblásticas

Após ajustar melhores tempos e condições experimentais, a caracterização do efeito da Ang II e Ang 1-7 no comportamento de monoculturas das linhagens celulares osteoblásticas, foi realizado conforme esquema a seguir (**Figura 22**).

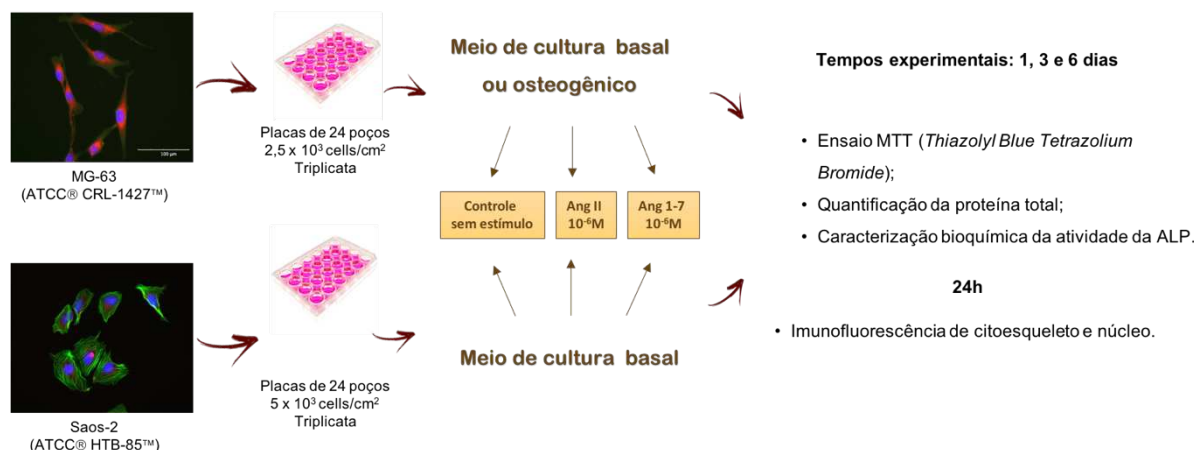


Figura 22: Esquema da metodologia realizada para avaliar o efeito da Ang II e da Ang 1-7 no comportamento de monoculturas das linhagens osteoblásticas deste estudo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.3.5 Análise de expressão gênica por RT- qPCR dos componentes do SRA e marcadores osteoblásticos

Para análise de expressão gênica, Saos-2 e MG-63 foram semeadas nas densidades de 1×10^4 células/cm² e 2×10^4 células/cm², respectivamente, em placas de 6 poços, com um volume final de 2mL de meio de cultura completo correspondente (MG-63: basal ou osteogênico/ Saos-2: basal). Após o período de adesão celular, o meio foi trocado e Ang II e Ang 1-7, na concentração de 10^{-6} M, foram adicionadas. Passado 24 horas da adição do estímulo, as células foram lisadas com Trizol™ Reagent (Ambion®, Invitrogen) e armazenadas em -80°C até o momento da extração do RNA. RNA total foi extraído, conforme instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria a 260/280nm em leitor Synergy HT, Biotek. A partir da quantificação (ng/μL), as amostras de RNA extraídas de MG-63 foram normalizadas para 0,5μg/mL e as amostras extraídas de Saos-2 foram normalizadas para 0,2μg/mL e o DNA complementar foi obtido por meio de reação de transcrição reversa, NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (Nzytech). Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi realizado para os genes do SRA: AT1R (qHsaCED0045234), AT2R (qHsaCID0017443), MASR (qHsaCED0044308), ECA (qHsaCID0017867), ECA2 (qHsaCED0044301), AGT (qHsaCED0044628) e REN (qHsaCED0045164) e para os marcadores osteoblásticos: RANKL (TNFSF11 – qHsaCID0015585), OPG (TNFRSF11B - qHsaCED00046251), RUNX2 (qHsaCED0044067), BGLAP (qHsaCED0038437), COL1 (qHsaCED0043248), SP7 (qHsaCED0003759) e ALP

(qHsaCED00045991). O gene utilizado como referência foi o GAPDH (qHsaCED0038674). A expressão gênica foi quantitativamente determinada, em equipamento RT-qPCR (CFX96, BioRad) usando iTaq™ SYBR® Green Supermix (BioRad). A média dos valores obtidos, foram normalizados pelos valores de GAPDH correspondentes a cada reação, e também a partir do grupo de células não estimulado. Análise estatística foi realizada no *GraphPad Prism* (versão 9.0.2 (134)). Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão, e analisados por meio do teste de análise de variância ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Kruskal-walis*. A significância estatística foi fixada em 5%.

7.3.6 Co-cultura indítera de osteoblastos e osteoclastos humanos

Um modelo de co-cultura indireta das células osteoblásticas e osteoclasticas foi estabelecido, conforme esquema a seguir (**Figura 23**). Para isso, as linhagens celulares MG-63 e THP-1, foram cultivadas utilizando Transwell-Clear® inserts com membranas de poliéster com poros de 0,4µm (Corning®), que são utilizados para estudos envolvendo transporte de fármacos.

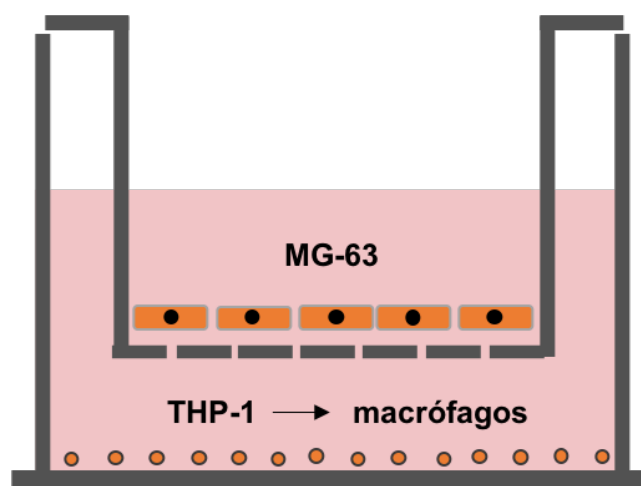


Figura 23: Esquema do modelo de co-cultura indireta utilizado. O inserto Tranwell® com as MG-63 aderidas à membrana, é encaixado a placa de 24 poços em que as THP-1 foram previamente diferenciadas em macrófagos e estão aderidas ao fundo do poço. O volume final de meio no poço da placa é de 0,6mL e no *insert* é de 0,1mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Sistemas de co-cultivo de osteoblastos e osteoclastos permitem estudar a interação entre estas células (JOLLY et al., 2018). O objetivo deste experimento foi, verificar se os estímulos de Ang II e Ang 1-7 (ambas a 10^{-6} M), adicionadas às culturas de MG-63 foram capazes de influenciar na osteoclastogênese em culturas de THP-1, que foram previamente diferenciadas em macrófagos pela adição de *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) por 48h e, adicionalmente, se isso interferiu no metabolismo das MG-63 co-cultivadas nos *inserts*. Antes de estabelecer a co-cultura, primeiramente, células THP-1 foram semeadas na densidade de $1,25 \times 10^5$ células/cm² nos poços de placas de 24 poços em meio de cultura RPMI completo, contendo 100 ng/mL de PMA e deixadas pelo período de 48 horas, tempo e concentração necessários para sua diferenciação em macrófagos (LI et al., 2017), os quais aderiram ao fundo do poço. A seguir, MG-63 foram semeadas nos *inserts* na densidade de 2×10^4 células/cm², em um volume final de 0,1mL de meio de cultura EMEM completo. Passadas as 48h, a co-cultura foi estabelecida, por meio do posicionamento do *insert* com as MG-63, no poço com os macrófagos. Neste momento, foi realizada também, a troca do meio de cultura tanto dos poços (para RPMI completo sem PMA), quanto dos *inserts*, adicionando-se EMEM completo suplementado com fatores osteogênicos (50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato e 10 nM de dexametasona) contendo ou não (Controle sem estímulo) Ang II e Ang 1-7. Os meios de cultura foram trocados parcialmente a cada 3-4 dias, tanto dos poços das placas, quanto dos *inserts*. Este mesmo experimento foi repetido, uma vez mais, entretanto, com MG-63 que já vinham sendo cultivadas em meio osteogênico, antes do estabelecimento das co-culturas. Além disso, THP-1 diferenciadas em macrófagos, foram cultivadas também em monocultura na presença e ausência de Ang II e 1-7 (10^{-6} M).

Nos *inserts* contendo células MG-63, foi avaliada a atividade da ALP, como descrito anteriormente e nos poços com THP-1, tanto em monocultura quanto co-cultura, foram realizados o ensaio da atividade da TRAP, que foi determinada conforme descrito anteriormente.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1 Caracterização do efeito da Ang II e Ang 1-7 nas monoculturas osteoblásticas

Com os resultados da análise de MTT, é possível observar que as MG-63, tanto em meio de cultivo basal, quanto em meio osteogênico, são mais proliferativas do que as Saos-2, nos dias 3 e 6 de cultivo (**Figura 24**).

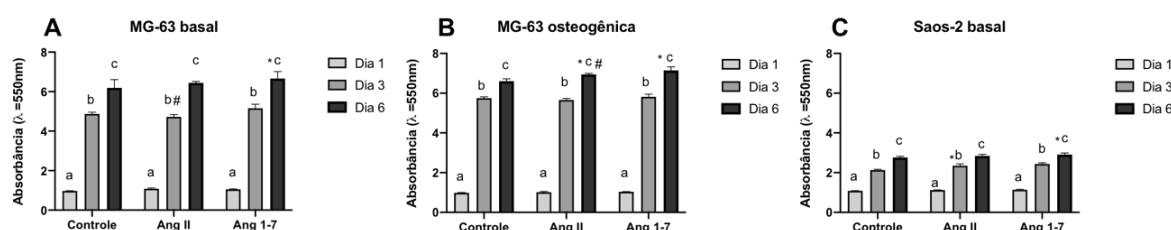


Figura 24: Representação gráfica do ensaio MTT. Taxa de proliferação/viabilidade celular das **(A)** MG-63 cultivadas em meio basal; **(B)** MG-63 cultivadas em meio osteogênico e **(C)** Saos-2 cultivadas em meio basal, ao longo dos tempos experimentais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo de estímulo. * indica diferença em relação ao controle. # indica diferença em relação ao estímulo Ang 1-7 no mesmo período. P<0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto aos resultados de atividade da ALP (**Figura 25**), as Saos-2 apresentam uma razão muito maior do que as MG-63, tanto com os estímulos osteogênicos, quanto, e principalmente, na condição basal. O estímulo com Ang II nas MG-63 cultivadas em meio basal no dia 1, foi estatisticamente menor do que as estimuladas com Ang 1-7 no mesmo período, mas não mostrou diferença em relação ao controle. Adicionalmente, o estímulo com Ang 1-7 no dia 1, foi estatisticamente maior do que o controle no mesmo período. Queiroz-Junior et al. (2019) também relataram que Ang 1-7 (10^{-6} M) aumentou a atividade da ALP em cultura de osteoblastos, entretanto, as células estavam sob cultivo em meio osteogênico e a dosagem de ALP foi aos 14 dias após adição do estímulo.

Os indutores osteogênicos adicionados nas MG-63 (osteogênica), aumentam consideravelmente desde o dia 1, até o dia 6 em relação às cultivadas em meio basal. As Saos-2 atingiram o pico máximo de atividade ao dia 3, sendo observada uma queda ao dia 6, sem, no entanto, haver diferenças entre os grupos estimulados.

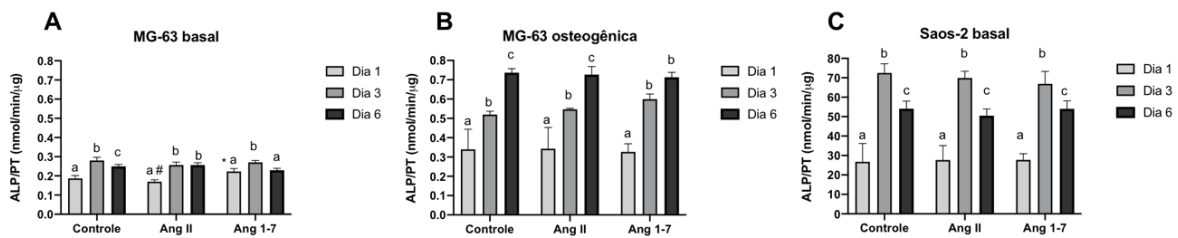


Figura 25: Representação gráfica da atividade de ALP. **(A)** MG-63 cultivadas em meio basal; **(B)** MG-63 cultivadas em meio osteogênico e **(C)** Saos-2 cultivadas em meio basal, ao longo dos tempos experimentais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo de estímulo. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao estímulo Ang 1-7 no mesmo período. $P < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A imunomarcção de citoesqueleto e núcleo celular, não revelam alterações morfológicas importantes entre os estímulos de Ang II e Ang 1-7 em relação ao Controle sem estímulo (**Figura 26**). Entretanto, é possível observar o aumento do citoplasma nas culturas de MG-63 cultivadas em meio de cultura osteogênico, indicativo do início da diferenciação celular pela adição dos indutores.

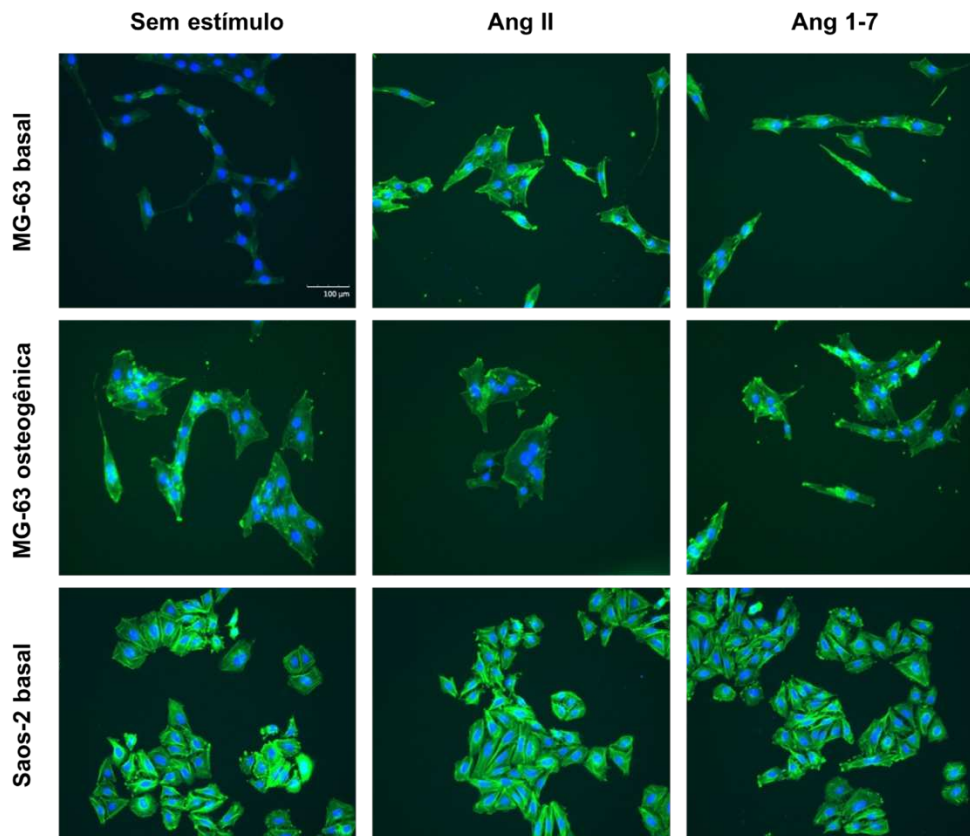


Figura 26: Microscopia de fluorescência das MG-63 em meio basal e osteogênico e das Saos-2 em meio basal, após imunomarcção do citoesqueleto em verde (AlexaFluor® 488 green – 1:100 em 1% BSA) e núcleo celular em azul (Hoechst). Barra representativa de 100µm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.2 Análise de expressão gênica por qPCR dos componentes do SRA e marcadores osteoblásticos

Pelos resultados da análise de expressão gênica relativa, dos genes dos componentes do SRA (**Figura 27**) e dos marcadores osteoblásticos (**Figura 28**), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos estímulos realizados, em relação ao grupo não estimulado (Controle). Não foi verificada expressão do receptor AT2 da Ang II no período estudado para nenhuma das células.

Tanto a modelação, quanto a remodelação óssea, são altamente reguladas por uma complexa interação de mediadores locais e sistêmicos, o que envolve mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos, traduzidos por meio de vias de sinalização intracelulares essenciais (FAKHRY, 2013). Os marcadores osteoblásticos utilizados neste estudo, foram escolhidos por fornecer informações a respeito de possíveis interferências nestas vias, indicando se os peptídeos foram capazes de alterações importantes nas monoculturas de MG-63 e Saos- 2. *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), por exemplo, é o principal fator de transcrição no ambiente nuclear, sendo considerado o regulador mestre para a expressão de genes-chave, como colágeno tipo I (COL1), ALP, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina, em um estágio inicial de diferenciação osteoblástica (FAKHRY, 2013).

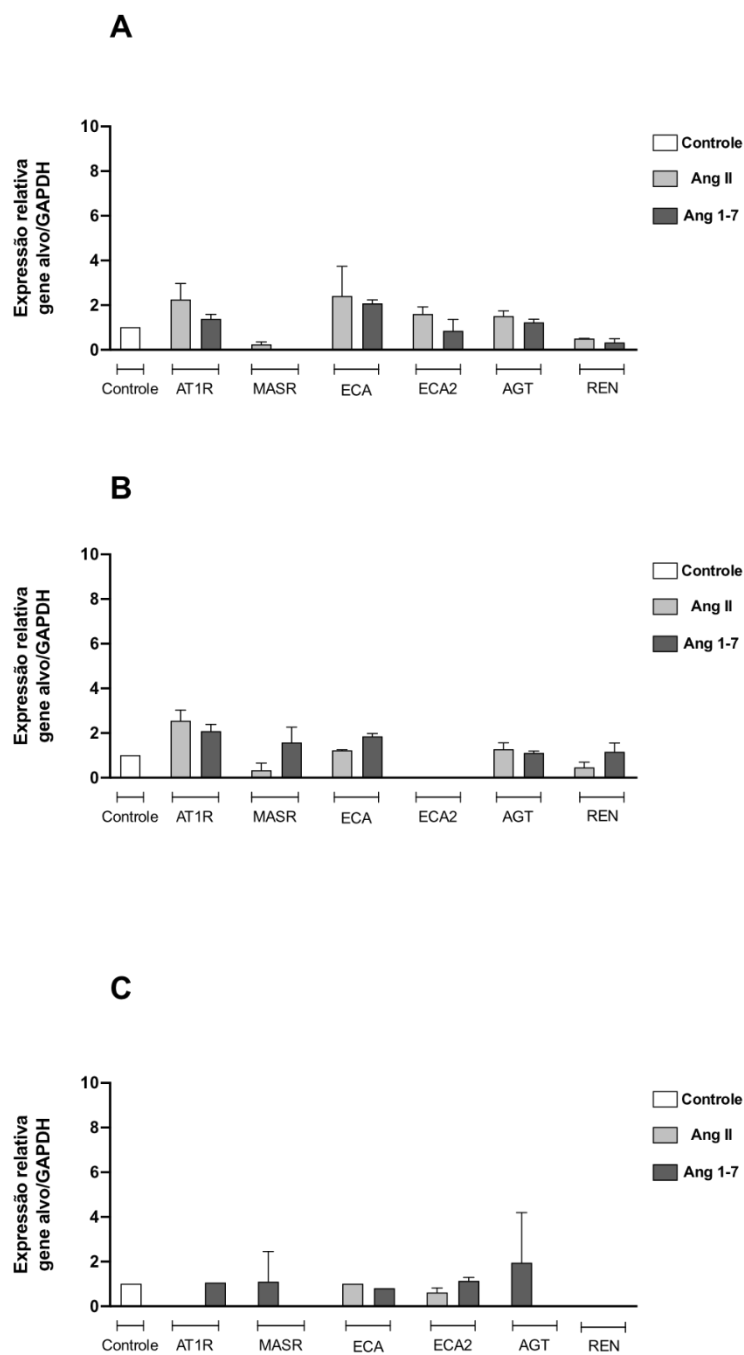


Figura 27: Representação gráfica da expressão gênica dos componentes do SRA pelas linhagens celulares osteoblásticas. MG-63 em meio de cultura basal (**A**) ou osteogênico (**B**) e Saos-2 em meio de cultura basal (**C**). Células receberam estímulo de Ang II ou Ang 1-7 (ambas a 10^{-6} M) ou não (Controle sem estímulo), pelo período de 24h. $P < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

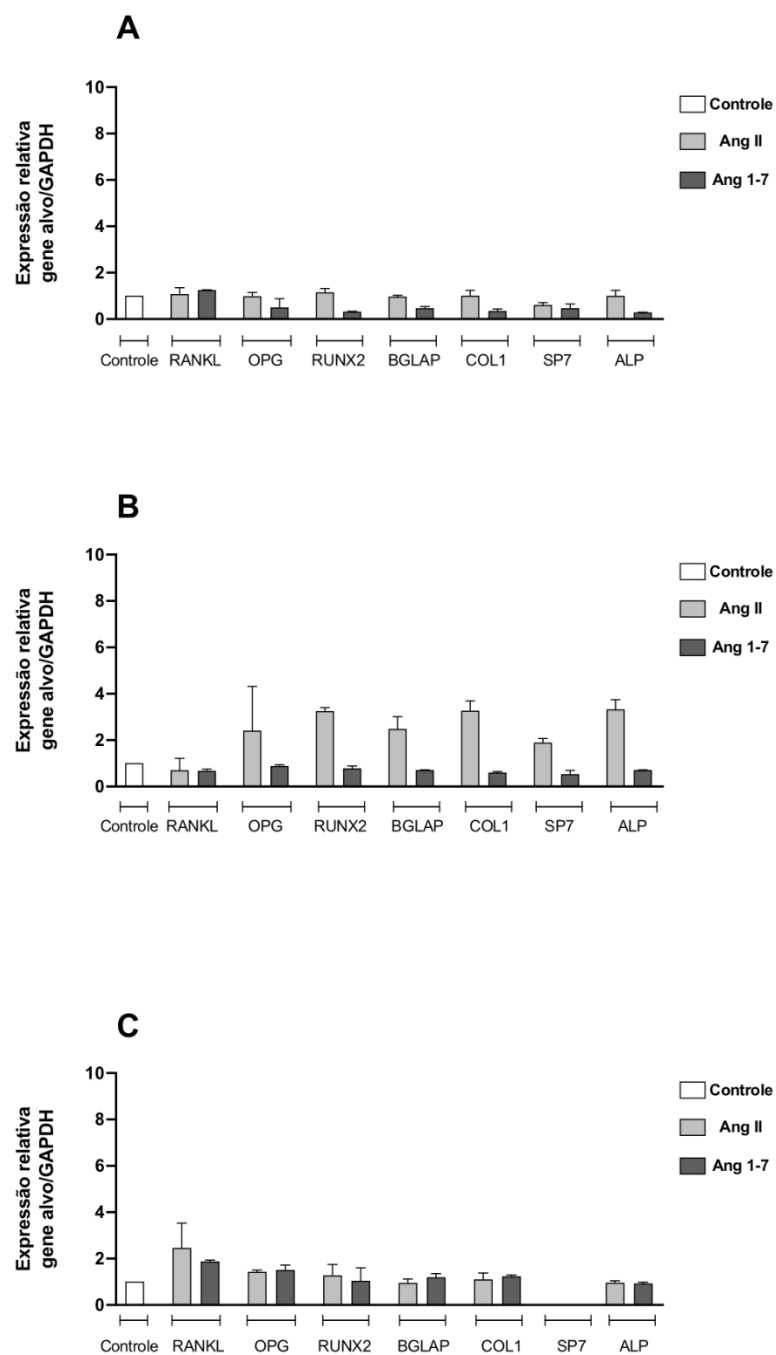


Figura 28: Representação gráfica da expressão gênica dos marcadores osteoblásticos pelas linhagens celulares osteoblásticas. MG-63 em meio de cultura basal (A) ou osteogênico (B) e Saos-2 em meio de cultura basal (C). Células receberam estímulo de Ang II ou Ang 1-7 (ambas a 10^{-6} M) ou não (Controle sem estímulo), pelo período de 24h. $P < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.3 Co-cultura indítera de osteoblastos e osteoclastos humanos

Imagens em microscópio invertido foram obtidas, ao longo dos dias experimentais, para acompanhamento da diferenciação celular, nos poços com macrófagos derivados a partir das THP-1 co-cultivados com MG-63 cultivadas em meio osteogênico (**Figura 29**) e monocultivados (**Figura 30**).

Foi possível observar que, após o tratamento com PMA, os monócitos redondos suspensos no meio de cultivo, aderiram ao fundo dos poços, e apresentaram alterações morfológicas que sugeriram a diferenciação em macrófagos (LI et al., 2017). Observou-se ainda, que as células aumentaram de tamanho e demonstraram a tendência de se fusionarem. Característica que foi ficando mais evidente ao passar do tempo.

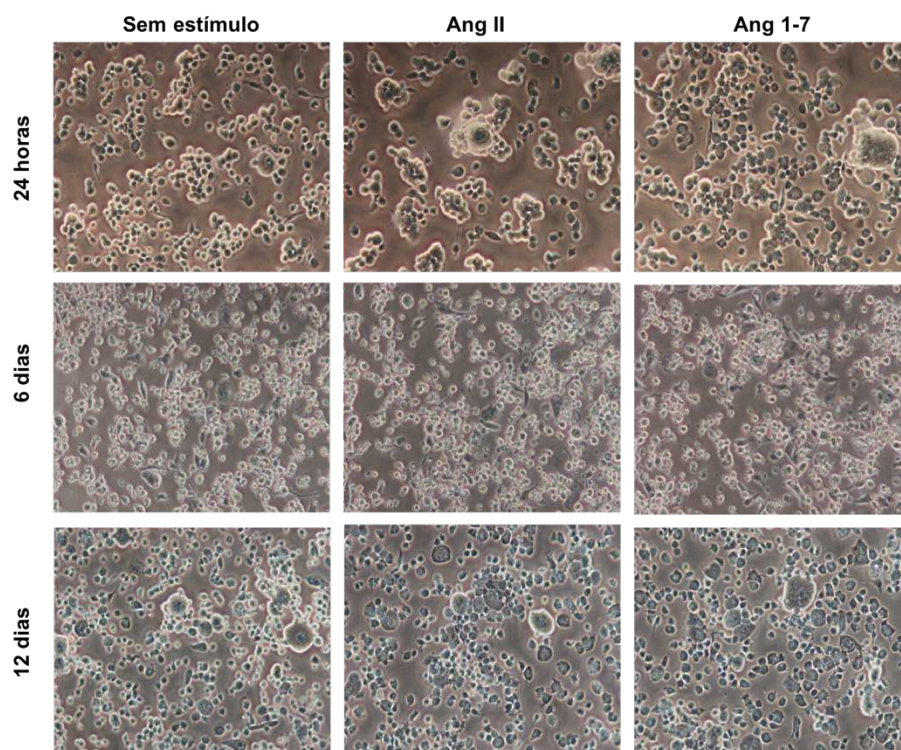


Figura 29: Imagens representativas das culturas de THP-1, previamente diferenciadas em macrófagos, e mantidas em co-cultura indireta com MG-63 cultivadas em meio osteogênico, na presença ou ausência (sem estímulo) de Ang II ou Ang 1-7 (10^{-6} M). Imagens obtidas em microscópio invertido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

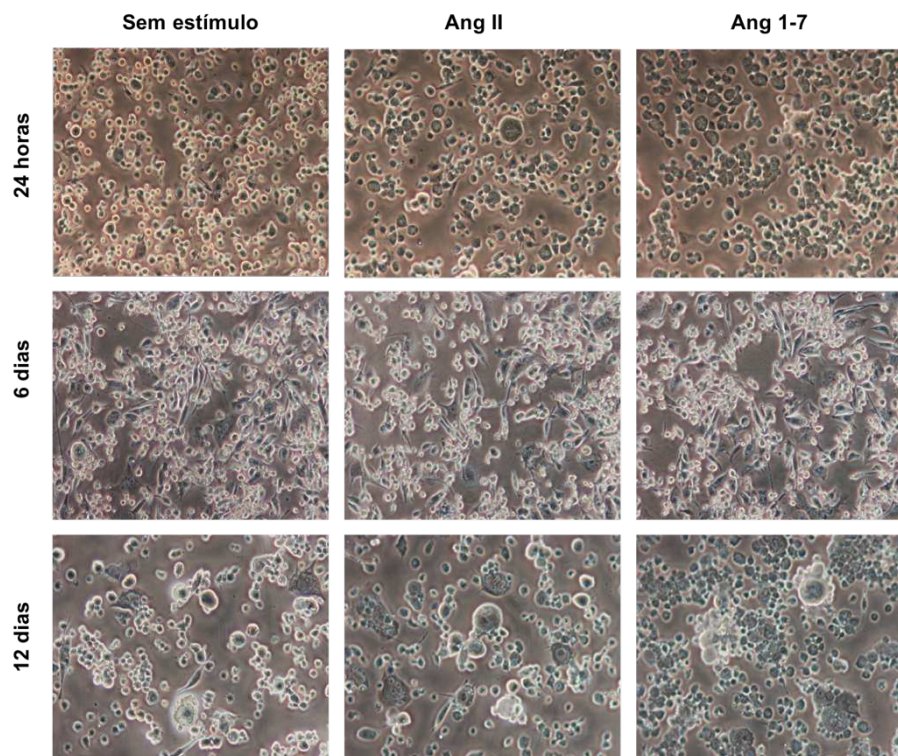


Figura 30: Imagens representativas das culturas de THP-1, previamente diferenciadas em macrófagos, e mantidas em co-cultura indireta com MG-63 cultivadas em meio osteogênico, na presença ou ausência (sem estímulo) de Ang II ou Ang 1-7 (10^{-6} M). Imagens obtidas em microscópio invertido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade da ALP das MG-63 co-cultivadas com THP-1, em ambas condições de cultivo (inicialmente basal ou que vinha recebendo indução osteogênica desde antes do estabelecimento do co-cultivo), apresentaram um padrão similar, aumentando significativamente ao dia 6, quando comparado às 24h e se mantendo até o dia 12. As únicas diferenças observadas, foram em relação aos tempos experimentais dentro de cada grupo, não sendo observado, portanto, nenhuma diferença quanto aos estímulos utilizados (**Figura 31**).

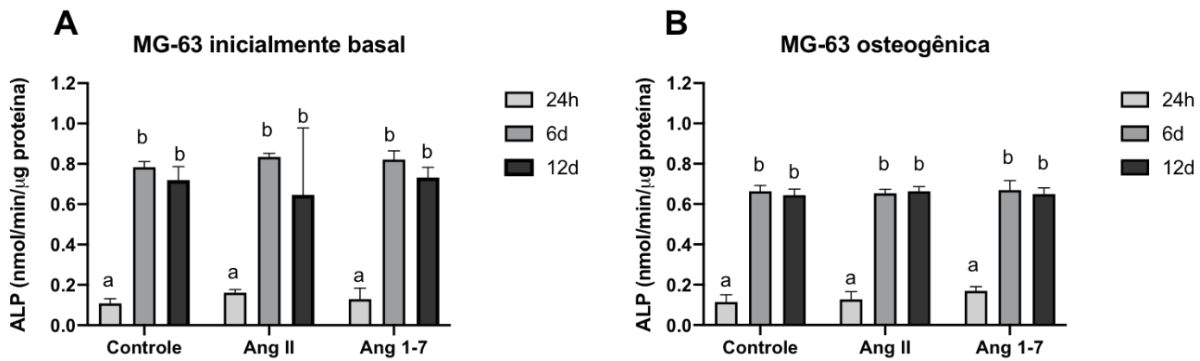


Figura 31: Representação gráfica da atividade de ALP. **(A)** ALP de MG-63 inicialmente cultivadas em meio basal e co-cultivadas com THP-1 por 24h, 6 dias e 12 dias; **(B)** ALP de MG-63 cultivadas em meio osteogênico e co-cultivadas com THP-1 por 24h, 6 dias e 12 dias. A concentração de Ang II e Ang 1-7 utilizada foi de 10^{-6} M. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas dentro de cada estímulo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar que, em co-cultivo com as MG-63 (em ambas condições), a atividade da TRAP, por THP-1 diferenciados em macrófagos, foi maior do que quando monocultivados. Mostrando que a interação entre as células tiveram um efeito importante no comportamento fenotípico.

Além disso, quando os macrófagos foram co-cultivados com as MG-63, que já vinham sendo mantidas sob indução osteogênica, antes do estabelecimento da co-cultura, o dia 6 experimental, foi o período de maior atividade da TRAP. Entretanto, macrófagos co-cultivados com MG-63 inicialmente mantidas em meio de cultivo basal, e que passaram a receber estímulos indutores osteogênicos exógenos, após o estabelecimento da co-cultura, a produção da TRAP, foi tempo-dependente e ao dia 12, ainda continuou a aumentar em relação ao dia 6 (**Figura 32**), sugerindo que, nestas condições, a co-cultura poderia ser mantida por mais tempo.

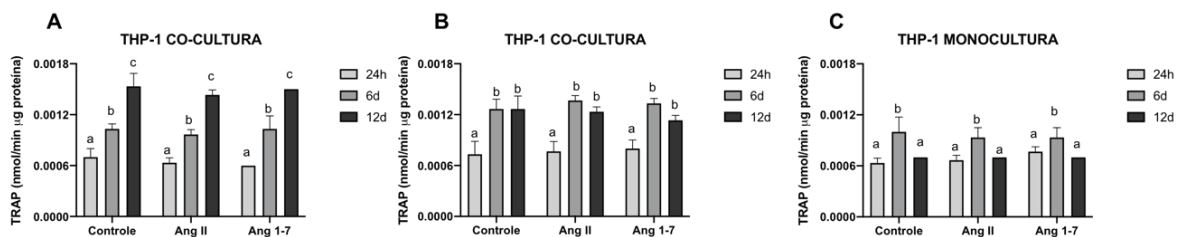


Figura 32: Representação gráfica da atividade da TRAP. **(A)** TRAP das THP-1 co-cultivadas com MG-63 em meio inicialmente basal por 24h, 6 dias e 12 dias. **(B)** TRAP das THP-1 co-cultivadas com MG-63 em meio osteogênico por 24h, 6 dias e 12 dias. **(C)** TRAP das THP-1 monocultivas por 24h, 6 dias e 12 dias. **(B)** ALP de MG-63 cultivadas em meio osteogênico e co-cultivadas com THP-1 por 24h, 6 dias e 12 dias. A concentração de Ang II e Ang 1-7 utilizada foi de 10^{-6} M. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas dentro de cada estímulo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste estudo, a Ang II e a Ang 1-7, não mostraram efeito na produção de ALP por parte dos osteoblastos co-cultivados com macrófagos, nem na formação de osteoclastos, tanto monocultivados, como co-cultivados com células osteoblásticas, por meio da observação da atividade da TRAP. Hatton, Stimpel e Chambers (1997), descreveram que após estímulos com Ang II, também não observaram efeitos na formação de osteoclastos e nem na reabsorção óssea por osteoclastos isolados, entretanto, em culturas de osteoclastos co-cultivadas com osteoblastos, observaram que a Ang II estimulou intensamente a reabsorção óssea em fragmentos ósseos.

7.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das condições que foram conduzidos os experimentos deste trabalho, foi possível concluir que:

Em linhagens celulares osteoblásticas na situação de monocultivo:

- A Ang II não interferiu na atividade da ALP em nenhum dos períodos avaliados, enquanto que a Ang 1-7 aumentou de maneira estatisticamente significativa, a atividade da ALP nas MG-63 em meio de cultivo basal, no período de 24h;
 - Não foram observadas alterações na expressão gênica relativa dos marcadores osteoblásticos, após estímulos com Ang II e Ang 1-7 pelo período de 24h;
 - Também não foram observadas alterações na expressão gênica relativa dos componentes do SRA, após os estímulos, entretanto, com exceção do receptor AT2, todos os outros componentes avaliados (receptor AT1, receptor MAS, ECA, ECA-2, AGT e REN), foram expressos de maneira constitutiva nestes tipos celulares em 24h de cultivo.
-
-

Em linhagens celulares osteoclásticas em situação de monocultivo:

- As células THP-1 diferenciadas em macrófagos e cultivadas isoladas, na presença de Ang II e Ang 1-7, não mostraram diferenças quanto a atividade da TRAP, quando comparadas ao grupo não estimulado, sugerindo que os estímulos não foram capazes de aumentar e/ou diminuir a formação de osteoclastos.

Em linhagens celulares osteoblásticas e osteoclásticas em situação de co-cultivo indireto:

- O estabelecimento do modelo de co-cultivo demonstrou sucesso, uma vez que, foi observado aumento da TRAP em macrófagos derivados da THP-1 co-cultivados em relação aos cultivados isolados;
- Não foram observadas alterações na atividade de ALP das MG-63 em co-cultivo com os macrófagos derivados da THP-1 em relação ao estímulo com Ang II e Ang 1-7 em relação ao grupo não estimulado;
- Em macrófagos derivados da THP-1 em situação de co-cultivo com as MG-63, foram observados padrões diferentes quanto a atividade da TRAP ao longo do tempo, em relação aos que estavam com MG-63 com indução osteogênica antes ou após o estabelecimento do co-cultivo, sem, entretanto, que o estímulo com Ang II ou Ang 1-7 tenham interferido nesta resposta.

Adicionalmente, foi realizado um trabalho com um modelo de estudo *ex vivo*, de fêmur de embriões de *Gallus domesticus*. Este trabalho gerou um artigo científico que foi submetido ao periódico *Pharmaceuticals*, intitulado “***The chick embryonic femur organotypic model as a tool to analyze the angiotensin II/AT1R/AT2R axis on bone tissue***” (ANEXO A).

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8a. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- ABUOHASHISH, H. M. et al. The ACE-2/Ang1-7/Mas cascade enhances bone structure and metabolism following angiotensin-II type 1 receptor blockade. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, n. February, p. 44–55, 2017.
- ALIQUE, M. et al. Angiotensin II, via angiotensin receptor type 1/nuclear factor- κ B activation, causes a synergistic effect on interleukin-1- β -induced inflammatory responses in cultured mesangial cells. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 1, p. 23–32, 2015.
- BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: New roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 247–257, 2010.
- BROUTY-BOYÉ, D. et al. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 3, p. 914–919, 2000.
- CARVALHO, HERNANDES F. - COLLARES-BUZATO, C. B. **Células - Uma Abordagem Multidisciplinar**. 1a. ed. [s.l: s.n.].
- CHIANG, C. Y. et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4231–4236, 1999.
- COLOMBINI-ISHIKIRIAMA, B. L. et al. What is the response profile of deciduous pulp fibroblasts stimulated with *E. coli* LPS and *E. faecalis* LTA? **BMC Immunology**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2020.
- CZEKANSKA, E. M. et al. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. **European Cells and Materials**, v. 24, p. 1–17, 2012.
- DE FARIA MORANDINI, A. C. et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 2, p. 157–162, 2011.
- DENU, R. A. et al. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are
-
-

Phenotypically Indistinguishable. **Acta Haematologica**, v. 136, n. 2, p. 85–97, 2016.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–325, 2009.

FAKHRY, M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. **World Journal of Stem Cells**, v. 5, n. 4, p. 136, 2013.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224–236, 2008.

GABRIELE, L. G. et al. Angiotensin II Type 1 Receptor Knockdown Impairs Interleukin-1 β -Induced Cytokines in Human Periodontal Fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 1, p. e1–e11, 2017.

GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8s, p. 1585–1591, 2008.

GURANTZ, D. et al. IL-1 β and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT 1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 38, n. 3, p. 505–515, 2005.

HAN, Y.; RUNGE, M. S.; BRASIER, A. R. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-k β transcription factors. **Circulation Research**, v. 84, n. 6, p. 695–703, 1999.

HAO, J. et al. Aldosterone-induced inflammatory response of mesangial cells via angiotensin II receptors. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 739–748, 2015.

HATTON, R.; STIMPEL, M.; CHAMBERS, T. J. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 5–10, 1997.

IZU, Y. et al. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 4857–4864, 2009.

JOLLY, J. J. et al. Osteoclast Co-Culture System. **Iran J Med Sci March**, v. 43, n. 2, p. 208–213, 2018.

KOKA, S.; REINHARDT, R. A. Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament: Implications for oral health disease. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 77, n. 2, p. 191–196, 1997.

LI, Z. H. et al. High-dose PMA with RANKL and MCSF induces THP-1 cell differentiation into human functional osteoclasts in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 8380–8384, 2017.

LIANG, B. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 expression via the MAS receptor through suppression of P38 and NF- κ B pathways in HUVECs. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 2472–2482, 2015.

LU, W. et al. Angiotensin-(1-7) relieved renal injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats by reducing inflammation, oxidative stress and fibrosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–13, 2017.

LUNDERGAN, W. P. et al. Angiotensin-II increases cytoplasmic calcium, cell number and total DNA for human periodontal ligamental cells in vitro. **Journal of Periodontal Research**, v. 34, n. 4, p. 223–228, maio 1999.

MAECKER, H. T.; TROTTER, J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. **Cytometry Part A**, v. 69, n. 9, p. 1037–1042, 2006.

MATSUZUKA, T. et al. The synergistic induction of cyclooxygenase-2 in lung fibroblasts by angiotensin II and pro-inflammatory cytokines. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 320, n. 1–2, p. 163–171, 2009.

MENG, Y. et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas Axis Protects against Lung Fibrosis by Inhibiting the MAPK/NF- κ B Pathway. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 50, n. 4, p. 723–736, abr. 2014.

MEZZANO, S. A.; RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Angiotensin II and Renal Fibrosis. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 635–638, set. 2001.

MOHARAMZADEH, K. et al. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **Dental Materials**, v. 23, n. 1, p. 40–44, 2007.

MONNOUCHI, S. et al. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 181–185, 2011.

MORANDINI, A. C. et al. MyD88 or TRAM Knockdown Regulates Interleukin (IL)-6, IL-8, and CXCL12 mRNA Expression in Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 9, p. 1353–1360, 2013a.

MORANDINI, A. C. F. et al. Differential Production of Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Stromal-Derived Factor-1, and IL-6 by Human Cultured Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts Challenged With Lipopolysaccharide From *P. gingivalis*. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 2, p. 310–317, 2010.

MORANDINI, A. C. F. et al. Toll-Like Receptor 2 Knockdown Modulates Interleukin (IL)-6 and IL-8 but not Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) in Human Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 4, p. 535–544, 2013b.

NAKAI, K. et al. Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT1 receptor in osteoblasts. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 922–933, 2013.

NAKAMURA, T. et al. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1 β -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, n. 5, p. 345–351, 2011.

NEDOSZYTKO, B. et al. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: Atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 2, p. 84–91, 2014.

OGURO, H.; TSUCHIKAWA, K. The effect of angiotensin II on the proliferation of human gingival fibroblasts. **Odontology**, v. 97, n. 2, p. 97–102, 2009.

OHUCHI, N. et al. Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 137, n. 3, p. 281–289, 2004.

OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260–265, abr. 2011.

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

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

- QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 6, p. 814–823, 2015.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. The angiotensin converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas Receptor axis as a key player in alveolar bone remodeling. **Bone**, v. 128, n. August, p. 115041, 2019.
- RODRIGUES, C. et al. Behaviour of co-cultured human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers' extracts. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 2, p. 479–488, 2014.
- RUIZ-ORTEGA, M. et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. **Kidney International, Supplement**, v. 62, n. 82, p. S12–S22, 2002.
- SALDANHA DA SILVA, A. A. et al. Renin Angiotensin System and Cytokines in Chronic Kidney Disease: Clinical and Experimental Evidence. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 9, p. 799–808, 2017.
- SANTOS, C. F. et al. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, n. 5, p. 628–635, 2002.
- SANTOS, C. F. et al. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2 54-2, p. 775–783, 2003.
- SANTOS, C. F. et al. Characterization of a Local Renin-Angiotensin System in Rat Gingival Tissue. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 1, p. 130–139, jan. 2009.
- SANTOS, C. F. et al. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–26, 2015.
- SANTOS, R. A. et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, n. 2_pt_2, fev. 1988.
- SAUTER, N. S. et al. Angiotensin II induces interleukin-1b-mediated islet inflammation and β -cell dysfunction independently of vasoconstrictive effects. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1273–1283, 2015.
- SCHEUREN, N. et al. Cyclooxygenase-2 in myocardium stimulation by angiotensin-II
-

in cultured cardiac fibroblasts and role at acute myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 1, p. 29–37, 2002.

SEGAWA, M. et al. Angiotensin II induces prostaglandin E2 release in human gingival fibroblasts. **Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 795–803, 2003.

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

SIPERT, C. R. et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* Alters Nitric Oxide and CXCL12 Production but not CXCL8 and CCL3 Production by Cultured Human Dental Pulp Fibroblasts. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 91–94, 2010.

SIPERT, C. R. et al. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Porphyromonas gingivalis* LPS. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 99–105, 2013.

SIPERT, C. R. et al. In vitro regulation of CCL3 and CXCL12 by bacterial by-products is dependent on site of origin of human oral fibroblasts. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 95–100, 2014.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1945–1950, 2009.

SKURK, T.; VAN HARMELEN, V.; HAUNER, H. Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF- κ B. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 7, p. 1199–1203, 2004.

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

SUMIDA, K. et al. Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. **Human and Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1701–1709, 2011.

TAKAI, S. et al. Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 10, p. 518–522, 2004.

TAMARGO, M.; TAMARGO, J. Future drug discovery in renin-angiotensin-aldosterone system intervention. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1–22, 9 jun. 2017.

TANG, M. et al. Interferon-gamma-mediated osteoimmunology. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 2018.

VALENTE, A. J. et al. Angiotensin II enhances AT 1 -Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT 1 , Nox1, and interleukin-18. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, n. 3, p. H282–H296, 1 ago. 2012.

VOGIATZI, K. et al. Opposite effect of angiotensin receptor blockade on CXCL8 production and CXCR1/2 expression of angiotensin II-treated THP-1 monocytes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 3, p. 987–991, 2013.

WANG, S. et al. Angiotensin II Suppresses Rev-erba Expression in THP-1 Macrophages via the Ang II Type 1 Receptor/Liver X Receptor α Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 303–313, 2018.

YASUDA, K.; NAKANISHI, K.; TSUTSUI, H. Interleukin-18 in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.

YOKOYAMA, T. et al. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 6, p. H1968–H1976, 1 jun. 1999.

YOSHIDA, H. et al. Interleukin-1 β enhances the angiotensin-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 through angiotensin receptor upregulation in human astrocytes. **Brain Research**, v. 1073–1074, n. 1, p. 38–47, 2006.

ZHANG, F. et al. Aspirin attenuates angiotensin II-induced inflammation in bone marrow mesenchymal stem cells via the inhibition of ERK1/2 and NF- κ B activation. **Biomedical Reports**, v. 1, n. 6, p. 930–934, 2013a.

ZHANG, F. et al. Simvastatin attenuates angiotensin III-induced inflammation and oxidative stress in human mesangial cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 2, p. 1246–1251, 2015.

ZHANG, X. et al. Osteoblasts subjected to mechanical strain inhibit osteoclastic differentiation and bone resorption in a Co-culture system. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 41, n. 10, p. 2056–2066, 2013b.

ZHOU, Y. et al. Angiotensin II/Angiotensin II Receptor Blockade Affects Osteoporosis via the AT1/AT2-Mediated cAMP-Dependent PKA Pathway. **Cells Tissues Organs**, v. 204, n. 1, p. 25–37, 2017.

Anexo(s)

ANEXO A – Artigo Científico



pharmaceuticals



Article

The chick embryonic femur organotypic model as a tool to analyze the angiotensin II/AT1R/AT2R axis on bone tissue

Thais Francini Garbieri^{1,2}, Victor Martin^{2,3}, Carlos Ferreira dos Santos¹, Pedro de Sousa Gomes^{2,3}, Maria Helena Fernandes^{2,3*}

¹ Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil. tfgarbieri@usp.br (TFG); cfsantos@fob.usp.br (CFS).

² Laboratory for Bone Metabolism and Regeneration, Faculty of Dental Medicine, U.Porto, Porto, Portugal. up201908935@edu.fmd.up.pt (VM); pgomes@fmd.up.pt (PSG).

³ LAQV/REQUIMTE, U. Porto, Porto, 4160-007, Portugal.

* Maria Helena Fernandes. Faculty of Dental Medicine, U.Porto, Porto, Portugal. Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 393, Porto, Portugal. Email: mhfernandes@fmd.up.pt (MHF).

Abstract: Activation of renin-angiotensin-system (RAS) plays a role in bone deterioration associated with bone metabolic disorders, via increased Angiotensin II (AngII) targeting AT1/AT2 receptors (R). Despite the wide data availability, RAS role remains controversial. This study analyzes the feasibility of using the embryonic chick femur organotypic model to address AngII/AT1R/AT2R axis in bone, an application not yet considered. Embryonic day-11 femurs were cultured *ex vivo* for 11 days in three settings: basal conditions, exposure to AngII, and modulation of AngII effects by prior receptor blockade. Tissue response was evaluated by combining μ CT and histological analysis. Basal-cultured femurs expressed components of RAS, namely ACE, AT1R, AT2R and MasR (qPCR analysis). Bone formation occurred in the diaphyseal region in all conditions. In basal-cultured femurs, AT1R blocking increased BS/BV, whereas BV/BT decreased with AT2R or AT1R+AT2R blockade. Exposure to AngII greatly decreased BV/BT, compared to basal conditions. Receptor blockade prior AngII addition prevented this effect, i.e. AT1R blockade induced BV/BT, whereas blocking AT2R caused lower BV/BT increase but greater BS/BV; AT1R+AT2R blockade also improved BV/BT. Concluding, the embryonic chick femur model was sensitive to three relevant RAS research setups, proving is usefulness to address AngII/AT1R/AT2R axis in bone, both in basal and activated conditions.

Keywords: Embryonic chick femur organotypic model; AngII/AT1R/AT2R axis; Bone formation; Bone deterioration; Angiotensin II; AT1 and AT2 receptors; Receptor blockade.

1. Introduction

The endocrine renin-angiotensin system (RAS) has a key role in the control of blood pressure, blood volume and fluid balance, and its activation participates in the development and/or progression of cardiovascular, renal and metabolic diseases[1]. In this system, angiotensinogen (AGT), synthesized and released from the liver is converted to angiotensin I (AngI) by renin, released from the juxtaglomerular cells of the kidney. The angiotensin-converting enzyme (ACE) activates AngI to AngII, which attains high levels on the vasculature endothelial cell surface[2]. AngII, the most dynamic component of RAS, acts via AT1 and AT2 G-protein-coupled receptors (R) that exhibit ~34% amino acid sequence identity[2]. Long-term activation of ACE/AngII/AT1R is mostly associated with harmful effects, whereas the majority of studies support the notion that AT2R may mediate opposite effects being mainly involved in protective mechanisms[1]. Otherwise, the RAS branch mediated by Ang1-7, formed by the cleavage of AngII by ACE2, appear to have modulatory effects on the AngII-mediated RAS by acting on the Mas receptor attenuating AT1R-mediated negative effects[1–4]. In addition to the endocrine RAS, local/tissue RAS exerting autocrine and paracrine effects modulate the activity of multiple tissues and organs, including the bone tissue[5,6], playing an important role in physiological and pathological conditions.

The biological relevance of systemic and local RAS seems significant in conditions of its activation. Regarding the bone tissue, available clinical, *in vivo* and cellular data strongly suggest that RAS activation

appears to play a role in bone deterioration associated with metabolic disorders such as osteoporosis, arthritis, bone, risk fracture and fracture healing, due to increased activity of AngII acting via AT1R[6–9]. In line with this, therapeutic approaches involving RAS inhibition appears to have positive bone effects by adjusting the balance of AngII[10–12].

A variety of clinical and meta-analytical studies involving the use of ACE inhibitors (ACEI) and AngII receptor blockers (ARBs, namely AT1R blockers) in the treatment of conditions such as hypertension, cardiac failure and diabetic nephropathy suggest beneficial effects in the bone mineral density and risk of fractures[10,12–15]. However, a recent meta-analysis found that the association of ACEI and ARBs with decreased risk of bone fractures remains inconsistent[16]. Additionally, RAS modulation with AngII, ACEI and ARBs (type 1 and type 2 receptors) assessed in experimental disease models of osteoporosis, spontaneous and induced hypertension, diabetes and knockout models[8,10,17–19] showed both positive results[20,21] or no effect[22,23]. Great variability is also reported in cell culture models with diverse degrees of complexity and involving a multiplicity of experimental protocols of RAS stimulation/inhibition, trying to elucidate the subjacent cellular and molecular mechanisms[8,10,12,21,24]. Nevertheless, available data converge to the notion that the osteoblasts appear the major targets underlying the negative effects of AngII in bone metabolic activity and the increased osteoclastic activity seen in conditions of RAS activation, which appear to be an indirect osteoblast-mediated effect[8,10,25–27].

Despite the wide variety of studies, the role of RAS activation and modulation remain controversial, with several reasons accounting for this, namely related to the clinical setting, concerns arising from the quality of protocols and the risk of bias in studies involving animal models[28,29], and poor correlation between *in vitro* and *in vivo* studies addressing bone regeneration[30].

In this context, *ex vivo* systems emerge as useful tools with several advantages, namely the preservation of the 3D tissue cellular environment. The embryonic chick limb organotypic model has been used in bone-related biology to address development, regeneration and responses to external stimuli[31,32]. A major advantage of this model is the rapid development of the skeleton within the 3D cellular/matrix setup, as *in vivo*, which is essential for phenotype differentiation and maintenance of the differentiated cells involved in tissue formation[31,32]. Further, the availability of the genome sequence allows mechanistic studies. In this model, 11th day (ED11) embryonic femurs are removed and cultured *ex vivo* in the air/medium interface during 10–11 days. At ED11, the immature femur is rich in undifferentiated progenitor cells, thus highly responsive to external stimuli being a useful tool for biological manipulation[31]. This embryonic day is considered the optimal point to establish the organotypic femur culture because skeletal differentiation has just started and the diaphysis bone collar is formed. However, vascular infiltration has not yet occurred, limiting the presence of immune cells and osteoclastic cells by this stage[31]. During the *ex vivo* culture, after a period of ~two days for femurs recovery from the dissection procedure, a stage of cell proliferation and steady growth of bone and cartilage occurs in the following 3–12 days[31]. The difference in the development and growth between avian and human bone is a major limitation, however it appears that the cellular and signaling events are similar across both species[31]. Further, the absence of immune system and vascularization limits its representativeness, although these features might be attractive in some research settings. Overall, the model remains useful, cheap, easy to implement and manipulate bridging the gap between cell culture systems and *in vivo* models while fulfilling the 3Rs of reduction, refinement and replacement and has been used in a number of bone-related applications from bone development biology, testing of biomaterials and drugs and tissue regeneration and engineering strategies[33–36].

In addition to the advantages inherent to an *ex vivo* model, the organotypic culture of embryonic chick femur presents some features that seems particularly appellative to address the bone RAS. The absence of an immune system and the lack of vascularization during the *ex vivo* bone formation avoid the complex immune/bone tissue interactions and the effect of systemic RAS on local bone-associated RAS, respectively. Further, as osteoclasts are mostly absent, the model allows directing RAS role and modulation to the bone formation, an interesting issue considering that osteoblastic-lineage cells are the main suggested bone cell type targeted by RAS[10,25–27].

Considering the above observations, this study aims to analyze the feasibility of the *ex vivo* embryonic chick femur model to address the AngII/AT1R/AT2R axis and the possibility of its modulation, an application tool that has not yet been investigated. First, gene expression of RAS components was confirmed for ECA, Ang II, AT1, AT2 and Mas receptors. Then, the model was set up in order to characterize the system

in basal conditions, its responsiveness to exogenous AngII aiming its activation, and the possibility of mitigating AngII effects by receptor blockade, anticipating a suitable tool to screen potentially useful drugs. Tissue response was assessed by combining microcomputed tomography (μ CT) and histological characterization.

2. Results

The ex vivo embryonic chick femur model was set up using a standard methodology. ED11 femurs were cultured ex vivo in basal conditions for 11 days, and analyzed for the presence of genes coding for RAS components, as this model has not been previously searched for this application. Results showed that the cultured femurs expressed the genes for ACE, Ang II receptors AT1 and AT2, and Mas receptor, Figure 1A.

Following, ED11 femurs were grown in basal conditions or treated with AngII. In both situations, bone tissue response was modulated by Losartan (Los, AT1R blocker), PD123319 (PD, AT2R blocker) or Losartan + PD123319. As a first approach, at the end of the ex vivo culture, tissue response was checked in the whole femur double-stained with Alcian blue and Alizarin red S, Figure 1B. The femurs preserved the morphological characteristics and integrity in all tested conditions, and the diaphysis showed a bluish-red staining, suggesting the formation of bone-related tissue in this region. Femurs measured ~10 mm length, but treatment with Los+AngII or PD+AngII resulted respectively in a slight (but significant) increase or decrease, compared to basal and other conditions. The length of the bluish-red stained diaphyseal region was ~4 mm, and a decrease was observed in the AngII-treated femurs (~16%, $p < 0.05$). Given the promising results of this preliminary study, the model was further evaluated in more detail aiming to accomplish the proposed objectives.

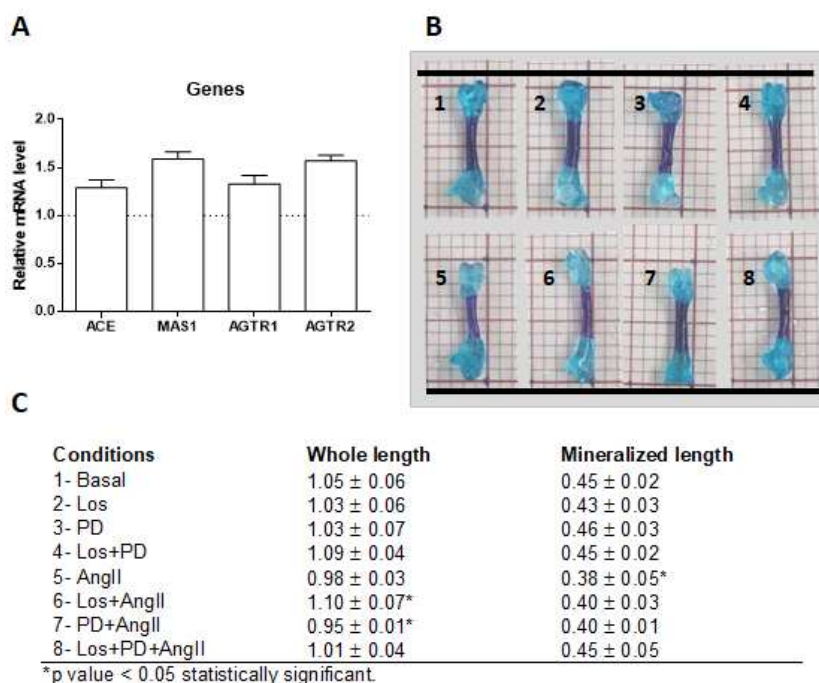


Figure 1. Gene expression (qPCR) of ACE, AT1R, AT2R and MasR of ED11 chick femurs following 11-day organotypic culture in basal conditions (A). Whole-mount bone and cartilage staining of chick embryos with Alcian blue and Alizarin red S (B). Length of the all femur and diaphyseal mineralized region (C).

99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121

122
123
124
125

2.1. Microcomputed tomography (μ CT)

Figure 2A and B shows, respectively, the μ CT images (whole mineralized bone and cross-sectional sections of the central diaphysis) and the morphometric indices (BV/TV; BS/BV) of the femurs cultured in basal conditions and in the presence of Losartan, PD123319 or Losartan + PD123319. μ CT images, particularly the cross-sectional ones, suggest a decrease in the mineralized volume of the diaphyseal region upon AT2R or AT1R+AT2R blockade. The morphometric indices provided similar information. Basal cultured femurs presented bone volume fraction (BV/TV) values of $1.54\% \pm 0.08$. Upon AT1R blockade, values were similar, whereas blocking AT2R or AT1R+AT2R elicited ~25 to 30% decrease ($p < 0.05$). The bone surface fraction (BS/BV) displayed a different behavior. Values of $35.1 \text{ mm}^2/\text{mm}^3 \pm 2.2$ in basal conditions increased significantly under the effect of the AT1R blocker Losartan ($48.45 \text{ mm}^2/\text{mm}^3 \pm 3.6$; ~38% increase; $p < 0.05$), but were similar following blockade of AT2R or AT1R+AT2R.

ED11 femurs were cultured *ex vivo* in the presence of AngII. Compared to the basal cultured femurs, treatment with AngII caused a deleterious effect in bone tissue clearly noted in the cross-sectional section of the central diaphysis, Figure 2C. Accordingly, quantitative analyses showed a significant decrease in the bone volume fraction (BV/TV), ~45% compared to the control femurs, although bone surface fraction (BS/BV) remained similar, Figure 2D.

Subsequently, the effect of AngII was modulated by blocking its receptors. In these experiments, the receptor blocker was added to the medium before the addition of AngII. Results for the μ CT data analysis are presented in Figure 2C and D. Losartan (AT1R blocker) completely prevented the negative effects of AngII as suggested in the cross-sectional image and confirmed in the quantification of the bone volume fraction. Thus, BV/TV values increased from $0.88\% \pm 0.07$ in AngII-treated condition to $2.45\% \pm 0.1$ under AT1R blockade (almost three-fold); further, this value was ~60% higher than that observed in basal conditions ($1.54\% \pm 0.08$). Simultaneously, the bone surface fraction (BS/BV) showed a slight decrease, ~15%. Blockade of AT2R with PD123319 also prevented the negative effects of AngII in bone volume fraction, but values were only slightly higher ($1.72\% \pm 0.09$) than those found in basal conditions ($1.54\% \pm 0.08$). However, the bone surface fraction was clearly increased, i.e. $47.5 \text{ mm}^2/\text{mm}^3 \pm 3.2$ compared to $35.1 \text{ mm}^2/\text{mm}^3 \pm 2.1$ in the basal-cultured femurs and $38.95 \text{ mm}^2/\text{mm}^3 \pm 2.97$ in AngII-treated femurs. Simultaneous blockade of AT1R and AT2R also avoided the negative effects of AngII, and values for BV/TV and BS/BV were similar to those in basal conditions.

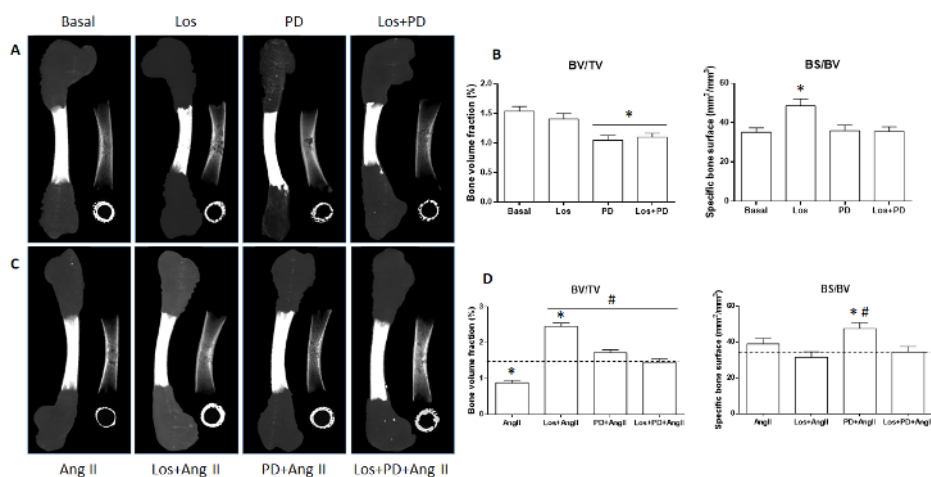


Figure 2. Microcomputed tomography images of the whole femur tissue region (segmented mineralized bone, sagittal and cross sections of the central diaphysis region) and morphometric indices (BV/TV and BS/BV) of ED11 chick femurs following 11-day organotypic culture in conditions of AngII/AT1R/AT2R axis modulation. A and B: basal conditions, and following receptor blockade; C and D: exposure to AngII, and receptor blockade prior to the addition of AngII. *Statistically different from basal conditions; #Statistically different from AngII; ($p \leq 0.05$).

2.2. Histological evaluation

The embryonic femurs grown in all conditions were characterized by histochemical staining, with a focused evaluation on femoral diaphysis. Tissue sections were stained with Alcian blue for proteoglycan-rich cartilage matrix and Sirius red for collagenous matrix, Figure 3. Von Kossa staining was used to evaluate the presence of a mineralized collagenous matrix, Figure 4.

In basal conditions, tissue sections presented the deposition of a collagenous matrix at the periosteal regions progressing to fill the diaphysis, as seen by the Sirius red staining. This matrix displayed a continuous appearance in the external part of the diaphysis and a trabecular-like organization as it filled this region. However, the inner part of the diaphysis still shows the bluish staining of the proteoglycan-rich cartilage matrix. The diaphysis sections of the femurs treated with AT1R blocker (Losartan) looked enlarged but the red-colored tissue appeared similar, exhibiting the characteristic trabecular organization. Femurs treated with AT2R blocker (PD123319) or AT1R+AT2R blockers appeared with lower amount of collagenous matrix showing some structural disruption.

The presence of AngII during the femurs *ex vivo* growth caused an evident deleterious effect on the deposition of the collagenous matrix, with a marked decrease in the red-stained areas and in the trabecular-like arrangement.

Blockade of AT1R prior to the addition of AngII had a significant effect in this behavior. Tissue samples revealed increased collagen matrix deposition with thicker and more developed trabecular organization. The AT2R blockade also modulate the effect of added AngII. Increased matrix deposition was noted, although this effect appeared less pronounced compared to that resulting from the AT1R blockade. Also, simultaneous blockade of AT1R and AT2R before the treatment with AngII prevented the drastic negative effect of AngII in bone formation, and tissue appearance approaches that observed in basal conditions.

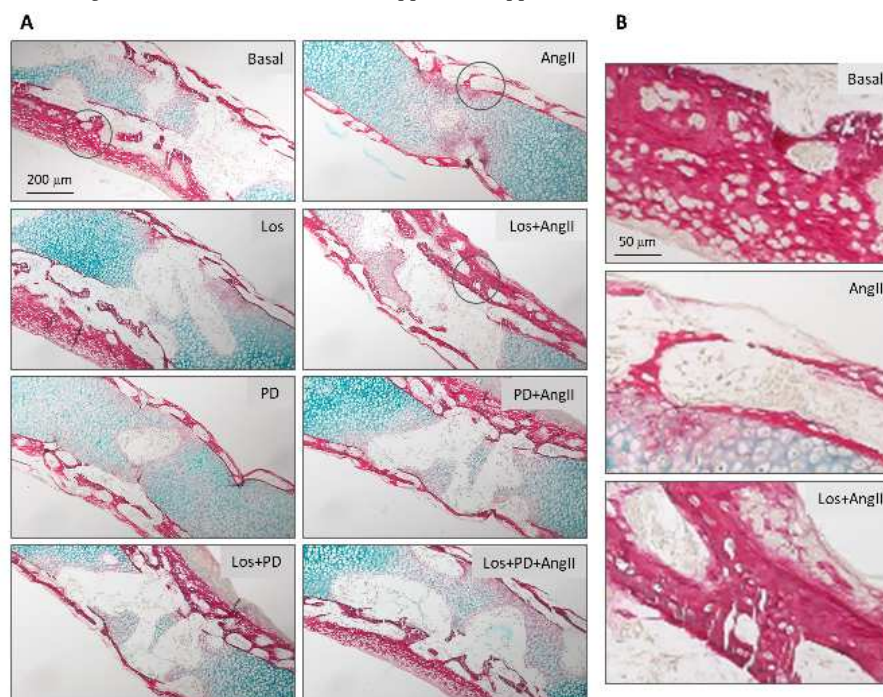


Figure 3. Histological images of the diaphyseal region from ED11 chick femurs stained with Alcian blue and Picosirius red for glycosaminoglycan and collagenous matrix visualization, following 11-day organotypic culture in conditions of AngII/AT1R/AT2R axis modulation. A: Low magnification images illustrating all tested conditions; B: high magnification images for basal conditions, exposure to AngII and AT1R blockade prior to the addition of AngII. Scale bar = 200 μ m (A) and 50 μ m (B).

Von Kossa staining of the tissue sections was positive in all conditions, showing that the mineralized areas matched the red-stained collagenous matrix, and clearly evidenced the trabecular-like structure. Figure 4 shows representative images for the basal-cultured femurs and those treated with AngII or with AT1R blocker+AngII. The marked negative effect of AngII in the amount of mineral content and trabecular-like organization is evident, compared to the basal-cultured femurs. Further, the positive effect of AT1R blockade prior to adding AngII is clearly illustrated. Results for the quantification of the % of mineralized area are in line with that observed with the Sirius red staining. In basal conditions, blockade of AT2R or AT1R+AT2R caused a decrease in the % of the mineralized area. Treatment with AngII resulted in a ~50% reduction, which was prevented by receptor blockade. This effect was more significant with AT1R blockade, compared to the other blocking conditions.

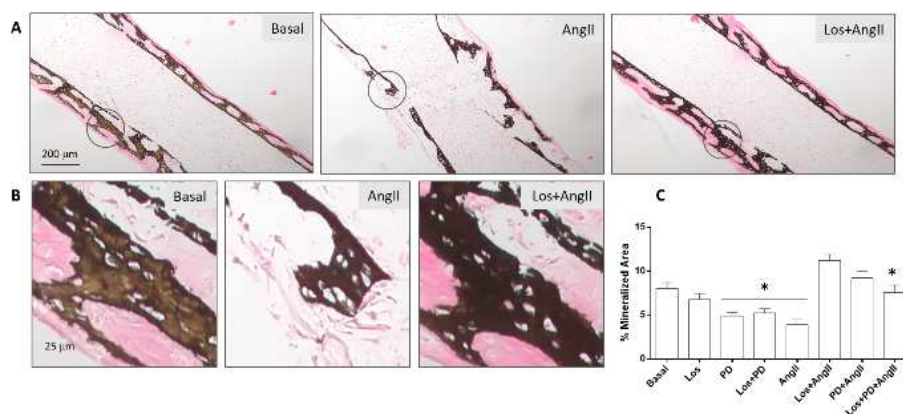


Figure 4. Histological analysis of the diaphyseal region from ED11 chick femurs stained for von Kossa (mineralized collagenous matrix) following 11-day organotypic culture in conditions of AngII/AT1R/AT2R axis modulation. A: Representative images for basal conditions, exposure to AngII and AT1R blockade prior to the addition of AngII; B: quantitative assessment of the % of mineralized content in all testing conditions. Scale bar = 200 µm (A) and 25 µm (B); *Statistically different from basal conditions; $p \leq 0.05$.

3. Discussion

This study analyzed the feasibility of using the embryonic chick femur organotypic model to analyze the AngII/AT1R/AT2R axis in bone tissue, an application that has never been considered.

The model was set up using the experimental protocol previously optimized and described[31,32]. Eleven-day embryonic femurs were cultured ex vivo for 11 days in the medium/air interface, to increase oxygen tension within the tissue promoting higher viability. Femurs were cultured in the absence of FCS to avoid ectopic mineralization, migration of cells out of the whole femur onto the culture surface and, importantly, to ensure the chemical definition of the culture medium due to FCS batch variability[32]. According to the previous studies, this culture period is the most appropriate to analyze the bone formation, because progressive tissue deterioration occurs for longer culture times [32]. In addition, at ED11, femurs are programmed to drive a bone formation process rather than a bone remodeling process[31].

In the present work, ED11 femurs were cultured ex vivo to analyze the behavior of the model in three settings: (i) basal conditions, without and with receptor blockade, to gain insight into its potential to address RAS during normal/basal bone formation, (ii) responsiveness to AngII, to mimic conditions associated with RAS activation, and (iii) receptor blockade prior to AngII addition, to explore the model potential as a drug screening tool to modulate AngII effects. Concentrations of AngII (10-6M), Losartan (10-6M) and PD123319 (10-5M) used in this study have been previously optimized in bone cell culture studies addressing RAS modulation, being routinely used in the in vitro models[20].

First, qPCR analysis proved that ED11 femurs cultured for 11 days expressed components of RAS, namely ACE, AT1R, AT2R and MasR (Figure 1A). At this stage, the presence of these genes suggested the eventual sensitivity of the model to address the AngII/AT1R/AT2R axis, and no other genes were analyzed.

In a preliminary experiment (Figure 1B), ED11 femurs cultured in basal conditions or treated with the modulatory drugs (AngII and receptor blockers) maintained the integrity during the ex vivo culture. Alcian blue/Alizarin red staining of the entire femur clearly showed the formation of mineralized tissue in the diaphyseal region in all media compositions. Additionally, the macroscopic length measurement of all femur and mineralized diaphysis suggested some differences in these parameters, a promising indication of the sensitivity of the model for this application. The detailed bone response in basal and modulatory conditions was evaluated by combining μ CT and histological characterization.

Femurs cultured for 11 days in basal conditions duplicate the behavior described previously[31,32]. μ CT analyses and histological assessment showed that bone formation occurred in the outer surface of the diaphysis progressing centripetally, developing a trabecular-like structure. The μ CT imaging and quantitative data correlated with the histochemical assays, namely the Sirius red staining of the collagenous matrix and von Kossa marking of the mineralized matrix regions.

The role of local AngII/AT1R/AT2R axis in bone formation was evaluated by modulating the tissue response with AngII receptor blockers. Compared to the basal conditions, blockade of AT1R did not cause significant effects in the bone volume fraction (BV/TV), % of mineralized collagenous matrix (von Kossa assay), and trabecular-like structure. However, the bone surface fraction (BS/BV) increased significantly compared to that on basal conditions, suggesting a lower bone density compared to that on the basal-cultured femurs. Otherwise, AT2R blockade was associated to a ~30 decrease in the bone volume fraction, correlating with the lower % of mineralized area (~40%), but the trabeculated organization and the bone surface fraction (BS/BV) were maintained, suggesting the preservation of the structural architecture. Together, results suggest that the two AngII receptors mediate different effects on bone formation regarding bone volume fraction and bone surface fraction. Upon AT1R blockade, the AT2R-mediated effects would probably assume an increased relevance. This receptor subtype is essentially associated with bone protective effects[6,21,37,38], which might explain the negligible effect in bone volume fraction, although the increased bone surface fraction is suggestive of alterations in the structural features of the formed bone. On the other hand, upon AT2R blockade, AngII-AT1R-mediated effects are prone to predominate, possibly explaining the decreased bone volume fraction, in line with the deleterious effects associated to AT1R[6,24], although maintaining the bone surface fraction. Alternatively, the simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors, by preventing AngII effects, opens the possibility of activation or increased relevance of other/alternative RAS axis, triggered by feedback regulatory mechanisms[39]. One hypothesis would be the activation of the Ang1-7/MasR axis, i.e., the conversion of AngII into Ang1-7 that, by acting on the MasR (that is expressed in the ex vivo cultured femurs), is associated with protective effects[3]. Still, bone volume fraction and % of mineralized matrix were lower compared to that on basal conditions. Indeed, with AT1R or AT2R blockade, contributions of other RAS pathways might also be hypothesized, as a result of the disturbed AngII/AT1R/AT2R axis. Taken together, in the embryonic chick femur model cultured in basal conditions, the role of AngII/AT1R/AT2R axis seems to prevail over other alternative/triggered RAS pathways. Blockade of AT1R, AT2R or both receptors caused alterations in bone formation, either in the structural features or the bone volume fraction, that were not compensated by eventual triggered feedback RAS regulatory mechanisms. Regarding this, it should be noted that, in normal conditions, bone metabolic activity is regulated by major hormonal and local pathways[40], and the relevance of systemic/local RAS is mostly associated, and clinically significant, in conditions of its activation occurring in certain systemic long-term pathologies[2,7,9].

As referred above, disturbance of bone metabolic activities occurring in a variety of chronic diseases is associated with decreased bone mass and a higher incidence of bone fracture[6–9]. Within the complexity of the subjacent mechanisms, RAS activation occurring in such conditions, due to increased AngII levels, appears to play a role in bone deterioration[9–11]. Considering this, the embryonic chick model was analyzed for its responsiveness to added AngII aiming to mimic a condition of RAS activation. Results coming from μ CT and histology clearly showed that femurs grown with AngII presented significantly decreased bone volume fraction (BV/TV), % of mineralized collagenous matrix and disrupted trabecular-like arrangements, validating the responsiveness of the model to this RAS mediator. These effects are in line with the known negative effects of AngII from in vitro and in vivo studies and also clinical assessment[9].

The suitability of the embryonic chick organotypic culture to modulate the AngII deleterious effects was analyzed by blocking its receptors, AT1R and AT2R. Thus, Losartan (AT1R blocker), PD123319 (AT2R

227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279

blocker) or both compounds were added to the culture medium previously to the addition of AngII. Blockade of AT1R prevented the negative effects of AngII in the bone parameters and, in addition, further increased bone volume fraction (BV/TV) and % of mineralized collagenous matrix comparatively to those measured in basal conditions. The effect in the bone surface volume was not significant, although a tendency for a decrease was noted. In this experimental setup, the embryonic chick model behaved similarly to most of the available experimental settings and clinical information concerning the positive effect of Losartan and other AT1R blockers[10,41,42]. Blockade of AT1R would prevent the activation of this receptor by the added AngII and, most probably, directs the mediator to activate AT2R, favoring a positive effect on bone response, as referred above. Interestingly, in the embryonic chick model, blockade of AT2R also prevented the negative effects of AngII by increasing BV/TV to levels higher than those in basal conditions, in spite of the expected negative AT1R-mediated effects. However, the stimulatory effect was lower than that observed upon AT1R blockade and, most relevant, the bone surface fraction (BS/BV) increased significantly, suggesting that the bone formed upon AT2R blockade presented lower density. The increase in bone mass was also reported in adult mice after AT2R blockade, AT2 knock-out mice and osteoblastic cell cultures[21].

The above results suggest that AT1R and AT2R might modulate bone volume fraction in conditions associated with increased AngII levels, but with distinct effects in the bone structural architecture. Further, as mentioned above, the contribution of other/alternative RAS pathways arising from adaptive regulatory mechanisms to the disturbed AngII/AT1R/AT2R axis might also occur, i.e. the Ang1-7/MasR axis[39]. It is worth stressing that both bone mass and bone structural features are relevant concerning bone mechanical performance and cellular metabolic activities, having different roles in the prevention of bone fractures associated with diseases going along with RAS activation. The two parameters, that present non-linear relationships[43], are bound to vary considerably within the wide range of reported experimental and clinical protocols dealing with disturbed RAS function, receptor modulation and induced adaptive regulatory pathways difficult to identify. Overall, this is most probably a contributing factor to the great variability and inconsistency of reported results and behavior patterns. Nevertheless, the positive bone effects observed in the embryonic chick model upon blockade of AT1R or AT2R receptors are in line with previous studies[21]. Again, the embryonic chick model appears responsive to RAS modulation.

In the present model, blockade of AT1R and AT2R prior to the addition of AngII resulted in increased BV/TV values, with BS/BV being similar to that in basal conditions. With the blockade of the receptors, it appears reasonable that the added AngII would be engaged in adaptive RAS responses by fueling other pathways, namely its conversion into Ang1-7 that is thought to modulate protective bone effects mediated by the MasR[39], contributing to the observed positive effects. There is also the possibility of triggering feedback regulatory pathways within the increasingly complex RAS functioning[2]. It might also be hypothesized that, by preventing the effects of increased AngII levels due to its receptor blockade, RAS no longer plays a relevant role in bone response, as AngII is believed to be the more active RAS mediator. However, the present results only allow for speculative explanations.

Figure 5 presents a schematic diagram summarizing the bone response observed after the ex vivo growth of the embryonic chick femur, in terms of bone volume fraction (BV/TV) and a bone surface fraction (BS/BV), in conditions of AngII/AT1R/AT2R modulation.

280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321

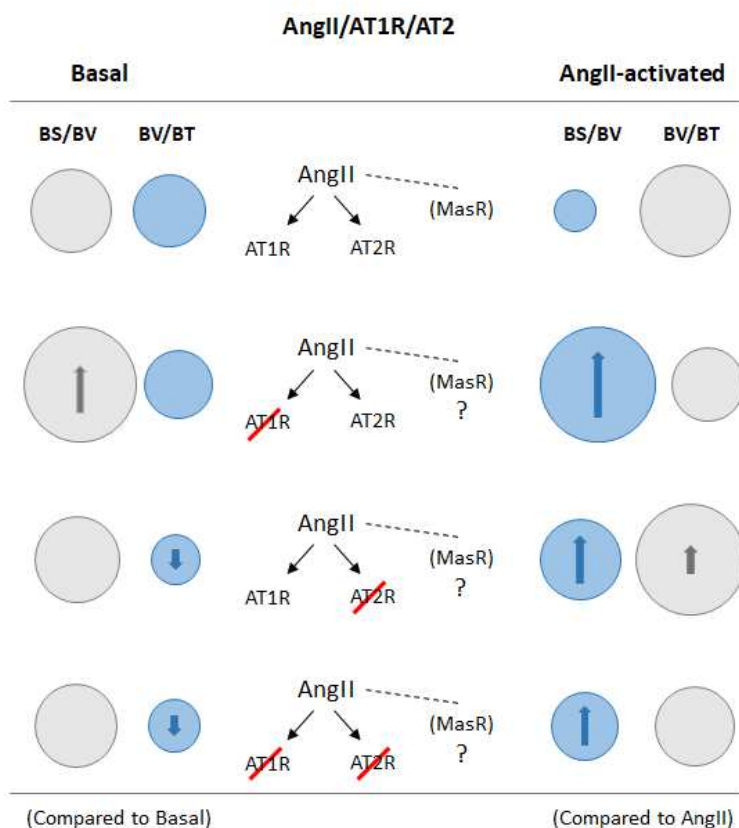


Figure 5. Schematic diagram summarizing the bone responsiveness of ED11 organotypic chick femur model to AngII/AT1R/AT2R axis modulation, for bone volume fraction (BV/TV) and bone surface fraction (BS/BV). **Basal:** without and with receptor blockade - bone surface fraction increased after AT1R blocking and bone volume fraction decreased with AT2R and AT1R+AT2R blockade. **AngII-activated:** compared to basal conditions, exposure to AngII greatly decreased bone volume fraction, and receptor blockade prior the addition of AngII prevented the negative effects of this mediator: AT1R blockade resulted in increased bone volume fraction with maintenance of bone surface fraction, whereas, blocking AT2R caused a lower increase on bone volume fraction and a greater bone surface fraction; AT1R+AT2R blockade also led to increased bone volume fraction.

Ex vivo bone growth of ED11 chick femurs was sensitive to AngII/AT1R/AT2R modulation, and AT1R and AT2R seem to be differently involved in the elicited bone response. Results are indicative of a major role of AT1R in the AngII negative effects. With the simultaneous blockade of AT1R and AT2R, bone formation was similar to that observed in basal conditions, suggesting the involvement of alternative pathways within RAS axis and/or other bone regulatory mechanisms.

4. Materials and Methods

4.1. Organotypic cultures of embryonic chick femurs

Fertilized chick eggs (*Gallus domesticus*) were incubated in an Octagon 40 ECO rotating egg incubator (Brinsea, UK), at 37.5 °C and 50% humidity. At day 11, the embryos were euthanized and whole femurs were carefully dissected, removing the soft tissue such as ligaments and adherent muscles while preserving the periosteum. Femurs (n = 10 per group) were carefully washed in saline and settled onto Netwell™ Insert (440 µm mesh size polyester membrane, 30 mm diameter, Corning) in 6-well tissue culture plates (Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Corning ref. 3516) containing 1 mL of basal culture medium

(1 mL; α -MEM, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 50 μ g/mL ascorbic acid 2-phosphate), at the liquid/gas interface. After 24 h, the medium was removed and the embryonic chick femurs were cultured for 11 days in basal conditions or treated with AT1 (Losartan, Sigma; 10-6M), AT2 (PD123319, Sigma; 10-5M) receptor blockers or AngII (Sigma; 10-6M). The following conditions were tested: 1) Basal medium, 2) Losartan, 3) PD123319, 4) Losartan + PD123319, 5) AngII, 6) Losartan + AngII, 7) PD123319 + AngII, and 8) Losartan + PD123319 + AngII. In conditions 6 to 8, the receptor blockers were added for 2h before the addition of AngII. The culture medium was changed every 24 h.

At the end of the experiment, cultured femurs were washed in Phosphate Buffered Saline (PBS), fixed and processed for microtomographic (μ CT) and histological analysis, using standardized conditions. In addition, femurs cultured in basal conditions were snap frozen and later processed for gene expression analysis. Also, whole-mount double staining with Alcian blue and Alizarin red S was performed to visualize the skeletal patterns of the chicken embryo femur.

4.2. Whole-mount histochemical femur staining

Whole-mount double staining with Alcian blue for cartilage and Alizarin red S for bone was performed to allow the visualization of the skeletal patterns of chicken embryo femur in the same specimen, based in a previous work[44]. Briefly, decalcification by the acidic Alcian blue solution (0.01%) was performed overnight (approximately 16h). After that, a dehydration at 95% ethanol was followed by rehydration in a decreasing graded ethanol series. Then a staining with Alizarin red S solution (0.002%) in a 0.5% potassium hydroxide for 24h followed by an immersion in a KHO solution (2%) for 4h. Tissue cleaning was performed by immersing the embryos femurs successively in 3:1, 1:1 and 1:3 mixtures of 0.5% KOH and glycerin 22h each. Femurs were stored in 100% glycerin prior to imaging on a Zeiss 305 Stereo microscope equipped with a digital camera (Zeiss Axiocam 208). Data analysis was conducted on ImageJ software (version 1.51j8).

4.3. Microtomography evaluation

Femurs specimens were imaged in a SkyScan 1276 micro-computed tomography scanner (Bruker, Kontich, Belgium). Sample containers (1.5 ml Eppendorf tubes) were set on the sample stage and imaged using a detector assembly over a 360° sample rotation. Data was acquired under the following settings: source voltage of 40 kV, source current 100 μ A, an exposure time of 800 ms and a voxel size of 4.5 μ m. Raw data were reconstructed in the NRecon software v.1.7.4.2, upon correction for beam hardening, ring artifacts, and misalignment. CT Analyser software v.1.17.7.2 was used to visualize and analyze the reconstructed images for bone volume (BV), tissue volume (TV) and bone surface (BS). For the histomorphometric analysis, a volume of interest embracing 2 mm in the proximal and distal directions, starting at mid-diaphysis and comprising a total of 900 layers, was defined. Thresholding was applied to obtain an average binarized grayscale for the reconstructed datasets.

4.4. Histological processing and histochemical analysis

Alcian blue and Picrosirius red were combined to produce distinctive staining of collagen (red), proteoglycans (blue) and allows to visualize both collagen and proteoglycan-matrix components on the same histological section, or alternatively, the mineralized tissue upon von Kossa staining[45]. Briefly, specimens fixed in neutral buffered formalin were processed for routine paraffin embedding. Sections were deparaffinized, hydrated into distilled water and stained in Alcian blue solution, pH 2.5 (1g alcian blue 8GX (Sigma A-5268, CI 74240), 3 mL glacial acetic acid (Fisher) and 97 mL distilled water) for 30 min at room temperature. The sample was rinsed in tap water for 2 min and stained in Picrosirius red solution (0.1 g sirius red F3B (direct red, CI 35780, Aldrich 36,554-8) combined with 100 mL saturated aqueous picric acid, CI 10305 (Sigma 925-40) for 1 h at room temperature. Alternatively, for von Kossa staining, sections were incubated in a 1% silver nitrate under ultraviolet light for 20 minutes, rinsed, immersed in 5% sodium thiosulfate for 5 minutes to remove unreacted silver and counterstained with nuclear fast red for 5 minutes. Finally, specimens were dehydrated, cleared and mounted. The samples were analyzed in a Zeiss Axiolab5 microscope and Axiocam208c imaging system (Zeiss). Histomorphometric data was measured on ImageJ software (version 1.51j8), calculated as a proportion of the total diaphysis' area, based on color thresholds.

4.5. Gene expression analysis

Frozen femurs were powdered with a pestle and mortar in the presence of liquid nitrogen. Total RNA was isolated with Trizol® (Invitrogen, San Diego, CA, USA), according to the established manufacturer's protocol. The concentration and purity of total RNA were assessed by UV spectrophotometry (A260/A280) in a NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) with iScript™ Adv cDNA Kit (BioRad®), in accordance to the manufacturer's instruction. Following, quantitative PCR analysis was conducted in a Bio-Rad iQ5 real-time PCR system (Bio-Rad®) using SYBR Premix Ex Taq kit (Takara®). Optimized primers for amplification were acquired from BioRad: GAPDH (Unique Assay ID: qGgaCED0029996), ACE (Unique Assay ID: qGgaCED0024430), MAS1 (Unique Assay ID: qGgaCED0024192), AGTR1 (Unique Assay ID: qGgaCED0022835), AGTR2 (Unique Assay ID: qGgaCED0023871). The relative gene expression level was normalized to the internal control (GAPDH) based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

4.6. Statistical analysis

Four independent experiences were conducted. Regarding quantitative data, measurements were calculated and presented as mean \pm standard deviation. Data normality was determined by the Shapiro-Wilk test. For normal data sets, one-way ANOVA was performed, followed by multiple comparisons using Tukey's test. For non-parametric data sets, Kruskal-Wallis test was performed, followed by multiple comparisons using Dunn's tests. SPSS Statistics (IBM, version 26) was used for calculations. Statistical differences were considered to be significant if p values \leq 0.05.

5. Conclusions

To summarize, and considering the aim of this study, the embryonic chick femur model proved to be a potential research system to address the role of AngII/AT1R/AT2R axis in bone response, both in basal conditions and upon its activation. From a translational perspective, the role of RAS activation on bone tissue and, thus, the significance of its modulation, seem particularly relevant issues for research proposes. In this regard, bone formation in the embryonic femur is highly responsive to the negative effects of AngII, as well as to the preventive effects of AngII-receptor blockade. This model seems particularly suitable to investigate the mechanisms underlying AngII/AT1R/AT2R activation and modulation, as well as an effective tool for drug screening.

Author Contributions: Conceptualization, TFG, CFS, MHF; Methodology, TFG, VM, PSG; Writing—original draft, TFG, MHF; Writing—review and editing, TFG, VM, CFS, PSG, MHF. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support through the project UIDB/50006/2020, funded by FCT/MCTES through PT funds and Grant #2015/03965-2 from FAPESP, Brazil. TFG thanks FAPESP (Brazil) for her Grants #2017/19227-6 and #2018/23934-2. VM thanks FCT through POCH for his PhD grant ref. 2020.04935.BD.

Acknowledgments: The authors acknowledge the support of the i3S Scientific Platform Bioimaging, member of the PPBI (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tamargo, M.; Tamargo, J. Future drug discovery in renin-angiotensin-aldosterone system intervention. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, 1–22, doi:10.1080/17460441.2017.1335301.
2. Nehme, A.; Zouein, F.A.; Zayeri, Z.D.; Zibara, K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2019**, 6, 14, doi:10.3390/jcdd6020014.

3. Abuhashish, H.M.; Ahmed, M.M.; Sabry, D.; Khattab, M.M.; Al-Rejaie, S.S. Angiotensin (1-7) ameliorates the structural and biochemical alterations of ovariectomy-induced osteoporosis in rats via activation of ACE-2/Mas receptor axis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2293, doi:10.1038/s41598-017-02570-x. 443–445
4. Zhang, K.; Meng, X.; Li, D.; Yang, J.; Kong, J.; Hao, P.; Guo, T.; Zhang, M.; Zhang, Y.; Zhang, C. Angiotensin(1–7) attenuates the progression of streptozotocin-induced diabetic renal injury better than angiotensin receptor blockade. *Kidney Int.* **2015**, *87*, 359–369, doi:10.1038/ki.2014.274. 446–448
5. Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 747–803, doi:10.1152/physrev.00036.2005. 449–450
6. Tamargo, J.; Caballero, R.; Delpón, E. The Renin–Angiotensin System and Bone. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **2015**, *13*, 125–148, doi:10.1007/s12018-015-9189-6. 451–452
7. Shuai, B.; Yang, Y.P.; Shen, L.; Zhu, R.; Xu, X.J.; Ma, C.; Lv, L.; Zhao, J.; Rong, J.H. Local renin-angiotensin system is associated with bone mineral density of glucocorticoid-induced osteoporosis patients. *Osteoporos. Int.* **2015**, *26*, 1063–1071, doi:10.1007/s00198-014-2992-y. 453–455
8. Zhang, Y.; Wang, L. Biological Effects of Skeletal Renin-Angiotensin System in Osteoporosis. In *Advances in Osteoporosis*; InTech, 2015. 456–457
9. Skov, J.; Persson, F.; Frøkiær, J.; Christiansen, J.S. Tissue Renin–Angiotensin Systems: A Unifying Hypothesis of Metabolic Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2014**, *5*, doi:10.3389/fendo.2014.00023. 458–459
10. Id, M.M.; Id, M.K.; Vks, B.; Id, L. Potential of renin-angiotensin system inhibition to improve metabolic bone disorders. *J. Nephropharmacology* **2021**, *10*, doi:10.34172/npj.2021.16. 460–461
11. Gebru, Y.; Diao, T.-Y.; Pan, H.; Mukwaya, E.; Zhang, Y. Potential of RAS Inhibition to Improve Metabolic Bone Disorders. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–6, doi:10.1155/2013/932691. 462–463
12. Zhao, J.; Yang, H.; Chen, B.; Zhang, R. The skeletal renin-angiotensin system: A potential therapeutic target for the treatment of osteoarticular diseases. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *72*, 258–263, doi:10.1016/j.intimp.2019.04.023. 464–466
13. Yilmaz, V.; Umay, E.; Gundogdu, I.; Cakci, F.A. Effect of Primary Hypertension on Treatment Outcomes of Patients with Postmenopausal Osteoporosis: A 5 Year Follow Up Retrospective Study. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* **2019**, *26*, 61–67, doi:10.1007/s40292-018-0291-y. 467–469
14. Kwok, T.; Leung, J.; Barrett-Connor, E. ARB users exhibit a lower fracture incidence than ACE inhibitor users among older hypertensive men. *Age Ageing* **2016**, doi:10.1093/ageing/afw150. 470–471
15. Solomon, D.H.; Ruppert, K.; Zhao, Z.; Lian, Y.J.; Kuo, I.-H.; Greendale, G.A.; Finkelstein, J.S. Bone mineral density changes among women initiating blood pressure lowering drugs: a SWAN cohort study. *Osteoporos. Int.* **2016**, *27*, 1181–1189, doi:10.1007/s00198-015-3332-6. 472–474
16. Kunutsor, S.K.; Blom, A.W.; Whitehouse, M.R.; Kehoe, P.G.; Laukkanen, J.A. Renin-angiotensin system inhibitors and risk of fractures: a prospective cohort study and meta-analysis of published observational cohort studies. *Eur. J. Epidemiol.* **2017**, *32*, 947–959, doi:10.1007/s10654-017-0285-4. 475–477
17. GU, S.; ZHANG, Y.; LI, X.; WU, S.; DIAO, T.; HAI, R.; DENG, H. Involvement of the Skeletal Renin-Angiotensin System in Age-Related Osteoporosis of Ageing Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 1367–1371, doi:10.1271/bbb.120123. 478–480
18. Yongtao, Z.; Kunzheng, W.; Jingjing, Z.; Hu, S.; Jianqiang, K.; Ruiyu, L.; Chunsheng, W. Glucocorticoids activate the local renin-angiotensin system in bone: possible mechanism for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrine* **2014**, *47*, 598–608, doi:10.1007/s12020-014-0196-z. 481–483
19. Asaba, Y.; Ito, M.; Fumoto, T.; Watanabe, K.; Fukuhara, R.; Takeshita, S.; Nimura, Y.; Ishida, J.; Fukamizu, 484

- A.; Ikeda, K. Activation of Renin–Angiotensin System Induces Osteoporosis Independently of Hypertension. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *24*, 241–250, doi:10.1359/jbmr.081006. 485
20. Zhou, Y.; Guan, X.; Chen, X.; Yu, M.; Wang, C.; Chen, X.; Shi, J.; Liu, T.; Wang, H. Angiotensin II/Angiotensin II Receptor Blockade Affects Osteoporosis via the AT1/AT2-Mediated cAMP-Dependent PKA Pathway. *Cells Tissues Organs* **2017**, *204*, 25–37, doi:10.1159/000464461. 487
21. Izu, Y.; Mizoguchi, F.; Kawamata, A.; Hayata, T.; Nakamoto, T.; Nakashima, K.; Inagami, T.; Ezura, Y.; Noda, M. Angiotensin II Type 2 Receptor Blockade Increases Bone Mass. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4857–4864, doi:10.1074/jbc.M807610200. 488
22. Kolli, V.; Stechschulte, L.A.; Dowling, A.R.; Rahman, S.; Czernik, P.J.; Lecka-Czernik, B. Partial Agonist, Telmisartan, Maintains PPAR γ Serine 112 Phosphorylation, and Does Not Affect Osteoblast Differentiation and Bone Mass. *PLoS One* **2014**, *9*, e96323, doi:10.1371/journal.pone.0096323. 489
23. Zhang, Ya-feng, Qin, Ling, Kwok, Timothy C. Y., Yeung, Benson H. Y., Li, Guo-dong, Liu, F. Effect of angiotensin II type I receptor blocker losartan on bone deterioration in orchietomized male hypertensive and normotensive rats. *Chin. Med. J. (Engl.)*. **2013**, *126*, 2661–5. 490
24. Nakai, K.; Kawato, T.; Morita, T.; Yamazaki, Y.; Tanaka, H.; Tonogi, M.; Oki, H.; Maeno, M. Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT1 receptor in ROS17/2.8 cells. *Arch. Med. Sci.* **2015**, *3*, 628–637, doi:10.5114/aoms.2015.52369. 491
25. Wang, C.; Zhang, C.; Zhou, F.; Gao, L.; Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, Y. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by increasing reactive oxygen species-mediated activation of the nuclear factor- κ B signaling pathway in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* **2017**, doi:10.3892/mmr.2017.7971. 492
26. Zhang, Y.; Zhang, Y.; Kou, J.; Wang, C.; Wang, K. Role of reactive oxygen species in angiotensin II: induced receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression in mouse osteoblastic cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *396*, 249–255, doi:10.1007/s11010-014-2160-x. 493
27. Guo, L.; Wang, M.; Zhang, Z.; Hao, L.; Lou, B.; Li, X.; Loo, W.T.Y.; Jin, L.; Cheung, M.N.B. Angiotensin II induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts through ERK1/2 pathway via AT1 receptor. *Arch. Oral Biol.* **2011**, *56*, 205–211, doi:10.1016/j.archoralbio.2010.09.016. 494
28. Kilkenny, C.; Parsons, N.; Kadyszewski, E.; Festing, M.F.W.; Cuthill, I.C.; Fry, D.; Hutton, J.; Altman, D.G. Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. *PLoS One* **2009**, *4*, e7824, doi:10.1371/journal.pone.0007824. 495
29. Macleod, M.R.; Lawson McLean, A.; Kyriakopoulou, A.; Serghiou, S.; de Wilde, A.; Sherratt, N.; Hirst, T.; Hemblade, R.; Bahor, Z.; Nunes-Fonseca, C.; et al. Correction: Risk of Bias in Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002301, doi:10.1371/journal.pbio.1002301. 496
30. Hulsart-Billström, G.; Dawson, J.; Hofmann, S.; Müller, R.; Stoddart, M.; Alini, M.; Redl, R.; El Haj, A.; Brown, R.; Salih, V.; et al. A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis. *Eur. Cells Mater.* **2016**, *31*, 312–322, doi:10.22203/eCM.v031a20. 497
31. Kanczler, J.M.; Smith, E.L.; Roberts, C.A.; Oreffo, R.O.C. A novel approach for studying the temporal modulation of embryonic skeletal development using organotypic bone cultures and microcomputed tomography. *Tissue Eng. - Part C Methods* **2012**, *18*, 747–760, doi:10.1089/ten.tec.2012.0033. 498
32. Smith, E.L.; Kanczler, J.M.; Oreffo, R.O.C. A new take on an old story: Chick limb organ culture for skeletal niche development and regenerative medicine evaluation. *Eur. Cells Mater.* **2013**, *26*, 91–106, doi:10.22203/eCM.v026a07. 499

33. Smith, E.L.; Rashidi, H.; Kanczler, J.M.; Shakesheff, K.M.; Oreffo, R.O.C. The effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and transforming growth factor- β 3 on bone development in an ex vivo organotypic culture system of embryonic chick femora. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0121653. 527–529
34. Black, C.R.M.; Goriainov, V.; Gibbs, D.; Kanczler, J.; Tare, R.S.; Oreffo, R.O.C. Bone Tissue Engineering. *Curr. Mol. Biol. Reports* **2015**, *1*, 132–140, doi:10.1007/s40610-015-0022-2. 530–531
35. Smith, E.L.; Kanczler, J.M.; Gothard, D.; Roberts, C.A.; Wells, J.A.; White, L.J.; Qutachi, O.; Sawkins, M.J.; Peto, H.; Rashidi, H.; et al. Evaluation of skeletal tissue repair, Part 2: Enhancement of skeletal tissue repair through dual-growth-factor-releasing hydrogels within an ex vivo chick femur defect model. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4197–4205, doi:10.1016/j.actbio.2014.05.025. 532–535
36. Smith, E.L.; Kanczler, J.M.; Roberts, C.A.; Oreffo, R.O.C. Developmental cues for bone formation from parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in an ex vivo organotypic culture system of embryonic chick femora. *Tissue Eng. - Part C Methods* **2012**, *18*, 984–994, doi:10.1089/ten.tec.2012.0132. 536–538
37. Terenzi, R.; Manetti, M.; Rosa, I.; Romano, E.; Galluccio, F.; Guiducci, S.; Ibba-Manneschi, L.; Matucci-Cerinic, M. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) as a novel modulator of inflammation in rheumatoid arthritis synovium. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13293, doi:10.1038/s41598-017-13746-w. 539–541
38. Xu, X.; He, H.; Hu, S.; Han, J.; Huang, L.; Xu, J.; Xie, J.; Liu, A.; Yang, Y.; Qiu, H. Ang II-AT2R increases mesenchymal stem cell migration by signaling through the FAK and RhoA/Cdc42 pathways in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 164, doi:10.1186/s13287-017-0617-z. 542–544
39. Abuhashish, H.M.; Ahmed, M.M.; Sabry, D.; Khattab, M.M.; Al-Rejaie, S.S. The ACE-2/Ang1-7/Mas cascade enhances bone structure and metabolism following angiotensin-II type 1 receptor blockade. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *807*, 44–55, doi:10.1016/j.ejphar.2017.04.031. 545–547
40. Zaidi, M.; Yuen, T.; Sun, L.; Rosen, C.J. Regulation of Skeletal Homeostasis. *Endocr. Rev.* **2018**, *39*, 701–718, doi:10.1210/er.2018-00050. 548–549
41. Donmez, B.O.; Unal, M.; Ozdemir, S.; Ozturk, N.; Oguz, N.; Akkus, O. Effects of losartan treatment on the physicochemical properties of diabetic rat bone. *J. Bone Miner. Metab.* **2017**, *35*, 161–170, doi:10.1007/s00774-016-0748-9. 550–552
42. Yamamoto, S.; Kido, R.; Onishi, Y.; Fukuma, S.; Akizawa, T.; Fukagawa, M.; Kazama, J.J.; Narita, I.; Fukuhara, S. Use of Renin-Angiotensin System Inhibitors Is Associated with Reduction of Fracture Risk in Hemodialysis Patients. *PLoS One* **2015**, *10*, e0122691, doi:10.1371/journal.pone.0122691. 553–555
43. Parkinson, I.H.; Fazzalari, N.L. Interrelationships Between Structural Parameters of Cancellous Bone Reveal Accelerated Structural Change at Low Bone Volume. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 2200–2205, doi:10.1359/jbmr.2003.18.12.2200. 556–558
44. Yamazaki, Y.; Yuguchi, M.; Kubota, S.; Isokawa, K. Whole-mount bone and cartilage staining of chick embryos with minimal decalcification. *Biotech. Histochem.* **2011**, *86*, 351–358, doi:10.3109/10520295.2010.506158. 559–561
45. Gruber, H.E.; Ingram, J., Jr, E.N.H. An improved staining method for intervertebral disc tissue. *Biotech. Histochem.* **2002**, *77*, 81–83, doi:10.1080/bih.77.2.81.83. 562–563