**LAÍS NICOLAY PIZZATTO**

# Angiotensina II na modulação de células de papila apical humana *in vitro*

São Paulo
2018

**LAÍS NICOLAY PIZZATTO**

# Angiotensina II na modulação de células de papila apical humana *in vitro*

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Endodontia, para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Carla Renata Sipert

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

São Paulo

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pizzatto, Laís Nicolay.

Angiotensina II na modulação de células de papila apical humana *in vitro* / Laís Nicolay Pizzatto; orientador Carla Renata Sipert; coorientador Carlos Ferreira dos Santos. -- São Paulo, 2018.

105p. : fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Papila dentária. 2. Células-tronco. 3. Sistema renina-angiotensina. 4. Angiotensina II. I. Sipert, Carla. II. Santos, Carlos Ferreira dos. III. Título.

Pizzatto LN. Angiotensina II na modulação de células de papila apical humana *in vitro*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 03 /08 /2018

**Banca Examinadora**

Profa.Dra. Marcia Carneiro Valera

Instituição: UNESP São José dos Campos Julgamento: aprovada

Profa.Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Instituição: ICB-USP Julgamento: aprovada

Prof.Dr. Celso Luiz Caldeira

Instituição: FO-USP Julgamento: aprovada

## DEDICATÓRIA

À Deus e a minha família dedico este trabalho!

À minha mãe que é a pessoa nesse mundo que mais torce pela minha felicidade e realização dos meus sonhos, este trabalho é todo seu! Obrigada pelo amor, carinho e educação a mim dedicados! Obrigada por acreditar em mim e estar ao meu lado nas retas e principalmente nas curvas da vida! Obrigada por nunca me deixar desistir, por acreditar em mim, muitas vezes até mais do que eu mesma. Mãe, eu só estou aqui hoje porque me senti amparada por você! Obrigada pelo seu amor, apoio e energia que me sustentam e me movem! Amo você infinitamente e nunca me cansarei de agradecer por tudo que já fez e faz por mim! Que alegria eu tenho em te ter como mãe! Obrigada, obrigada e obrigada!

Ao meu pai amado, eu daria tudo para tê-lo aqui comigo na realização deste sonho! Não existe um instante da minha vida que eu não lembre de você, que eu não veja no meu coração os seus olhos e sorriso brilhando! Eu agradeço a Deus por ter tido o melhor pai que eu poderia ter! Obrigada por ter sido exemplo de honestidade, trabalho, alegria, bondade, caráter e acima tudo humildade! Esta conquista é sua, pai! Você criou seus filhos sempre priorizando a educação e não mediu esforços para nos oferecer uma boa formação! Lembro-me exatamente quando vinha meu boletim com notas altas você dizia com um sorrisão de orelha a orelha “que orgulho, filhinha querida”! Eu imagino a sua alegria lá do céu ver que teus três filhos tornaram- se mestres! Acho que nem no melhor dos seus sonhos você imaginaria isso! Obrigada por ter sido o maravilhoso pai que você foi, pelo exemplo que você nos deixou e por todo o amor por nós! Tudo que eu, o Lucas e o Ricardo somos e conquistamos é por você e para você!

Aos meus irmãos queridos, vocês são a maior companhia que eu tenho na vida! Desde que eu nasci vocês seguram a minha mão, estão comigo e torcem por mim! “Irmão é aquele que lhe empurra, depois corre e faz a curva para poder lhe segurar!” Obrigada por sempre me empurrarem e segurarem! Vocês fazem parte de mim e tem um pedaço do meu coração! Vocês são motivos de muita alegria para mim, tornaram-se homens maravilhosos e eu tenho muito orgulho disso! Eu amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Fapesp**, por ter financiado a pesquisa através do auxílio (2016/13944-5) e por minha bolsa de mestrado (2016/16743-3) que me suportou na cidade de São Paulo.

À **FOUSP**, pela possibilidade de realizar o mestrado nessa instituição tão reconhecida internacionalmente e a todos os mestres e funcionários que através do trabalho de cada um deram meios para que esse sonho se tornasse realidade! Agradeço também ao **Laboratório de Pesquisa Básica**, em nome da Professora **Márcia Martins Marques**, pela estrutura e suporte técnico no desenvolvimento da maior parte da pesquisa.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha orientadora**, Professora Carla Renata Sipert**, por tudo que vivemos juntas nesses dois anos! Querida “Profe” (como sempre te chamei): eu entrei no mestrado querendo muito trabalhar com células, o tema sempre me fascinou, mas o que eu sabia era muito pouco ou quase nada e você sempre me dizia: “você vai conseguir!” Hoje termino esse projeto, olho para trás e vejo o quanto eu aprendi, ou seja, o quanto você me ensinou! Obrigada por tantas e tantas vezes ter ido ao laboratório para demonstrar os experimentos e tantas outras para me acompanhar, obrigada por ter teu celular sempre disponível para que eu tirasse dúvidas a qualquer momento, obrigada por sempre permitir que eu entrasse na sua sala e falasse contigo, sem nunca ter que marcar horário ou nada parecido! Obrigada pela sua disponibilidade de ensinar, isso é lindo! Agradeço também por ter acreditado em mim, por nunca ter me desanimado e por ter sempre respeitado a minha curva de aprendizagem. Nem sempre os experimentos deram certo na primeira vez, eu errei algumas vezes, mas com o seu apoio e incentivo consegui melhorar e alcançar os nossos objetivos, tudo que que deu certo foi muito recompensador! A sua paixão pela biologia molecular inspira muito teus alunos, e me inspirou! Termino este trabalho feliz, realizada e motivada! Obrigada pela pessoa íntegra que é, pelo teu amor ao teu trabalho, a pesquisa e as células, por já ter dito várias vezes: “eu quero que meus alunos trabalhem felizes! Você está feliz, Laís?”, obrigada de coração pelo nosso convívio nesses dois anos, pela sua orientação, paciência e pela oportunidade de me ajudar a crescer na

realização desse sonho. Sinto-me honrada e feliz por ser sua orientada, terei sempre muito carinho e gratidão! Obrigada, obrigada e obrigada!

Outro agradecimento especial ao **Professor Carlos Ferreira dos Santos**, meu coorientador: obrigada por ter me aceito como sua coorientada, contar com a sua experiência e conhecimento foi de grande valia para a nossa pesquisa. Agradeço também por ter aberto as portas do laboratório na FOB-USP e me acolhido para que eu pudesse realizar uma parte do meu trabalho com vocês. Ao querido **Thiago José Dionísio**, a semana que passei em Bauru foi de muito aprendizado para mim e tive resultados que me deixaram muito feliz, obrigada por ter me ensinado tanto com toda sua humildade frente a tudo que você sabe.

Também não posso deixar de agradecer a todos os professores da FO-USP por todo o conhecimento adquirido no mestrado! Em especial, **Professor Giulio Gavini**, tenho muito orgulho por ter sido sua aluna, tenho uma admiração muito grande por você. Apesar do professor tão reconhecido que é, sempre teve toda a humildade para ensinar, isso é encantador! **Professor Celso Luiz Caldeira,** você foi meu professor na especialização e foi lá que o sonho de ser mestre começou a se concretizar. Você é uma pessoa muito fácil de conviver e tranquila! A Endodontia ficou leve tendo você como mestre, me encantei com a nossa especialidade e você é um dos grandes responsáveis por isso e por esse mestrado ter se tornado realidade! Obrigada por ser exemplo e por sempre ter acreditado em mim! **Professora Ericka Tavares Pinheiro,** você é uma grande professora, cresci e muito contigo, obrigada por todos os ensinamentos e por ter me feito evoluir! **Professor Fernando Neves Nogueira**, obrigada por ter disponibilizado seu laboratório para que eu fizesse uma boa parte dos meus experimentos! Agradeço também por ter sempre um sorriso no rosto e uma palavra de motivação, foi sempre muito importante o seu alto astral. **Professora Mary Caroline Skelton Machado**, você é tão querida que nem parece de verdade, obrigada por ser tão doce e teu coração sempre nos acalmar. **Professora Marinella Houlzhausen Caldeira**, obrigada por ser tão querida e inteligente, por nos emprestar reagentes na hora do aperto e por ser tão inspiradora.

Minha colega, amiga e dupla **Claudia**: você é uma das pessoas mais sensacionais que eu conheço e Deus me deu essa honra de te colocar ao meu lado! Amiga, você é incrível, eu não tenho palavras para te agradecer e para te dizer o quanto você foi importante nesses dois anos! Obrigada por ter me ajudado tanto, é

impossível enumerar quantas vezes você me estendeu a mão! Obrigada por eu poder sempre contar contigo! Obrigada pela tua companhia, presença, doçura, paciência ser o meu porto-seguro no mestrado! Você cuidou de mim, se preocupou comigo, esteve ao meu lado nos meus dias difíceis, me abraçou, me apoiou, me deu a mão, me deu um colo, me deu tua amizade... E eu não consigo agradecer por tudo isso, é impossível! Você conquistou o meu coração de um forma que eu acho que você nem imagina, eu tenho o maior carinho por você e tenho certeza do futuro brilhante que terá, o teu sucesso é garantido por tudo que você se dedica, é inteligente, responsável e principalmente pelo ser humano maravilhoso que você é! Te amo muito, minha amiga e meus mais sinceros agradecimentos!!

**Juliana**, você alegrou muito esse mestrado, minha amiga! Que alegria poder ter uma energia dessas e uma pessoa incrível como você na nossa rotina! Você é sensacional, tua presença deixa tudo leve e divertido! **Luiza**, minha querida amiga, você é demais! Obrigada por essa amizade linda que construímos, você é luz e traz luz e sem você não tem graça! **Fernanda**, nós entramos juntas e desde então temos uma a outra, obrigada por essa amizade que construímos, por esse apoio desde as primeiras disciplinas! Você foi e é importante demais! **Rennan**, meu amigo que chegou “de intruso”, invadiu a Endodontia e roubou o coração de toda a Dentística, é meu vizinho, e malha comigo: estamos juntos, amigo! **Amandinha**, a nossa amizade estava escrita nas estrelas, da UFRGS, para a USP, para a vida! É uma alegria imensa te ter e poder compartilhar a vida contigo, você é evoluída, amiga! **Carlinhos,** não tem como entrar naquela salinha da pós e não lembrar de você, obrigada pelos nossos papos, conselhos e risadas! Você é nosso pós-doc preferido, talento puro e o próximo professor da USP (se depender da minha torcida)! **Ítallo** querido, que amor de pessoa você é, nunca mais a gente tira A em Estatística, hein?! Minha melhor dupla de trabalho e companheiro nessa vida de pós-graduação desde sempre! **Lucaix**, você é alegria pura, que prazer poder cruzar o meu caminho com o teu e ter descoberto essa amizade! Gosto muito de você, meu amigo, você é um ser humano encantador e pra lá de divertido! **Hermano,** você não é desse planeta, quantas vezes já te disse que você vai brilhar demais? Tua dedicação e esforço encantam a todos! Terá para sempre a minha admiração e torcida! **Juan,** nosso equatoriano preferido, você é muito especial, não existe uma pessoa nesse mundo que te conheça e não tenha um carinho por ti, você vai atrás dos teus sonhos, segue teu coração, isso é demais! **Léo** querido, você é um anjo em forma

de gente, que pessoa forte e determinada que você é, tenho muito orgulho de você! **Pri,** desde o dia que eu cheguei na primeira aula, você me acolheu e sempre foi inspiração, você é uma pessoa maravilhosa e dedicadíssima, te admiro muito! Tua amizade é um presente para mim! **Laís**: acho que você nem imagina a energia que tem. Você sempre me apoiou, me deu força, me incentivou, tua presença ilumina, alegra, você é uma fofa!

**Olívia, Letícia, Sávio, Karin, Carol, Samuel, Erika, Fernanda, Giovanni, Edgar** e a todos que citei acima, obrigada por esse convívio e por sermos muito mais que colegas, sermos amigos de verdade! O mestrado não teria a mesma graça, tudo ficou melhor e mais fácil porque foi com vocês!

Meus colegas de laboratório: **Bruno,** você é um doce de pessoa, obrigada pela tua paciência em me ensinar, você é menino-prodígio, meu amigo! **Emanuel,** você vai muito longe e terá muito sucesso, a tua inteligência é fora do normal e tudo que você faz fica ótimo! Obrigada por te me ajudado e ensinado tanto! **Ana Clara,** não tenho palavras para te agradecer por inúmeras vezes ter me ajudado com toda a paciência do mundo, por parar tudo que você está fazendo para ensinar os outros! Você é uma pessoa maravilhosa e nasceu para isso, é dedicada e tem o dom, terá muitas publicações e será a melhor professora com certeza! **Letícia, Elisa, Fernanda, Carol, Diego, Alessandra, Lucas, Pâmela, Giovana:** obrigada por todo o nosso convívio no laboratório, sempre nos demos muito bem, ajudamos uns aos outros e foi maravilhoso conviver com todos vocês!

Enfim, meus mais sinceros agradecimentos aos profissionais e amigos com os quais tive a honra de trabalhar e conviver, todos deixaram uma marca e levarei todos na memória e no coração! Construí nesses dois anos grandes amizades, tudo que vivemos dentro e fora da pós-graduação ficará sempre registrado como uma época muito feliz da minha vida! Obrigada a tudo e a todos por tudo que vivi, aprendi, cresci e senti!  Foi incrível!

**“Todos os seus sonhos podem se tornar realidade...**

**Se você tiver coragem para persegui-los”**

Walt Disney

## RESUMO

Pizzatto L.N. Angiotensina II na modulação de células de papila apical humana in vitro [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

A Angiotensina II (Ang II), principal peptídeo efetor do Sistema Renina Angiotensina (SRA), tem sido relatada como importante mediador de processos inflamatórios. Considera-se de extrema relevância detectar esse sistema e compreender a modulação da Ang II nas células da papila apical (CPA) considerando que esta população celular é a chave no sucesso na revascularização pulpar. Vale também considerar que a infecção do sistema de canais radiculares pode alterar as funções destas células. Sendo assim, o presente trabalho *in vitro* teve como objetivo elucidar o papel do lipopolissacarídeo (LPS) nas células da papila apical, detectar os componentes do Sistema Renina Angiotensina (SRA) e compreender a modulação da Ang II nas CPA. Para vencer o desafio científico, culturas de células da papila foram estabelecidas e caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo e funcionalmente por Vermelho de Alizarina. Quando estimuladas por LPS, foi feita análise da citotoxicidade por MTT e produção de citocinas e Osteoprotegerina (OPG) por *ELISA*. Em seguida, a detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Renina Angiotensina foi realizada por Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (RT-qPCR) e do peptídeo Ang II por *ELISA*. As células foram estimuladas com LPS, a própria Ang II e um antagonista do receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1) e avaliadas quanto à citotoxicidade por ensaio de MTT, capacidade de formação de nódulos mineralizados por Vermelho de Alizarina e produção de citocinas inflamatórias e OPG por *ELISA*. Os resultados demonstraram que culturas de CPA expressaram níveis típicos de marcadores de células-tronco mesenquimais CD146, CD24 e STR0-1 e formaram nódulos mineralizados com o meio de diferenciação. O estímulo com LPS a 0,1; 1 e 10µg/mL no decorrer de 1, 3, 5, 7 e 14 dias não afetou a viabilidade das CPA. As células estimuladas com LPS apresentaram níveis maiores da quimiocina MCP-1/ CCL-2 a 1µg/mL em uma e 24 horas e a expressão de OPG diminui na presença de LPS a 0,1 e 10µg/mL. Na concentração de 1µg/mL, foi detectada a expressão gênica de

Angiotensinogênio, Renina, Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e AT1. Houve maior expressão de ECA no período experimental de 1 hora com LPS e em 24 horas, apenas AT1 e ECA continuaram presentes. Sendo a produção da proteína soberana, Ang II foi encontrada nas células pelo ELISA. Os ensaios funcionais demonstraram que a Ang II aumentou a proliferação celular em 24, 48 e 72 horas. Em 24 horas, a presença do peptídeo efetor do SRA aumentou a produção da quimiociona MCP-1/ CCL-2 e do ligante do ativador do receptor do fator nuclear- κB (RANKL). Concluímos que o LPS foi capaz de alterar funcionalmente as CPA, que o Sistema Renina Angiotensina está presente e a Ang II tem capacidade de modulação pró-inflamatória, proliferativa e de reabsorção óssea nesta população celular.

Palavras-chave: Papila Dental, Células-Tronco, Sistema Renina Angiontensina, Angiotensina II

## ABSTRACT

Pizzatto L.N. Angiotensin II in the modulation of apical human papilla cells *in vitro* [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Angiotensin II (Ang II), the main effector peptide of the Renin Angiotensin System (SRA), has been reported as an important mediator of inflammatory processes. It is considered of extreme relevance to detect this system and understand the modulation of Ang II in the apical papilla cells (CPA) considering that this cellular population is the key in the success in pulpar revascularization. It is also worth noting that infection of the root canal system can alter the function of these cells. The aim of the present work was to elucidate the role of lipopolysaccharide (LPS) in the apical papilla cells, to detect the components of the Renin Angiotensin System (SRA) and to understand the modulation of Ang II in the CPA. To overcome the scientific challenge, cultures of papilla cells were established and characterized phenotypically by flow cytometry and functionally by Alizarin Red. When stimulated by LPS, cytotoxicity by MTT and cytokine and Osteoprotegerin (OPG) were analyzed by ELISA. Next, the detection of the gene expression of the components of the Renin Angiotensin System was performed by Reverse Transcription followed by quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and the Ang II peptide by ELISA. The cells were stimulated with LPS, Ang II itself and an Angiotensin II receptor antagonist type 1 (AT1) and evaluated for cytotoxicity by MTT assay, alizarin red mineralized nodule formation capacity, and production of inflammatory cytokines and OPG by ELISA. The results demonstrated that CPA cultures expressed typical levels of CD146, CD24 and STR0-1 mesenchymal stem cell markers and formed mineralized nodules with the differentiation medium. The stimulus with LPS at 0.1; 1 and 10µg/mL in the period of 1, 3, 5, 7 and 14 days did not affect the viability of CPA. LPS-stimulated cells had higher levels of 1µg/mL chemokine MCP-1/CCL-2 at one and 24 hours and OPG expression decreased in the LPS presence at 0.1 and 10µg/mL. At the concentration of 1 µg/mL, the gene expression of Angiotensinogen, Renin, Angiotensin Converting Enzyme (ECA) and AT1 was detected. There was greater expression of ACE in the experimental period of 1 hour with LPS and in 24 hours, only AT1 and ACE remained present. Being the protein production sovereign, Ang II

was found in the cells by the ELISA. Functional assays demonstrated that Ang II increased cell proliferation at 24, 48 and 72 hours. In 24 hours, the presence of the effector peptide of SRA increased the production of the chemokine MCP-1/CCL-2 and the activator of the nuclear factor receptor-KB (RANKL). We conclude that LPS was able to functionally alter CPA, that the Renin Angiotensin System is present and Ang II has the capacity for pro-inflammatory, proliferative and bone resorption modulation in this cell population.

Key words: Dental Papilla, Stem Cells, Renin Angiontensin System, Angiotensin II

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| ALP | do inglês, *alcaline phosphatase* |
| Ang (1-7) | Angiotensina (1-7) |
| Ang I | Angiotensina l |
| Ang II | Angiotensina II |
| ANOVA | Análise de Variância |
| AT1 | Receptor de Angiotensina II tipo 1 |
| AT2 | Receptor de Angiotensina II tipo 2 |
| BMMSC | do inglês, *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells* |
| BMP-4 | do inglês, *Bone Morphogenetic Protein 4* |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| BSP | do inglês, *bone sialoprotein* |
| cDNA | DNA complementar |
| $CO_2$ | Gás Carbônico |
| CPA | Células da Papila Apical |
| $C_T$ | do inglês, cicle threshold |
| DEPC | Água com Dietil Pirocarbonato |
| DLX-5 | do inglês, *distal-less homeobox 5* |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DPSC | do inglês, *Dental Pulp Stem Cells* |
| DSPP | do inglês, *Dentin Sialophosphoprotein* |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| ECA | Enzima Conversora de Angiotensina |
| ECA-2 | Enzima Conversora de Angiotensina-2 |
| ELISA | do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* |
| ERK | do inglês, Extracellular-signal-regulated kinase |
| FGFR | do inglês, *Fibroblast Growth Factor Receptor* |
| GAPDH | do inglês, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase |

| | |
|---|---|
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Interleucina- 6 |
| IL-8 | Interleucina- 8 |
| LAL | do inglês, *Limulus Amebocyte Lysate* |
| $KH_2PO_4$ | fosfato monopotássico |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LTA | Ácido Lipoteicóico |
| MCP-1 | do inglês, Monocyte Chemoattractant Protein |
| M-CSF | Estimulador de Colônias de Macrófagos |
| MD | Meio de Diferenciação |
| MP | Meio de Proliferação |
| MSCs | do inglês, *Mesenchymal Stem Cells* |
| MTA | Agregado Trióxido Mineral |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato |
| NF-KappaB | Fator de Transcrição Nuclear kappaB |
| NK | Natural Killer |
| ODF | Fator Diferenciador de Osteoclastos |
| OPG | Osteoprotegerina |
| OPN | Osteopontina |
| *P.gingivalis* | Porphyromonas gingivalis |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados a Patógenos |
| PBS | do inglês, Phosphate Buffered Saline |
| PCR | do inglês, *Polimerase Chain Reaction* |
| $PGE_2$ | Prostaglandina $E_2$ |
| qPCR | do inglês, *quantitative-Polimerase Chain Reaction* |
| RANK | Receptor para a Ativação do Fator de Transcrição Nuclear kappaB |
| RANKL | Ligante do ativador do Receptor do Fator Nuclear kappa B |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RNAm | RNA mensageiro |

| | |
|---|---|
| RUNX-2 | do inglês, *Runt- Related Transcription Factor 2* |
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SCAP | do inglês, Stem Cells of Apical Papilla |
| SRA | Sistema Renina Angiotensina |
| STRO-1 | Estromatina 1 |
| TGFBRI | do inglês, *Transforming Growth Factor-B Receptor Type 1* |
| TGF-β1 | Fator de Crescimento Transformador beta |
| TNF- α | do inglês, Tumor Necrosis Factor Alpha |
| α-MEM | do inglês, $\alpha$*-Modified Eagle Medium* |

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| µg | microgramas |
| µM | micromol |
| G | força g |
| mg | miligramas |
| mL | mililitros |
| mmol | milimol |
| ng | nanogramas |
| nm | nanometros |
| nmol | nanomol |
| ºC | graus Celsius |
| pg | picogramas |

**SUMÁRIO**


**1 INTRODUÇÃO** ..... 25
**2 REVISÃO DA LITERATURA** ..... 27
2.1 NECROSE PULPAR E A INTERRUPÇÃO DA RIZOGÊNESE ..... 27
2.2 CÉLULAS DA PAPILA APICAL (CPA) ..... 29
2.3 CPA E A ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA ..... 32
**2.3.1 Viabilidade e diferenciação celular ..... 32**
**2.3.2 Expressão de citocinas inflamatórias ..... 34**
2.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA) ..... 38
**2.4.1 Evidências de um Sistema Renina Angiotensina Bucal ..... 40**
**2.4.2 Interação entre Inflamação e Angiotensina II ..... 42**
**3 PROPOSIÇÃO ..... 47**
**4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 49**
4.1 PRIMEIRA FASE ..... 49
**4.1.1 Obtenção das células da papila apical ..... 49**
**4.1.2 Caracterização fenotípica das células da papila apical ..... 50**
**4.1.3 Caracterização funcional: diferenciação celular ..... 51**
4.2 SEGUNDA FASE ..... 52
**4.2.1 Viabilidade celular – estímulo com LPS ..... 52**
**4.2.2 Detecção de produção in vitro de citocinas inflamatória – estímulo com LPS ..... 53**
4.3 TERCEIRA FASE ..... 54
**4.3.1 Detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Renina- Angiotensina (SRA) nas CPA ..... 54**
**4.3.2 Detecção de produção in vitro de Angiotensina II ..... 55**
4.4 QUARTA FASE ..... 56
**4.4.1 Papel da Angiotensina II nas CPA in vitro ..... 56**
*4.4.1.1 Viabilidade celular ..... 56*
*4.4.1.2 Detecção de produção in vitro de citocinas inflamatórias ..... 57*
*4.4.1.3 Diferenciação celular de CPA ..... 57*
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 58

**5 RESULTADOS ..... 59**
5.1 PRIMEIRA FASE ..... 59
**5.1.2 Obtenção das células da papila apical ..... 59**
**5.1.3 Caracterização fenotípica das células da papila apical ..... 59**
**5.1.3 Caracterização funcional: diferenciação celular ..... 61**
5.2 SEGUNDA FASE ..... 61
**5.2.1 Viabilidade celular – estímulo com LPS ..... 61**
**5.2.3. Detecção de produção in vitro de citocinas inflamatórias – estímulo com LPS ..... 63**
5.3 TERCEIRA FASE ..... 65
**5.3.1 Detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) ..... 66**
**5.3.2 Detecção de produção in vitro de Angiotensina II ..... 68**
5.4 QUARTA FASE ..... 68
**5.4.1 Papel da Angiotensina II nas CPA: Viabilidade celular ..... 68**
**5.4.2 Papel da Angiotensina II nas CPA: Detecção de produção de citocinas inflamatórias por ELISA ..... 71**
**5.4.3 Papel da Angiotensina II nas CPA: Diferenciação celular ..... 74**
**6 DISCUSSÃO ..... 77**
6.1 CÉLULAS DA PAPILA APICAL E O ESTÍMULO COM LPS ..... 77
6.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NAS CÉLULAS DA PAPILA APICAL ..... 79
**7 CONCLUSÃO ..... 85**
**REFERÊNCIAS ..... 87**
**ANEXO ..... 103**

# 1 INTRODUÇÃO

O processo de evolução da cárie dentária ou as injúrias traumáticas nos dentes permanentes jovens levam à inflamação pulpar e/ou necrose associada à lesão periapical, com a consequente interrupção da formação radicular. A presença de um ápice aberto, raízes curtas e paredes dentinárias delgadas é um problema para a longevidade do elemento dental.

De fato, o tratamento endodôntico em dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta é um grande desafio e a busca por tratamentos que melhorem o prognóstico e manutenção destes dentes é um dos temas mais estudados da Endodontia atual. Novos protocolos terapêuticos regenerativos surgiram e com o novo método de revascularização pulpar, há possibilidade de aumento do comprimento radicular, espessamento das paredes dentinárias e fechamento apical.

Apesar dos recentes avanços no tratamento dos dentes com rizogênese incompleta, os mecanismos envolvidos com a interrupção da rizogênese e a revascularização ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que as células-tronco da papila apical sejam a origem de células envolvidas na revascularização pois estas são conhecidas como a fonte dos odontoblastos da polpa radicular responsáveis pela rizogênese. No entanto, como consequência do comprometimento da vitalidade pulpar, há a invasão de microrganismos resultando em processos inflamatórios na região periapical; portanto, a influência da presença microbiana nas células da papila apical precisa ser esclarecida.

As pesquisas sobre as ações do Sistema Renina Angiotensina (SRA) nos tecidos bucais trazem sólidas informações sobre como a Angiotensina II (Ang II), o principal peptídeo efetor do sistema, é capaz de contribuir com a exacerbação do processo inflamatório, a modulação do crescimento e da proliferação celular e da sua ação na remodelação do tecido ósseo. Além disso, a Angiotensina II apresenta papel bem conhecido e fundamental na homeostase hidroeletrolítica e no controle da pressão arterial do organismo.

Apesar do SRA já ter sido encontrado no ligamento periodontal, gengiva e polpa dental, ainda não existem estudos que detectaram a presença desse sistema nas células da papila apical. Sugere-se que a Ang II esteja presente e envolvida no

processo de progressão das periacopatias e tenha capacidade de modulação desta população celular. Esse conhecimento é essencial para o progresso dos procedimentos clínicos regenerativos empregados pela Endodontia, visto que as células-tronco da papila apical são conhecidas pelo seu papel na formação radicular, e a compreensão destas alterações poderá resultar futuramente em abordagens clínicas com enfoque específico e direcionado à reversão das alterações apresentadas por esse peptídeo.

Portanto, o objetivo do presente estudo *in vitro* é elucidar o papel do lipopolissacarídeo (LPS) sobre as células da papila apical, verificar a presença dos componentes do Sistema Renina Angiotensina (SRA) nessas células, além de avaliar o papel do peptídeo Angiotensina II na modulação das células da papila apical ativadas por LPS.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 NECROSE PULPAR E A INTERRUPÇÃO DA RIZOGÊNESE

Durante o desenvolvimento dentário, a integridade dos tecidos responsáveis pela formação de dentina e cemento é essencial para a estruturação completa da raiz. O comprometimento da polpa dental em consequência às lesões oriundas de cárie ou trauma em uma fase anterior à completude da formação radicular resulta na sua interrupção. Como consequência, o dente afetado terá raízes curtas e paredes dentinárias delgadas (1).

O tratamento tradicionalmente indicado para dentes necróticos com rizogênese incompleta é a apicificação. Tal tratamento consiste em trocas sucessivas de hidróxido de cálcio para possibilitar que uma barreira mineralizada seja formada viabilizando a obturação do canal radicular. As desvantagens deste recurso terapêutico é a necessidade de várias sessões, o que torna o tratamento longo além de que a permanência em longo prazo desta medicação pode fragilizar a raiz devido às propriedades higroscópicas e proteolíticas do hidróxido de cálcio (2). Outra alternativa seria a utilização do MTA para a confecção de um tampão apical, devido a capacidade de selamanto e boa resposta biológica do material (3). Entretanto, tanto a confecção do tampão quanto a apicificação não permitem a continuidade do desenvolvimento radicular, o que poderia manter a fragilidade da raiz e elevar a possibilidade de fratura do elemento dental (3).

A busca por opções de tratamento que melhorem o prognóstico de manutenção de dentes necrosados com rizogênese incompleta é um dos temas mais amplamente investigados pela Endodontia atual, especialmente após a introdução de procedimentos denominados regenerativos. Os novos protocolos terapêuticos regenerativos que visam a continuação do desenvolvimento radicular através da revascularização pulpar têm sido considerados uma promissora técnica para o tratamento endodôntico de dentes necróticos imaturos. A vantagem estaria na formação de um novo tecido no interior do conduto radicular, que permitiria o desenvolvimento contínuo em termos de espessura e comprimento das paredes dentinárias (1).

Os primeiros estudos que avaliaram o papel do coágulo sanguíneo na terapia endodôntica remetem a 1961, quando o trabalho precursor de Ostby (4) demonstrou em estudo histológico de cães que após desinfecção do canal radicular, a presença de sangramento ou coágulo sanguíneo no canal radicular pareceu ser essencial na formação de um arcabouço de suporte para a estruturação de tecido conjuntivo fibroso em um canal vazio.

Banchs e Trope (2004) foram um dos pioneiros que propuseram uma técnica para revascularização de dentes permanentes jovens com ápices abertos e periodontite apical (5). De acordo com o caso relatado, a descontaminação do canal foi realizada com profusa irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% seguida pela aplicação de uma pasta tripla antibiótica a base de Ciprofloxacino, Metronidazol e Minociclina como medicação intracanal por 28 dias. Após este período procedeu-se o debridamento apical com o objetivo de produzir sangramento para a formação de um coágulo no interior do canal e realizado o selamento coronário. Acompanhamentos clínico e radiográficos encontraram o paciente assintomático e mostraram desaparecimento da radioluscência apical, com fechamento do ápice e espessamento das paredes radiculares. Os autores concluíram que esta técnica, ao combinar a desinfecção do canal radicular, a formação de uma matriz de coágulo para o crescimento do novo tecido e um efetivo selamento coronário, criaria um ambiente adequado para o sucesso da revascularização, sugerindo-a como uma alternativa ao tratamento de apicificação tradicional.

Muitos relatos de caso semelhantes ao anterior surgiram na literatura com o passar do tempo. Foram observados casos de necrose pulpar e rizogênese incompleta que com o tratamento de revascularização obtiveram sucesso clínico e radiográfico através de regressão da sintomatologia e lesão periapical, aumento do comprimento radicular, espessamento das paredes e fechamento apical (6-8).

A publicação de casos de sucesso levou ao crescente reconhecimento do potencial de procedimentos regenerativos no tratamento do dente permanente imaturo necrótico. Porém, apesar do interesse atual pelo tema, os mecanismos moleculares envolvidos com a interrupção da rizogênese e a revascularização ainda não são totalmente conhecidos, bem como a diferenciação celular que ocorre após o preenchimento com coágulo.

Um achado científico recente, que pode explicar em parte porque ocorre deposição de tecido mineralizado nesses dentes permanentes imaturos infectados, é

a descoberta e isolamento de uma nova população de células mesenquimais na papila apical (9).

## 2.2 CÉLULAS DA PAPILA APICAL (CPA)

No ano de 2000 a equipe de Shi foram os precursores nas pesquisas de células-tronco na área de Odontologia. Eles encontraram uma população de células indiferenciadas na polpa dental humana – DPSCs (do inglês, *dental pulp stem cells*) e observaram que essas células tinham capacidade de regenerar o complexo dentino pulpar injuriado *in vivo* dando origem a um tipo de matriz mineralizada com túbulos, odontoblastos e o tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos similar ao encontrado no dente humano (10).

Atualmente, a literatura relata que não só as células da polpa dentária de dentes permanentes possuem capacidade de auto-renovação e de diferenciação em linhagens variadas; mas também células derivadas da polpa de dentes decíduos (11), papila apical (9), ligamento periodontal (12) e folículo dentário (13) apresentam as mesmas propriedades.

A papila apical tem sido descrita, desde 2006, como uma fonte de células-tronco mesenquimais (SCAPs; do inglês,*Stem Cells from Apical Papilla*) tendo sido isoladas pela primeira vez por Sonoyama et al. (2006) (9). O grupo isolou células da papila apical e verificou por citometria de fluxo que o tecido foi positivo para marcadores de células-tronco mesenquimais: STRO-1, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146 e CD166 mas foram negativas para CD34 (marcador de célula endotelial), CD45 (marcador de linfócitos). Gronthos et al., 2000 (10) e Shi et al., 2003 (14) já haviam identificado o STRO-1 e o CD146 como marcadores precoces de células-tronco mesenquimais presentes tanto em BMMSCs (do inglês, *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) como em DPSCs. Bakopoulou et al., 2013 (15) verificaram também estes marcadores em células-tronco da papila.

Sonoyama et al., 2006 (9) observaram a capacidade das células da papila de formar colônias e de diferenciação osteo/ odontogênica. SCAPs também expressaram altos níveis de survinina (proteína com função de inibir apoptose) e telomerase (enzima com função de adicionar sequências específicas e repetitivas de

DNA à extremidade 3´dos cromossomos), ou seja, tanto a survinina quanto a telomerase desenvolvem um papel crítico na proliferação e sobrevivência celular. Para elucidar qual a função da CPA, os autores removeram a papila apical de molares de mini-porcos no estágio inicial de desenvolvimento. Esse procedimento interrompeu o desenvolvimento de tal raiz, apesar de o tecido pulpar permanecer intacto. Segundo os autores, a partir desse estudo, é possível especular que as SCAPs, e não as DPSCs, são a fonte celular dos odontoblastos primários.

Nesse mesmo estudo de Sonoyama et al., 2006 (9), células-tronco da papila foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos, utilizando-se partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico como carreadores. Uma típica estrutura dentinária foi regenerada, sendo que uma camada de dentina foi formada na superfície de hidroxiapatita/fosfato tricálcico com tecido conjuntivo.

Dois anos após, Sonoyama et al., 2008 (16) caracterizaram a papila apical e as propriedades das SCAPs utilizando análises histológicas, imunohistoquímicas e de imunofluorescência e as compararam com DPSCs (células tronco da polpa dentária). As células da papila apical proliferaram de 2 a 3 vezes mais que as da polpa em cultura. Ambas SCAPs e DPSCs foram tão potentes na diferenciação osteo/ dentinogênica quanto células tronco da medula óssea. O imunofenótipo de SCAP é semelhante ao das DPSCs nos perfis genéticos osteo/ dentinogênico e de fatores de crescimento. Experimentos mostraram que STRO-1 co-expressa marcadores dentinogênicos como sialofosfoproteína óssea, osteocalcina e receptores de fatores de crescimento como FGFR1 (do inglês, *Fibroblast Growth Factor Receptor)* e TGFBRI (do inglês, *Transforming Growth Factor-B Receptor Type 1*). Além disso, as SCAPs expressaram uma grande variedade de marcadores neurogênicos, como nestina e neurofilamento M após estimulação neurogênica. Os autores concluíram que as SCAPs são similares às DPSCs, mas uma fonte distinta e potente de células-tronco.

Bakopoulou et al., 2011 (17) também compararam *in vitro* o potencial osteo/odontogênico de diferenciação de MSCs (do inglês, *Mesenchymal Stem Cells)* derivadas da polpa ou da papila apical de dentes permanentes em desenvolvimento e verificaram que as SCAPs mostraram um potencial significativamente maior de proliferação e mineralização quando comparado às DPSCs.

De fato, as células tronco da papila apical representam uma população de células-tronco multipotentes que são altamente proliferativas e capazes de se

diferenciarem em diferentes tecidos Estudos já relacionaram alguns fatores de crescimento com a diferenciação odontogênica (18), osteogênica (19) e condrogênica (20) de CPAs: demonstrando o potencial vasto destas células. As SCAPs apresentam características semelhantes às DPSCs, mas parecem ser uma fonte primária de odontoblastos (dentina primária), enquanto as DPSCs são fontes de substituição de odontoblastos para produzir dentina reparativa (9, 16).

Devido à sua localização apicalmente à polpa dental, a papila dentária pode sobreviver apesar da ocorrência de necrose pulpar graças à proximidade com o osso alveolar (21). Por outro lado, Huang et al., 2008 (22) também verificaram que a remoção cirúrgica deste tecido em estágios precoces de formação radicular leva à interrupção da rizogênese ainda que na presença de polpa dental vital.

Huang e colaboradores em 2010 (23) demonstraram que as SCAPs têm a habilidade de se diferenciar em odontoblastos e serem as responsáveis pela revascularização in vivo. Porém, mesmo com o potencial de diferenciação odontogênica das SCAPs, procedimentos endodônticos regenerativos não resultam na formação de dentina e tecido pulpar. A revascularização em dentes necróticos está associada com deposição de tecido ósseo e de cemento no espaço antes ocupado pela polpa, enquanto dentina foi somente observada em dentes com pulpite irreversível.

Estudos *in vivo* empregando o modelo experimental de indução de necrose pulpar e lesão periapical em ratos com molares ainda em formação foram conduzidos por Böttcher et al., 2013 (24) e Tobias Duarte et al., 2014. (21). Em ambos estudos, a exposição pulpar levou à interrupção da rizogênese. Ao contrário dos espécimes dos grupos com polpa intacta, a imunomarcação para estromatina STRO-1 (marcador de células-tronco de tecidos dentários) e BMP-4 (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein 4)* deixa de ser observada na papila dentária dos grupos com exposição pulpar (24). Tobias Duarte et al., 2014 (21) observaram, 60 dias após exposição pulpar, a presença de tecido pulpar vital e de reabsorção óssea periapical. Após 90 dias de infecção, os autores relatam a presença de tecido vital na região correspondente à papila dentária, mas não mais na cavidade pulpar. Estes dados demonstram alterações teciduais importantes na região da papila apical destes dentes, porém sem elucidar o que ocorre com as células indiferenciadas ao longo do processo. Adicionalmente, observa-se a presença marcante de fibrose -

matriz extracelular ao redor da papila dentária dos dentes com comprometimento pulpar (21, 24).

Esses estudos permitem especular que a instalação de um processo inflamatório no tecido pulpar de dentes em formação resultaria em alterações fenotípicas e funcionais nas células da papila dentária que possivelmente comprometeriam a formação radicular destes dentes.

Os achados abrem uma série de questionamentos a respeito dos fenômenos celulares e moleculares responsáveis pela interrupção da rizogênese em dentes com comprometimento pulpar precoce, o que sugere a importância de se investigar o conjunto de células que compõem a papila apical para a compreensão dos fenômenos envolvidos com sobrevivência e função celulares.

## 2.3 CPA E A ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA

### 2.3.1 Viabilidade e diferenciação celular

A interrupção da rizogênese ocorre clinicamente mediante comprometimento da vitalidade pulpar com consequente colonização microbiana da cavidade pulpar (25). A invasão de microrganismos para a região periapical resulta na instalação de processos inflamatórios na papila apical e periápice.

Bactérias gram-negativas são os microrganismos mais comuns na polpa necrótica. O lipopolissacarídeo (LPS) é uma combinação de lipídeo polissacarídeo, sendo um componente exclusivo da membrana externa de bactérias gram-negativas (26). Esta endotoxina é um antígeno não específico liberado na morte celular.

Herrera et al., 2015 (27) confirmaram a presença bacteriana e de seus subprodutos, como o LPS, em todas as amostras de dentes com infecção endodôntica primária, indicando uma forte correlação entre bactérias e LPS com a indução de periodontite apical. A concentração de LPS em canais radiculares avaliados por LAL (do inglês, *Limulus Amebocyte Lysate*) é entre 0,001 e 0,1 µg/mL (28, 29). Porém, a técnica consegue coletar apenas algumas moléculas do LPS,

sendo que a concentração exata presente nos canais radiculares possivelmente seria maior que a reportada devido à limitação do método.

Estudos têm mostrado que a exposição de células indiferenciadas ao LPS bacteriano não interfere na proliferação e viabilidade das células pré-osteoblásticas (30, 31), células mesenquimais de medula-óssea (32), células mesenquimais de tecido adiposo e células do ligamento periodontal (33, 34).

Estudo realizado por Lertchirakarn e Aguilar em 2017 (35) que avaliou os efeitos do LPS de *P. gingivalis* na proliferação das células-tronco da papila apical verificaram que todas as concentrações de LPS estudadas (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 5 µg/mL) não alteraram a viabilidade e proliferação celular. O estudo de Albiero e colaboradores de 2015 (36) demostrou que a exposição ao LPS de *Escherichia coli* diminuiu a proliferação de células do ligamento periodontal.

As concentrações do lipopolisssacarídeo também possuem diferentes efeitos. LPS de *E. coli* a 0,1 µg/mL aumentou a proliferação de células tronco da polpa, enquanto a 10 µg/mL diminuiu a proliferação celular(37).

Em estudo recente de 2017, Vishwanat e colaboradores (38) mostraram que as células-tronco da papila na presença de biofilme de *Enterococcus faecalis* reduziram o potencial de diferenciação osteo/ odontogênica quando avaliados por 14 dias. Os genes dentinogênicos DSPP (do inglês, *Dentin Sialophosphoprotein)* e ALP (do inglês, *alcaline phosphatase*) diminuíram e os osteoblásticos – BSP (do inglês, *bone sialoprotein*), RUNX-2 (do inglês, *runt- related transcription factor 2*), DLX-5 (do inglês, *distal-less homeobox 5*) e Osteocalcina aumentaram. De fato, o trabalho demonstrou que a diferenciação das SCAPs tem um fenótipo osteoblástico na presença de bactérias.

Lertchirakarn e Aguilar em 2017 (35) observaram a diferenciação osteogênica das células da papila na presença do lipopolissacarídeo a 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 5 µg/mL e em ensaio de vermelho de Alizarina não houve diferença na mineralização em 14 dias. A presença da toxina também não acarretou diferença na expressão dos genes DSPP – uma proteína não colagenosa da dentina, presente no processo de diferenciação e OPN (osteopontina) - relacionado com a mineralização da matriz extracelular.

Nomiyama et al., 2007 (39) estudaram células da papila apical de ratos e verificaram que estas apresentaram altos níveis de fosfatase alcalina (ALP), RUNX-2, DSPP e nódulos mineralizados. As células foram estimuladas com LPS e

verificou-se que a atividade de ALP, DSPP e RUNX-2 foram suprimidas de modo concentração-dependente do LPS. Os resultados demonstraram que a presença bacteriana pode diminuir a função dos odontoblastos.

No trabalho realizado por Abe et al., 2010 (40), em células da polpa humana, baixas concentrações de extratos de *P. gingivalis* aumentaram a deposição de matriz mineralizada de fosfatase alcalina e BSP enquanto que altas concentrações inibiram este processo. Outros trabalhos mostraram que o LPS inibiu a diferenciação de células-tronco da polpa (34, 41, 42, 43).

He et al., 2015 (37) verificaram que nas células da polpa, LPS de *E. coli* a 0,1; 1 e 10 µg/mL aumentaram a deposição mineralizada em relação ao controle. Em células do ligamento periodontal, o LPS não teve alteração na mineralização (Albiero et al., 2015). Já em células do folículo dental, o processo de maturação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico foi comprometido pela exposição ao LPS de *P. gingivalis*, tendo como consequência menor formação de matriz mineralizada (44).

Por sua vez, Mo et al., 2008 (32) observaram que as células mesenquimais da medula óssea podem adaptar-se ao estímulo com LPS contínuo, assim estas células seriam poupadas do efeito tóxico do LPS, conduzindo-as a um paradoxal aumento nas atividades osteogênicas

Esses resultados sugerem que as toxinas bacterianas podem influenciar o processo de proliferação e diferenciação celular em ambas as direções e que, os resultados observados estão diretamente relacionados à origem das células mesenquimais, a concentração e o tipo de LPS utilizado. Fica também claro que a compreensão da interação entre as células que residem na papila apical e as toxinas bacterianas torna-se fundamental uma vez que estas células são a principal fonte dos processos regenerativos.

### 2.3.2 Expressão de citocinas inflamatórias

A exposição a um ambiente enriquecido de toxinas pode afetar muitos aspectos das propriedades de células como também a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como ácidos nucléicos microbianos e componentes de parede celular como Ácido Lipoteicóico (LTA) e Lipopolissacarídeo (LPS) estão presentes em diversos organismos, mas não no hospedeiro. A presença destas moléculas em um tecido dispara um alerta para o sistema imunológico sugerindo a presença de patógenos (45).

Citocinas liberadas a partir da instalação de processos inflamatórios têm sido sugeridas como potenciais moduladores da biologia de SCAP. O fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1) se mostrou quimiotático para células de papila apical murina (MDPC-23) (46). Em células humanas, TGF-β1 induziu a atividade de fosfatase alcalina em concentrações baixas, porém a inibiu em concentrações superiores a 5 ng/mL (47). Esta citocina é capaz de aumentar a formação óssea (48).

Entretanto, durante processos de dano tecidual, a diferenciação de células-tronco em miofibroblastos pode ocorrer levando a quadros de fibrose, o que compromete a qualidade do tecido cicatricial (49). Um estudo relatou que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α (do inglês, Tumor necrosis factor alpha) e IL-1β (do inglês, interleukin 1 beta) aumentaram a proliferação celular de células-tronco derivadas da polpa dental após 3 dias de estimulação, mas diminuíram a proliferação celular após 12 dias (50). Estudo de Liu et al., 2016 (51) demonstrou que as citocinas TNF-α e IL-1β são capazes de inibir a diferenciação *in vitro* de SCAP em odontoblastos em períodos de exposição prolongada (7-14 dias). Estas descobertas fornecem evidências para explicar o impacto da inflamação no desenvolvimento dentário.

O LPS que alcança os tecidos perirradiculares via forame apical pode estimular a expressão e a síntese de quimiocinas que irão atrair células inflamatórias para a região. Por meio de imuno-histoquímica, Marton et al., 2000 (52) detectaram três importantes quimiocinas em lesões perirradiculares crônicas: IL-8 (quimiotática para neutrófilos), MCP-1 (do inglês, *monocyte chemoattractante protein - 1*)/ CCL-2 (quimiotática para monócitos/macrófagos) e CCL5 (quimiotática para linfócitos T e outros leucócitos). A distribuição diferenciada de MCP-1/ CCL-2, a única quimiocina presente no endotélio, sugere que esteja envolvida no contínuo recrutamento de células de defesa para a região.

MCP-1/CCL2 é um membro da família de citocinas que possui uma potente capacidade quimiotática para monócitos. Tal quimiocina é produzida por vários tipos

de células constitutivamente ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento (53). CCL2 regula a migração e a infiltração de monócitos, linfócitos T de memória e células natural killer(NK).

A expressão de MCP-1/ CCL-2 tem sido encontrada em infecções bacterianas, especificamente na inflamação gengival (54, 55) e na inflamação óssea associada a lesões de origem endodôntica (56). Nesse sentido, a expressão aumentada de CCL2 / MCP-1 foi demonstrada nas lesões periapicais crônicas quando comparadas com dentes saudáveis (57) e em casos de periodontopatias refratárias (58). Estudos também já verificaram que a expressão de RNAm de CCL2 diminuiu após procedimentos de limpeza e modelagem de canais radiculares em dentes necróticos que tem por finalidade a redução da carga microbiana (59, 60).

Jiang et al., 1998 (61) estimularam células sanguíneas mononucleares com 0,01; 0,1; 1 e 10µg/mL de LPS de *Streptococcus mutans, Porphyromonas endodontalis* e *Peptostreptococcus anaerobius*, que estão associados a lesões de origem endodôntica. Cada uma destas bactérias induziu um aumento dose-dependente de IL-8 e CCL-2, determinado por ELISA. No entanto, doses baixas de *P. endodontalis* foram menos efetivas na indução da expressão de IL-8 ou MCP-1, em comparação com *S. mutans* ou *P. anaerobius*. Assim, essas bactérias podem induzir níveis significativos das quimiocinas IL-8 e CCL-2, o que poderia contribuir para o recrutamento de células inflamatórias.

A agressão proveniente do canal radicular pode levar a reabsorção óssea com a formação de uma lesão periapical. Os mediadores químicos envolvidos principalmente na regulação da osteoclastogênese, incluem o ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL), o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e a Osteoprotegerina (OPG) (62). A ligação do RANKL ao RANK (receptor para a ativação do fator de transcrição NF-kB) ativa uma cascata de expressão de sinais que conduz à osteoclastogênese. A OPG, proteína também produzida por osteoblastos representa um outro receptor para RANKL, e dessa maneira pode inibir a ligação de RANKL com RANK, impedindo assim a maturação do osteoclasto e, consequentemente, a perda de massa óssea (63). Sob condições fisiológicas existe equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Em determinadas condições inflamatórias, no entanto, o equilíbrio entre a expressão de RANKL (estimulador da osteoclastogênese) e OPG (inbidor) é alterada de modo que a formação do osso ou reabsorção excessiva possam ocorrer.

Kikuchi et al., 2001 (64) investigaram os efeitos do LPS na expressão gênica do Fator Diferenciador de Osteoclastos (ODF), uma citocina da família TNF, em osteoblastos de camundongo e descobriram que o LPS aumentou o nível de RNAm para ODF. Os resultados indicaram que a expressão do gene ODF está diretamente aumentada nos osteoblastos pelo tratamento com LPS, o que pode desempenhar um papel importante na patogênese das desordens ósseas mediadas por LPS.

Um estudo utilizou transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para avaliar a expressão do mRNA para RANKL, RANK e OPG e citocinas em lesões perirradiculares experimentais em ratos e demonstrou que a expressão do RANKL aumentou, sobretudo em comparação com o seu competidor OPG, durante o período de expansão da lesão (65). A expressão de citocinas inflamatórias como IL-1β e TNF-α também aumentaram nesse estágio, indicando sinergismo entre RANKL e citocinas na expansão da lesão.

Chuang et al., 2012 (66) também realizaram um estudo para analisar a expressão de RANKL e OPG em lesões periapicais de ratos induzidas experimentalmente. LPS de *Escherichia coli* (embebido em ponta de papel) foi depositado no canal distal exposto do primeiro molar inferior, até o ápice. Reabsorção óssea periapical, expressão/ localização de RANKL e OPG e formação de osteoclastos foram seguidos durante um período de 8 semanas. Um aumento na expressão do RANKL foi observado após 3 semanas de exposição culminando em 208% em comparação ao controle pulpar não exposto depois de 8 semanas. Já a expressão OPG oscilou entre as semanas 1 e 8, mas foi detectado em menores níveis do que o grupo de controle.

Foi constatado que o tipo de infiltrado inflamatório presente nos cistos perirradiculares parece influenciar a expressão de RANK/RANKL/OPG. Na presença de infiltrado crônico, há uma grande probabilidade de aumento da atividade osteolítica como efeito de uma razão superior de RANKL / OPG (67).

Um estudo realizado por Wada et al., 2004 (41), demonstrou que em fibroblastos de ligamento periodontal, o LPS é capaz de induzir o aumento de RNAm de OPG e RANKL devido aos estímulos de IL-1β ou TNF-α, porém, estas células não são capazes de induzir osteoclastogênese. Resultados similares de aumento de RNAm de OPG e decréscimo de RNAm de RANKL foram observados em cementoblastos estimulados com LPS de *P. gingivalis* (68).

Maltos et al., 2004 (69) e Watanabe & Inoue, 2013 (70) verificaram que LPS acumula-se nas lesões periapicais, aumenta a permeabilidade vascular, reúne leucócitos e estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Já foi demonstrado também a indução de osteoclastos e a reabsorção óssea (71). Outros autores sugerem que o LPS é capaz de estimular os odontoblastos, aprimorando a resposta imune inata (72).

Estes achados, sobre a expressão de citocinas na presença de bactérias nas células-tronco, sustentam a hipótese deste estudo em relação à participação de mediadores inflamatórios na modulação de células indiferenciadas. A compreensão do papel de PAMPs na modulação de células de papila apical é de fundamental importância uma vez que o envolvimento destas moléculas se faz presente tanto na fase de interrupção da rizogênese como também nas paredes dentinárias após desinfecção da cavidade pulpar já que os protocolos de revascularização recomendam que não sejam utilizadas manobras de instrumentação mecânica nestes contextos (5).

## 2.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)

O Sistema Renina Angiotensina é um sistema hormonal fisiológico bem conhecido no controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrolítica do organismo (73).

Os estudos sobre o SRA iniciaram-se no século XIX pelo descobrimento da renina por Tigersted e Bergman em 1898 (74), a qual tornou-se a base de todo um sistema fisiopatológico.

O sistema é composto pelo Angiotensionogênio, uma glicoproteína produzida pelo fígado que circula no plasma como um peptídeo inativo. Este será substrato para a renina, secretada pelo rim. O Angiotensinogênio será clivado pela renina e o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) ($Asp^{1}$-$Arg^{2}$-$Val^{3}$-$Tyr^{4}$-$Ile^{5}$-$His^{6}$-$Pro^{7}$-$Phe^{8}$-$His^{9}$-$Leu^{10}$) será liberado. A enzima conversora de angiotensina (ECA), produzida no pulmão, age sobre a Ang I liberando a Angiotensina II (Ang II) ($Asp^{1}$-$Arg^{2}$-$Val^{3}$-$Tyr^{4}$-$Ile^{5}$- $His^{6}$-$Pro^{7}$-$Phe^{8}$). A Ang II é um dos principais peptídeos efetores do SRA através de dois tipos de receptores, do tipo I (AT1) e do tipo II (AT2) (75).

O Angiotensinogênio humano, uma proteína de 452 aminoácidos, é sintetizado no fígado. Vários hormônios como glicocorticóides, hormônio tireoidiano e a própria Ang II estimulam a síntese de angiotensinogênio (76).

As células justaglomerulares dos rins produzem renina (glicoproteína de 340 aminoácidos) a partir da pró-renina, que é um precursor inativo. A pró-renina é convertida em renina ativa e é liberada na corrente sanguínea em resposta a estímulos sistêmicos e locais (77). O principal estímulo para a liberação da renina é a diminuição da pressão arterial e constitui a chave inicial de regulação da cascata enzimática que irá induzir a produção de Ang II (78).

A Ang I é um peptídeo de 10 aminoácidos ($Asp^{1}$-$Arg^{2}$-$Val^{3}$-$Tyr^{4}$-$Ile^{5}$-$His^{6}$- $Pro^{7}$-$Phe^{8}$-$His^{9}$-$Leu^{10}$) sem capacidade de produzir alterações funcionais mas serve de substrato para a formação de Ang II (75).

A enzima ECA, uma metaloprotease de ligação de membrana, possui 1.278 resíduos de aminoácidos. Esta enzima pode ser encontrada abundantemente ao longo da superfície de células endoteliais pulmonares (79). Pela ação da ECA, há a liberação do último dipeptídeo da Ang I ($His^{9}$- $Leu^{10}$), formando a Ang II, um octapeptídeo ($Asp^{1}$-$Arg^{2}$-$Val^{3}$-$Tyr^{4}$-$Ile^{5}$-$His^{6}$-$Pro^{7}$- $Phe^{8}$) (75).

A Ang II tem efeito de vasocontrição vascular ação de ionotropia e cronotropia positiva no coração (80), além de que tem propriedades proliferativas para células do ligamento periodontal (81), aumento de células da calvária de ratos (82), e produção de prostaglandina em fibroblastos gengivais humanos (83).

As ações biológicas da Ang II ocorrem por meio de sua ligação com AT1 e AT2. Esses receptores pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G. A ativação da proteína G, via receptores AT1, ativa múltiplas cascatas de sinalização que resultam em contração, disfunção endotelial, migração celular, hipertrofia e fibrose (84).

Além disso, quando o receptor AT1 é ligado a Ang II também dispara a ativação do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Esse complexo é conhecido por ser a principal fonte de espécies reativas de oxigênio envolvidas na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios (84, 85). As funções de Ang II, tais como constrição vascular, proliferação celular e liberação da aldosterona são conhecidas por serem mediadas via receptores AT1 (86). Hagiwara et al., 1998 (87) verificaram que a interação de

Ang II nos receptores AT1 poderia alterar o metabolismo de células osteoblásticas em ratos.

A via clássica é responsável pela formação de Angiotensina II e sua ligação com o receptor AT1, resultando em proliferação celular e constrição vascular. No entanto, a ligação da Ang II ao receptor AT2 produz alguns efeitos diferentes e antagônicos que os observados para o AT1.

A Ang II foi descrita como a principal efetora do SRA por muito tempo (75). No entanto, o heptapeptídeo Angiotensina (1-7) tem revelado uma função de importância no SRA (88)(89). A Ang (1-7) pode ser formada a partir da Ang II, pela ação da ECA-2, sendo esta a sua principal via de formação (90). Santos et al., 1988 (91) relataram que Ang (1-7) pode ainda ser formada endopeptidases neutras, que é uma via não dependente da ECA. Sendo assim, achados da literatura aumentaram a complexidade do SRA. Diferentes receptores para Ang II (AT1, AT2 e AT4) e para Ang (1-7) (MAS), além de um receptor de Pró-renina (92) foram caracterizados. Entretanto, acredita-se que outros componentes e funções do SRA ainda permaneçam desconhecidos (73).

Ang (1-7) possui propriedades antiproliferativas, anti-angiogênica e anti-fibrótica, estimula a apoptose e regula o fluxo iônico (93). Portanto, Angiotensina 1-7 tem alguns efeitos opostos àqueles observados para AT1, como: vasodilatação, inibição da proliferação e crescimento celular (94).

### 2.4.1 Evidências de um Sistema Renina Angiotensina Bucal

A visão do SRA, na qual o sistema seria essencialmente dependente da existência do hormônio circulante para produzir seus efeitos fisiológicos tem sido profundamente modificada nos últimos anos. O SRA atualmente é visto de forma mais ampla, na qual a multiplicidade de funções do sistema é produto também da ação “parácrina” e “autócrina” dos produtos desse sistema produzidos localmente em vários tecidos (95).

Com as técnicas atuais de biologia molecular foi possível detectar componentes do SRA (angiotensinogênio, renina, enzima conversora e receptores de Ang II) localmente em vários tecidos como glândulas adrenais, rins, coração,

vasos e cérebro (96). É de potencial relevância terapêutica considerar que esse sistema é localmente sintetizado em diversos tecidos do organismo.

Ohuchi et al., 2002 (97) verificaram que Ang II é produzida por fibloblastos gengivais de cobaia e os animais que utilizaram fármacos antagonistas de receptores de Ang II aumentaram a proliferação de fibroblastos gengivais. Os autores sugeriram que a proliferação aumentou mediada indiretamente por receptores AT1.

Segawa et al., 2003 (83) investigaram o efeito da Ang II sobre a produção de prostaglandina em fibroblastos gengivais humanos. Um antagonista de receptores AT1 foi capaz de inibir a produção da prostagladina estimulada pela Ang II.

Berggreen et al., 2003 (98) confirmaram a existência de receptores AT1 na polpa dentária e no tecido gengival de furão e estudaram o efeito da Ang II sobre o fluxo sanguíneo em tecidos orais destes animais. O estudo chegou a conclusão que a Ang II tem um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo pulpar.

Os receptores AT1 e AT2 foram encontrados na polpa dental por Souza et al., 2007 (99), sugerindo sua moderação na pulpite pelo envolvimento tanto no estabelecimento como na modulação das alterações pulpares. Os autores expuseram polpas de ratos e depois de diferentes períodos os dentes foram submetidos a análise histológica e por RT- qPCR. As análises histológicas mostraram vasos sanguíneos com a presença de células inflamatórias. A avaliação semi-quantitativa do RT- qPCR demostrou que o AT1 estava super regulado nas primeiras 12 horas e diminuiu sua expressão após 24 horas. No entanto, o AT2 teve sua expressão maior após 9 horas e em tempos de 12 e 24 horas diminuiu sua expressão.

Ohuchi et al., 2004 (100) demonstraram a presença dos receptores AT1 e AT2 em fibroblastos gengivais de coelhos com auxílio da técnica de Western blot. Também constataram que a Ang II aumentou a proliferação dos fibroblastos de acordo com o aumento da concentração. Esta proliferação foi inibida por um antagonista de receptores AT1, porém não teve alteração quando foi utilizada um antagonista de receptores AT2, sugerindo, portanto, que a proliferação de fibroblastos gengivais de coelho induzida pela Ang II nestas células em cultura acontece via receptores AT1.

Queiroz-Junior et al., 2015 (101) observaram que a perda do osso alveolar induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi prevenida e tratada por um antagonista do receptor de AT1 em tecido periodontal de camundongos.

Estudos demonstraram a existência de um SRA local no tecido gengival de ratos. Foi demonstrada a expressão de RNAm para componentes do SRA incluindo Angiotensinogênio, Renina, Receptores AT1a, AT1b e AT2 e ECA, sendo que estes mostraram-se funcionais e capazes de gerar peptídeos de Angiotensina, incluindo a Ang II (102). Um trabalho em tecido gengival humano, Nakamura et al., 2011 (103) demonstraram por meio de PCR convencional e de Western Blot, a presença do RNAm e da proteína do receptor AT1, em fibroblastos cultivados de gengiva humana. Foi possível também observar a expressão do RNAm para ECA e Angiotensinogênio nestas mesmas células.

Santos et al., 2015 (104) demonstraram que fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humano, gengiva humana e de rato expressam componentes do SRA, confirmando a hipótese da presença de um SRA local e funcional no periodonto humano e de rato. Foi também observado que a inibição da renina através de Alisquireno e um antagonista de AT1 (Losartan) diminuiu significativamente a perda óssea alveolar da periodontite experimentalmente induzida em ratos. Entretanto, quando os ratos foram tratados com Enalapril (inibidor de ECA) a perda óssea não foi prevenida sugerindo que vias alternativas no SRA poderiam modular este processo. Concluiu-se então com o estudo que o bloqueio de AT1 e renina pode prevenir significativamente a perda óssea periodontal induzida em ratos.

Desse modo, tem sido sugerido que alterações nos componentes do Sistema Renina Angiotensina teciduais específicos podem estar associadas à fisiologia ou patofisiologia dos respectivos tecidos e órgãos onde são encontrados, possibilitando que interferências nestes SRA locais possam ser benéficas (105).

### 2.4.2 Interação entre Inflamação e Angiotensina II

A instalação de um processo inflamatório implica na liberação de diversos mediadores químicos. Dentre estes, podemos destacar a Angiotensina II que

potencialmente poderia se comportar como modulador da biologia das células-tronco da papila apical.

A inflamação é um processo que ocorre nos tecidos em resposta a estímulos patológicos e geralmente leva à recuperação da integridade tecidual, mas se o reparo não é totalmente controlado, o processo inflamatório pode resultar em dano tecidual (106). Independente da fonte do estímulo primário e do tecido compreendido, a inflamação geralmente segue três estágios: aumento na permeabilidade vascular; recrutamento de células leucocitárias (rolamento/adesão/transmigração e quimiotaxia) e ativação dos processos para reparação tecidual. A Ang II está envolvida em nestes três estágios da resposta inflamatória (106, 107).

A Ang II, o principal peptídeo ativo do SRA, além de ser um mediador fisiológico do sistema circulatório, é reconhecida por regular o crescimento celular e fibrose. Um grande número de estudos demonstrou que a Ang II está envolvida em eventos-chave da inflamação. Nesse processo, as células inflamatórias são equipadas com todos os componentes do Sistema Renina Angiotensina (SRA), podendo produzir angiotensina (Ang II) (108).

A Ang II provoca suas respostas inflamatórias devido a suas ligações com os receptores AT1, desencadeando assim a cascata em que ocorrerá a sinalização intracelular que por consequência irá regular vários genes considerados pró-inflamatórios (107).

O trabalho de Gabriele et al., 2017 (109) verificou diminuição das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 induzidas por IL-1β em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal de ratos quando o receptor AT1 foi silenciado. Em macrófagos e células muscular da parede vascular, a Ang II aumentou a expressão de IL-8 e CCL-2 (110). Também em células vasculares do músculo liso, a Ang II estimulou de maneira tempo e concentração dependente, a produção de IL-6 e IL-8 via receptor AT1 (111). Outro estudo constatou que um bloqueador de Ang diminuiu a expressão de MCP-1/ CCL-2 em lesões ateroscleróticas de ratos (112) e por fim, o tratamento com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina atenuou a expressão vascular de MCP-1 e IL-8 em lesões ateroscleróticas (113).

Um estudo feito por de Cavanagh et al., 2010 (114), em ratos, concluiu que a inibição do Sistema Renina Angiotensina com bloqueadores de AT1 e com inibidores da ECA, além de diminuir a proliferação celular, reduziram o estresse oxidativo pela

prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio derivadas da ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase induzida pela Angiotensina II.

Múltiplos relatos em modelos de ratos mostraram que o bloqueio da sinalização de Angiotensina II via receptor AT1 aumentou efetivamente a massa óssea sob condições fisiológicas e em um modelo de osteoporose induzida (115-117). Santos et al., 2015 (118) também observaram que o tratamento com Losartan (inibidor de Ang II) atenuou a reabsorção óssea (análise da perda óssea) induzida experimentalmente em ratos sugerindo o envolvimento de Ang II através do receptor AT1 na ativação da osteoclastogênese.

Chen et al., 2015 (119) demonstraram em ratos que Losartan pode aumentar a massa óssea *in vivo* e suprimir diretamente a osteoclastogênese *in vitro*, acompanhado pela diminuição da fosforilação de ERK mediada por RANKL em osteoclastos. Outro estudo descobriu que a inibição da sinalização de Ang II via AT1 *in vivo* atenuou a diferenciação de monócitos, as células precursoras de osteoclastos (120). Em uma linhagem de células de ratos, o bloqueio de AT1 reduziu a osteoclastogênese indiretamente, aumentando a taxa de RANKL /OPG em osteoblastos (115). Em camundongos, Losartan diminuiu marcadores de osteoclastos, como RANK, RANK- L enquanto a osteoprotegerina (OPG), um inibidor da reabsorção óssea, foi aumentada (121). Olmesartan, outro antagonista do receptor AT1, reduziu o processo inflamatório e a perda óssea em ratos (122).

Nakai et al., 2015 (123) avaliaram uma linhagem de células de osteosarcoma de ratos e o estímulo com Ang II diminuiu a mineralização celular. Um estudo com osteoblastos de calvária de ratos também relatou que Ang II suprimiu a formação de nódulos mineralizados em 14 dias (87).

Somando-se as informações de que a Ang II está presente em todas as fases da inflamação (106), que a Ang II tem efeitos pró-inflamatórios e proliferativos, que a inibição do SRA diminui o estresse oxidativo (114), além dos múltiplos relatos que bloqueio de Angiotensina via receptor AT1 aumentou efetivamente a massa óssea, sugere-se que a inibição do SRA diminua os danos da lesão periapical durante sua progressão.

Como pode ser observado a partir do exposto, a literatura traz evidências do potencial de mediadores inflamatórios como angiotensina II em modular células indiferenciadas de sítios distintos, de forma que possam resultar em importantes

alterações em seu fenótipo e função. Este efeito, porém, parece variar de forma significativa entre células mesenquimais de diferentes tecidos (124, 125). Este conhecimento é essencial para que se saiba em que condições se encontram os remanescentes da papila apical no momento da intervenção clínica e sua relação com o sucesso das terapias regenerativas atualmente propostas. Todavia, estes eventos ainda não foram explorados no contexto da etiopatogenia da interrupção da rizogênese em dentes imaturos com comprometimento pulpar nem tampouco no contexto de mecanismos envolvidos com a diferenciação celular nos eventos derivados de revascularização. Trata-se de um conhecimento essencial para o progresso dos procedimentos clínicos regenerativos empregados pela Endodontia atual.

# 3 PROPOSIÇÃO

Considera- se que lipídeos bioativos e AngII, liberados a partir da ativação celular por mecanismos de imunidade inata (126) têm potencial para modular de maneiras distintas o fenótipo e a função de células indiferenciadas (30). Apesar dos avanços científicos acerca do conhecimento da biologia celular e do crescente interesse da Endodontia contemporânea em desenvolver tratamentos mais eficazes para quadros de dentes com rizogênese incompleta, ainda não é conhecido o papel de mediadores inflamatórios nos mecanismos relacionados às alterações moleculares que afetam as células da papila apical e que podem estar envolvidos com a etiopatogenia da interrupção da rizogênese em dentes com comprometimento pulpar. A compreensão destas alterações poderá resultar futuramente em abordagens clínicas com enfoque específico e direcionado à reversão das alterações apresentadas por estas células. Sendo assim, este estudo tem como objetivo elucidar os mecanismos moleculares envolvidos com as alterações que sofrem as células de papila apical em um microambiente pró-inflamatório investigando *in vitro* o perfil de produção de AngII e seu receptor AT1 por células de papila apical desafiadas por LPS bacteriano e o papel da Ang II na modulação desta população celular estudada.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (Parecer nº 1.946.955, CAAE: 64233617.1.0000.0075, Anexo A).

A execução dos experimentos *in vitro* foi dividida em quatro fases. Na primeira, as células da papila apical foram obtidas, isoladas e caracterizadas. Na segunda, foi elucidado o papel de lipopolissacarídeo (LPS) sobre as CPA. Na terceira etapa foi realizada a detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) nas células da papila apical. Por fim, na quarta fase foram realizados ensaios funcionais para avaliar o papel da Ang II nas CPA. A descrição detalhada é apresentada a seguir.

## 4.1 PRIMEIRA FASE

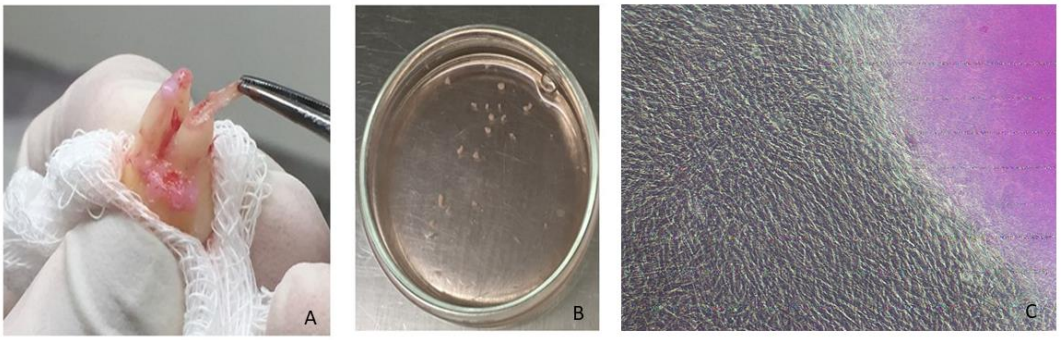
### 4.1.1 Obtenção das células da papila apical

Papilas apicais foram obtidas a partir de terceiros molares hígidos com rizogênese incompleta. Três elementos dentais foram obtidos de três pacientes diferentes, saudáveis e sem condições sistêmicas relatadas. Todas os dentes foram extraídos por indicação de exodontia

Os dentes foram lavados, a papila apical foi gentilmente destacada da raiz dentária com auxílio de pinça e lâmina de bisturi e foi fragmentada em porções menores que 1mm e então dispostas em placas do tipo Petri (Corning Inc., NY, EUA). As culturas foram estabelecidas a partir de explantes. Os fragmentos de tecido foram cultivados com $\alpha$-*Modified Eagle Medium* (α-MEM) (Gibco/Life Technologies, NY, EUA) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), 100 µM de L-ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100U/mL de penicilina (Invitrogen), 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen). Essa composição de meio de cultura foi nomeada Meio de Proliferação (MP).

Os fragmentos, ou explantes, foram então mantidos em cultivo, incubados em estufas a 37ºC em atmosfera com 5% de $CO_2$, para que células começassem a migrar dos explantes para o fundo das placas (Figura 1). As células no estudo foram utilizadas até a quinta passagem.

Figura 4.1 - Células de papila apical (CPA) obtidas a partir de cultura primária com explantes. Papila apical sendo removida da raiz dentária (A) Papila fragmentada na Placa de Petri (B) Células migrando do explante: imagem capturada em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X (C).




### 4.1.2 Caracterização fenotípica das células da papila apical

A caracterização do fenótipo de CPA foi feita por meio de imunomarcação e detecção por citometria de fluxo. Suspensões celulares foram obtidas por descolamento das células com solução enzimática não mamífera (Accutase, Gibco). Após lavagem com PBS + SBF, as células foram incubadas por 30 min com o tampão de bloqueio PBS e SBF 0,01%. Em seguida, suspensões de 1 x $10^5$ células foram incubadas por uma hora a 4ºC com anticorpos conjugados a fluoróforos a uma concentração de 10 µg/mL. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de solução de paraformoldeído a 4% por 10 min. A expressão dos antígenos de superfície foi avaliada por Citometria de Fluxo utilizando-se de um equipamento FACScalibur (Becton, Dickinson and Co., San Jose, EUA) no Departamento de Imunologia d/o Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Para as marcações, foram utilizados anticorpos anti-CD146 conjugado a ficoeritina (PE) (Cat. FAB932P – R&D Systems), anti-CD24 conjugado a aloficocianina (APC) (Cat. FAB5247A – R&D Systems) e anti-STRO-1 (MAB1038-SP sendo este seguido de anticorpo secundário Goat anti-Mouse-IgM conjugado a PE – F0116 – R&D Systems). Também foi realizada marcação para CD45 (Cat. FAB1430P) e CD34 (Cat. FAB7227P, R&D Systems) sendo que para estes antígenos esperava-se marcação inferior a 2%. Como isotipos controles foram usados Mouse IgG1-PE (Cat. IC002P – R&D Systems) correspondente a CD146, CD45 e CD34 e Mouse IgG2A-APC (Cat. IC003A – R&D Systems), correspondente a CD24 (Sonoyama *et al.* 2008; Bakopoulou *et al.* 2013).

### 4.1.3 Caracterização funcional: diferenciação celular

A capacidade de diferenciação osteo/odontogênica das CPA foi investigada *in vitro* conforme estudos prévios da literatura (15, 16).

A formação de nódulos mineralizados foi detectada utilizando o ensaio de Vermelho de Alizarina S a 2% (pH 4,2) (Sigma-Aldrich).

As células foram semeadas em placas de 24-poços ($5x10^4$ células/poço). CPA foram mantidas em Meio de Proliferação (MP) ou Meio de Diferenciação (MD). O meio que foi denominado MD foi o MP acrescido de 10 nmol/L de dexametasona (Invitrogen), 10 mmol/L de fosfato monopotássico ($KH_2PO_4$) e 10 nmol/L de 1,25 dihidroxivitamina $D_3$ (Sigma-Aldrich) (16).

Após o período de indução de 14 dias, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas com formoldeído a 10%, reidratadas em água destilada e coradas com vermelho de alizarina, por 5 min. As culturas foram então lavadas várias vezes em PBS e deixadas secar. Os poços foram fotografados utilizando microscopia de fase. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Biotek) utilizando o filtro de 490 nm.

## 4.2 SEGUNDA FASE

### 4.2.1 Viabilidade celular – estímulo com LPS

A fim de avaliar o efeito do LPS sobre a viabilidade das SCAPs, a citotoxicidade do estímulo frente a células em MP ou MD foi avaliada por meio de ensaio empregando brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Molecular Probes, Life Technologies), conforme descrito por estudos prévios de nosso grupo (127). Tal método se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de MTT em formazan. Consistindo o MTT a avaliação da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a quantidade de produto é detectada pela leitura da absorbância.

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 8 x $10^3$ células por poço. O estímulo com LPS (Ultrapure *Escherichia coli* LPS, Cat. LPS-EB, Invivogen, San Diego, EUA) foi realizado nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/mL em triplicata. Como controle, foi utilizado o respectivo meio de cultura somente MP (Meio de Proliferação) ou MD (Meio de Diferenciação). As células foram analisadas por 1, 3, 5, 7 e 14 dias, sendo que para os dois últimos foram realizadas trocas de meio a cada 48 h.

Após os períodos de incubação, foi adicionado em cada poço 20 µL de uma solução de MTT (5mg/mL em PBS) diluídos em 180 µL de meio de cultura. As placas foram incubadas a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de $CO_2$ e protegidas da luz por quatro horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e imediatamente foram adicionados 200 µL de DMSO em cada poço, para dissolver os cristais de formazan formados após redução do sal de MTT. A leitura da absorbância foi feita em espetrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA) no comprimento de onda 570nm.

### 4.2.2 Detecção de produção in vitro de citocinas inflamatória – estímulo com LPS

Após o estímulo das SCAPs por uma e 24 horas pelas diferentes concentrações de LPS (0,1; 1 e 10 µg/mL) em meio de proliferação, o sobrenadante celular foi coletado e armazenado a -20ºC. As concentrações das citocinas MCP-1/ CCL2, IL-1β e OPG produzidos pelas células foram obtidas por ensaio ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Placas de 96 poços (Corning Incorporated, EUA) foram recobertas com anticorpos monoclonais humanos (anticorpos de captura) - para cada alvo por 15 a 18 horas a temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram submetidas ao primeiro ciclo de três lavagens sucessivas com PBS 1% contendo 0,5% de Tween 20. Posteriormente, foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com 100 µL por poço da solução de bloqueio composta por PBS 1% e albumina sérica bovina 1% (BSA). Um novo ciclo de lavagens foi realizado e imediatamente após as amostras do sobrenadante celular e concentrações crescentes conhecidas da proteína recombinante de cada alvo foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. O terceiro ciclo de lavagens foi realizado e então as placas foram incubadas com o anticorpo biotinilado por 2 horas. Novamente as placas foram lavadas e incubadas com uma solução de PBS 1% e estreptavidina (R&D Systems, Minnesota, EUA) na proporção 1:200 ou 1:40 por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens as placas foram incubadas com tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) por 30 minutos. A reação colorimétrica resultante da adição do substrato foi parada pela adição de ácido sulfúrico 2N, e as placas foram lidas utilizando o comprimento de onda 450nm e 570nm. A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro (Synergy/H1, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). As concentrações de citocinas foram determinadas por interpolação de uma curva padrão e foram apresentadas como pg/mL para amostras em cada uma das condições testadas.

## 4.3 TERCEIRA FASE

Elegeu-se a concentração de estímulo de LPS a 1µg/mL por verificar nessa concentração um aumento da expressão de CCL-2 nas células da papila apical no presente estudo, sendo que aumento da expressão dessa quimiocina tem sido associado ao maior recrutamento de células de defesa para sítios inflamatórios, principalmente monócitos (53).

### 4.3.1 Detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) nas CPA

A expressão de RNAm das células da papila apical para os componentes do SRA foi avaliada por transcrição reversa seguida de RT-qPCR. Foram avaliadas as expressões de e Angiotensinogênio, da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), Renina, Receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1), Receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT2) e Receptor MAS.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços ($2X10^5$ células por poço) com meio de proliferação. As células foram então submetidas ao estímulo com LPS (Invitrogen) na concentração de 1 µg/mL e avaliadas 1, 3, 5 e 24 horas após. Ao grupo controle foi adicionado apenas meio de proliferação.

Extração de RNA*:* Após o período de incubação, foi feita a remoção do meio de cultura e as células foram lisadas com Trizol® (Invitrogen). Esse procedimento foi realizado pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio conforme descrito na literatura (128). Após adição de um volume de 20% de clorofórmio (Merck), os tubos foram agitados e centrifugados a 13000*g* por 15 min a 4ºC. A fase aquosa foi recuperada em alíquotas de 300 µL que foram colocadas em tubos de microcentrífuga contendo 600 µL de isopropanol (Merck). Após agitação, o RNA foi precipitado por centrifugação a 13.000 *g* por 10 min a 4ºC e lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 70% [em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%], agitando-se vigorosamente. Após secagem, o RNA total foi reconstituído em 10 µL de água tratada com DEPC 0,1%.

Quantificação do RNA: A quantificação do RNA total deu-se pela leitura de 1 µL das amostras. As leituras foram realizadas em comprimento de onda entre 260 e 280 nm e a concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/µL. Para eliminar a possível contaminação do RNA total por DNA genômico, procedeu-se o tratamento de todas as amostras com DNAse (Sigma-Aldrich).

Transcrição reversa*:* Após quantificação, o RNA foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada por meio de High Capacity cDNA reverse transcription kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com as orientações do fabricante.

*qPCR:* A análise quantitativa da expressão dos genes abaixo listados foi feita por meio do sistema TaqMan® (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Primers e sondas inventoriados para Angiotensinogênio, Renina, ECA, ECA-2, Receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) e Receptor MAS foram utilizados juntamente com TaqMan® Mastermix II. A expressão dos genes alvo foi normalizada com base na expressão de GAPDH (Hs02758991_g1) como controle endógeno. Foram utilizados 1 µL de cDNA de cada amostra juntamente com reagentes Taqman Gene Expression Mastermix® (Thermo Scientific), primers e sondas com um volume final de reação de 10 µL. A termociclagem compreendeu 2 min a 50ºC, 10 minutos a 95ºC, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95ºC e 1 minuto a 60ºC. Os resultados foram analisados com base no valor de $C_T$ (cicle threshold – ou ciclo limiar), determinado com base em controle negativo (sem amostra). As médias dos valores de $C_T$ de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização ao controle endógeno (GAPDH), e então comparados com o controle alvo-interno (grupo de células controle não estimuladas) para o cálculo da quantificação relativa, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os ensaios de RT-qPCR foram feitos no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Clínica da Faculdade de Odontologia da USP de Bauru (FOB-USP).

### 4.3.2 Detecção de produção in vitro de Angiotensina II

Após o estímulo das CPAs por 1, 3, 12 e 24 horas por LPS 1µg/mL em meio de proliferação, o sobrenadante celular foi coletado e utilizado fresco. O grupo controle consistiu nas CPAs apenas meio de proliferação. A concentração de Angiotensina II produzida pelas células foi obtida por ensaio ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) – descrito anteriormente no item 4.2.2.

## 4.4 QUARTA FASE

### 4.4.1 Papel da Angiotensina II nas CPA in vitro

Considerando que as ações do SRA são mediadas principalmente pela Angiontensina II, e tendo sido detectada a expressão gênica de AT1 (Receptor de Angiotensina II tipo 1) e da proteína Ang II nas células da papila apical, foram então realizados ensaios funcionais para avaliar o papel do peptídeo nas CPA *in vitro.*

As células foram estimuladas com Ang II (Tocris, Bioscience, Bristol, UK) a 1µg /mL e para o bloqueio farmacológico, foi utilizado o fármaco EMD 66684 (Tocris, Bioscience, Bristol, UK) antagonista de AT1. As concentrações utilizadas foram de acordo com o trabalho de Bond et al., 2011 (129). Em todos os ensaios de bloqueio farmacológico, as células foram tratadas com o inibidor 30 minutos antes da colocação dos estímulos. As trocas de meio no intervalo foram feitas a cada 48 horas com pré-tratamento sempre 30 min antes do meio contendo LPS ou Ang II ser adicionado.

#### *4.4.1.1 Viabilidade celular*

A fim de se analisar o efeito da Angiotensina II sobre a viabilidade das células da papila apical, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio), descrito anteriormente no item 4.2.1, que avalia a taxa metabólica celular.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 8 x $10^3$ células por poço, e após foram estimuladas com meio de proliferação (controle),

meio de proliferação acrescido de LPS na concentração de 1 µg /mL, meio de proliferação com Angiotensina II (Tocris) a 1 µg /mL; meio de proliferação com o inibidor EMD 66684 (Tocris) a 10 µg /mL – para bloqueio de AT1 (Bond et al., 2011) e por último, meio de proliferação acrescido do inibidor (10 µg /mL) e LPS a 1 µg/mL. A citotoxidade dos estímulos foi analisada após 24, 48 e 72 horas.

*4.4.1.2 Detecção de produção in vitro de citocinas inflamatórias*

Células foram plaqueadas em placas de 24 poços ($2x10^4$ célula/poço). O estímulo nas células da papila apical foram feitos com meio de proliferação (controle), meio de prolifereção acrescido de LPS na concentração de 1 µg /mL, meio de prolifereção com Angiotensina II (Tocris) a 1 µg /mL, meio de prolifereção com o inibidor EMD 66684 (Tocris) a 10 µg /mL– para bloqueio de AT1 e por último, meio de proliferação acrescido do inibidor (10 µg /mL) e LPS a 1 µg/mL. Após 24 horas, o sobrenadante celular foi coletado e armazenado a -80ºC. As concentrações de CCL-2, OPG, IL-6, RANK, IL-1B e MSC-F produzidos pelas células foram obtidas por ensaio ELISA – descrito anteriormente no item 4.2.2.

*4.4.1.3 Diferenciação celular de CPA*

A diferenciação celular foi avaliada por meio da análise de deposição de cálcio, coloração com Vermelho de Alizarina S (descrito anteriormente na primeira fase no item 4.1.3) com o período de indução de 14 dias.

As células da papila apical foram cultivadas em placas de 48 poços na concentração de 8 x $10^3$ células por poço, e após foram estimuladas com meio de proliferação (controle), meio de diferenciação, meio de diferenciação acrescido de LPS na concentração de 1 µg /mL, meio de diferenciação com Angiotensina II (Tocris) a 1 µg /mL, meio de diferenciação com o inibidor EMD 66684 (Tocris) a 10 µg /mL– para bloqueio de AT1 e por último, meio de diferenciação acrescido do inibidor (10 µg /mL) e LPS a 1 µg/mL. O estímulo sempre foi feito em triplicata.

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata. Verificada a distribuição normal das amostras, a análise estatística foi feita por meio de ANOVA seguida de pós-teste de Tukey ou teste t de Student. Os níveis de significância foram determinados com $p<0,05$.

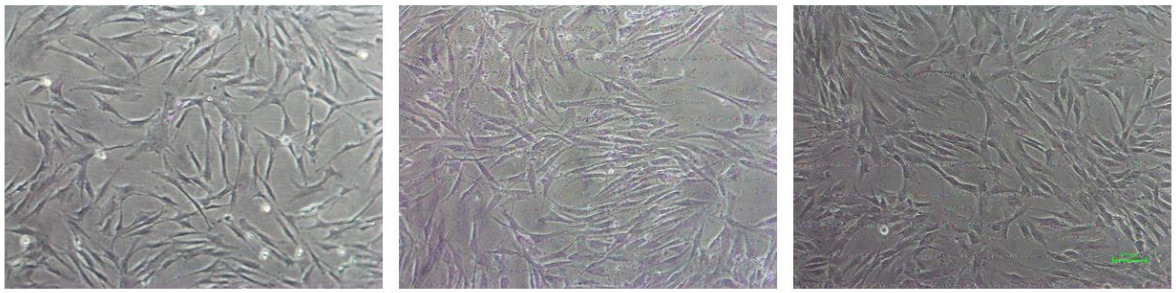
# 5 RESULTADOS

## 5.1 PRIMEIRA FASE

### 5.1.2 Obtenção das células da papila apical

A técnica para a realização de cultura primária de células da papila apical a partir de explantes se mostrou passível de reprodução durante a execução do trabalho. A Figura 5.1 ilustra culturas de células da papila apical realizadas durante o estudo.

Figura 5.1 - Células de papila apical (CPA) obtidas a partir de cultura primária com explants. Imagens capturadas em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X.



### 5.1.3 Caracterização fenotípica das células da papila apical

As células isoladas da papila apical expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstraram positividade para marcadores de superfície de células-tronco, tais como CD146, CD44 e STRO-1. As células também apresentaram mínima expressão de marcadores de células hematopoiéticas (CD45) ou endoteliais (CD34). A representação em *dot-plot* da imunomarcação está demonstrada na figura 5.2.

Figura 5.2 - Representação em *dot plot* da imunomarcação para CD146, CD24, CD34, CD45 e STRO-1 por citometria de fluxo.

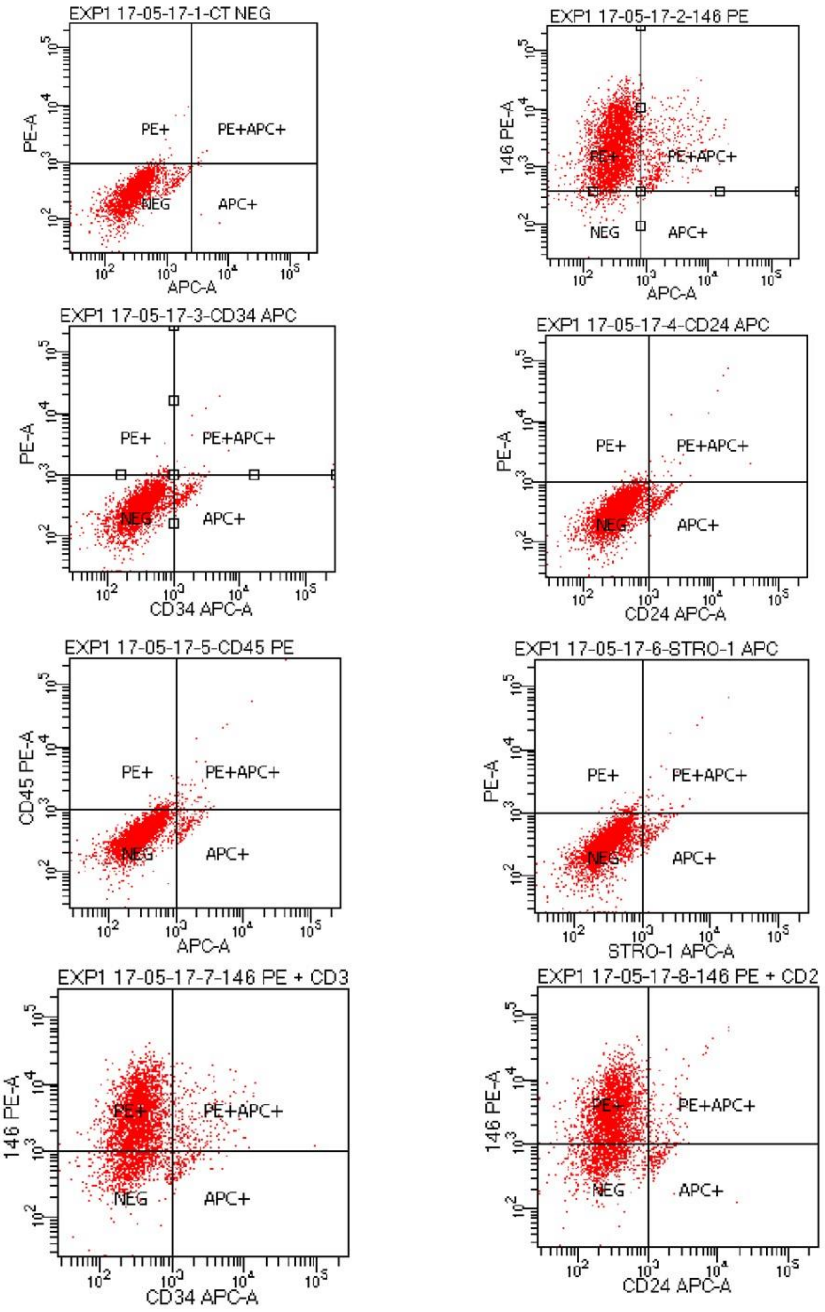


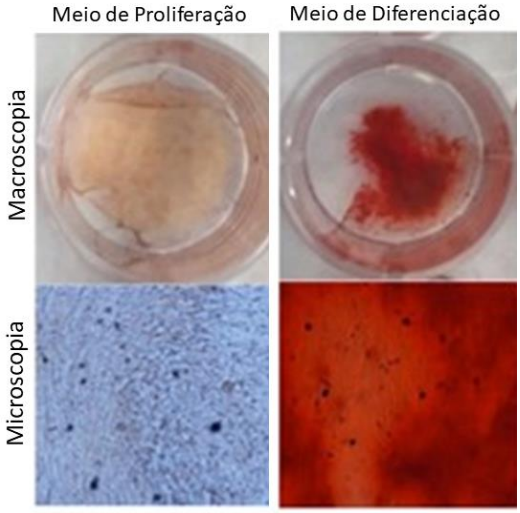

Tabela 5.1 - Porcentagem de marcadores de células indiferenciadas nas CPA obtidas para o estudo.

| MARCADORES | PORCENTAGEM |
|---|---|
| Controle negativo | 0,2% |
| CD 146 | 85,5% |
| CD 34 | 5,6% |
| CD 24 | 5,5% |
| CD 45 | 1,8% |
| STRO-1 | 5% |
| CD 146 + CD 34 | CD 146= 66,9% CD 34= 2,9% |
| CD 146 + CD 24 | CD 146= 67,8% CD 24= 3,3% |

### 5.1.3 Caracterização funcional: diferenciação celular

A formação de nódulos mineralizados foi detectada utilizando o ensaio de Vermelho de Alizarina. Após 14 dias de cultura houve mineralização celular nas células com Meio de Diferenciação (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Indução de diferenciação osteo/odontoblástica em células de papila apical. CPA foram mantidas em Meio de Proliferação (MP) ou meio de diferenciação (MD). Deposição de cálcio detectada por meio de ensaio de Alizarina S após 14 dias de cultivo, imagens macro (painel superior) e microscópicas (painel inferior).




## 5.2 SEGUNDA FASE

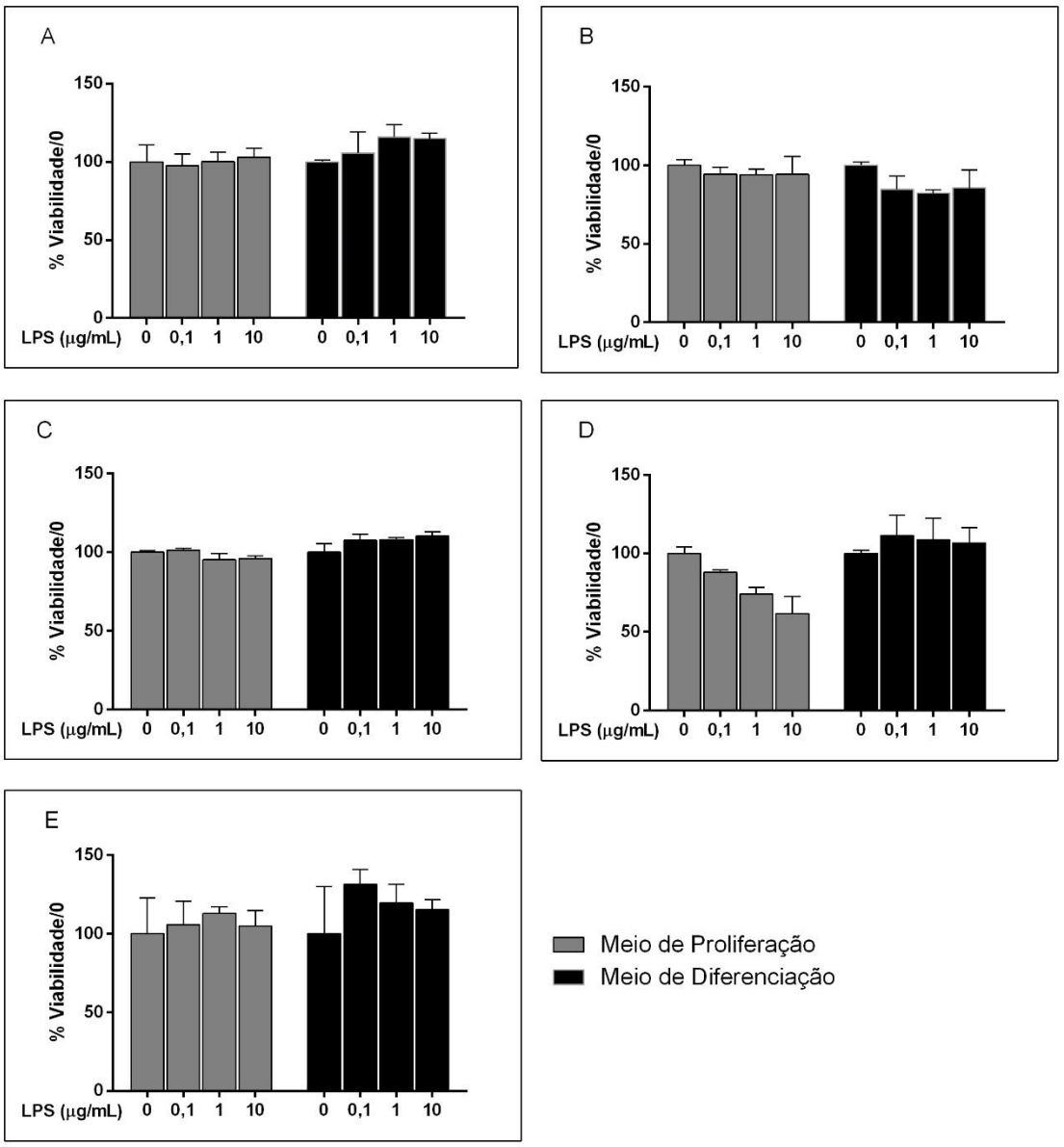
### 5.2.1 Viabilidade celular – estímulo com LPS

Para avaliar o efeito do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a viabilidade das CPAs, a citotoxicidade do estímulo frente a células em MP ou MD foi avaliada por

meio de ensaio empregando brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Molecular Probes, Life Technologies).

O estímulo com LPS nas diferentes concentrações tanto em meio de proliferação (controle) como diferenciação e no decorrer dos dias não afetou a viabilidade das CPA (Figura 5.4)

Figura – 5.4 - Viabilidade de CPA frente ao estímulo com LPS. Células foram mantidas em meio de proliferação ou diferenciação na presença de LPS nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/mL indicadas por 1 (A), 3 (B), 5 (C), 7 (D) e 14 (E) dias. A viabilidade e/ou proliferação foi detectada indiretamente por meio do emprego de MTT. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios.



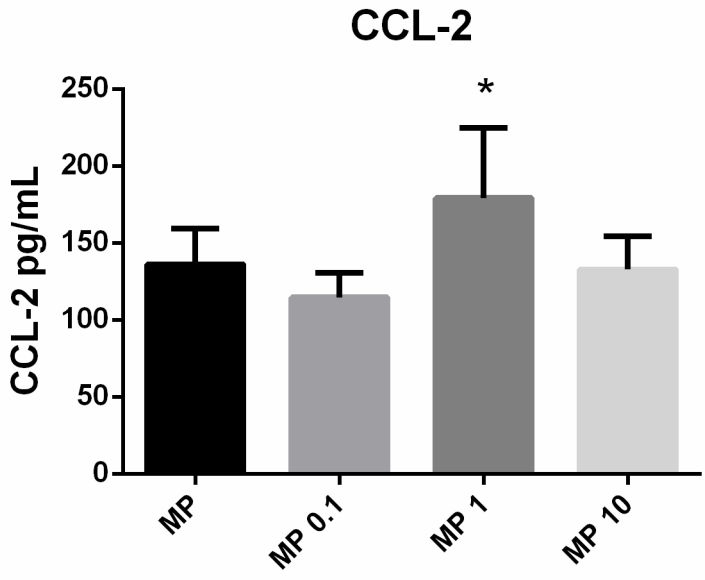
### 5.2.3. Detecção de produção in vitro de citocinas inflamatórias – estímulo com LPS

A citocina IL-1 β não foi produzida em 1 e 24 horas no sobrenadante das CPAs.

No entanto, MCP-1/ CCL-2 em uma hora foi produzido e a produção foi significativamente maior com o meio de proliferação a 1µg/mL quando comparado a 0,1 µg/mL de LPS (Figura 5.5). Em 24 horas, a concentração de 1µg/mL e 10µg/mL de LPS foi significativamente maior em relação ao meio de proliferação (Figura 5.6).

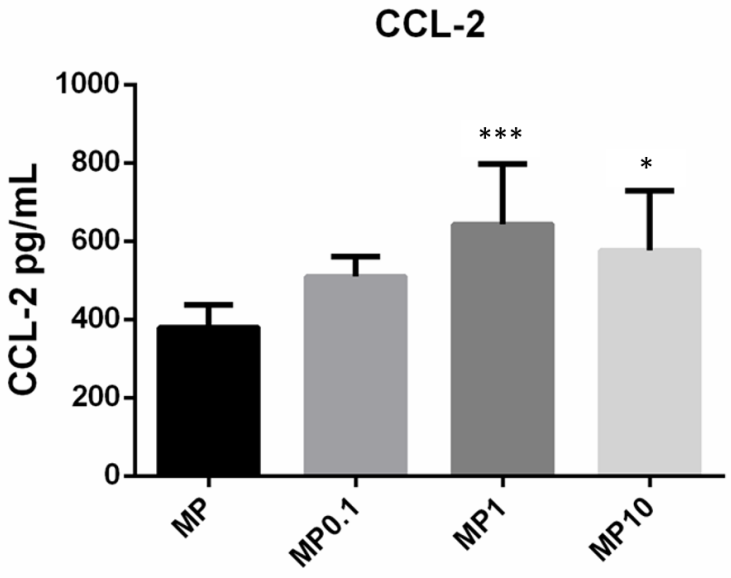
A Osteoprotegerina (OPG) foi produzida pelas CPAs no período de uma hora, porém sem diferença estatística entre as concentrações de LPS (Figura 5.7). Já em 24 horas houve significativamente maior expressão de OPG no meio de proliferação (controle) quando comparado com o estimulado com 0,1 e 10µg/mL de LPS (Figura 5.8).

Figura 5.5 - Produção de CCL-2(pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em uma hora.




*p< 0,05 em relação a MP0.1

Figura 5.6 - Produção de CCL-2(pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em 24 horas.




*p< 0,05 em relação a MP
***p<0,001 em relação ao MP

Figura 5.7 - Produção de OPG(pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em uma hora.

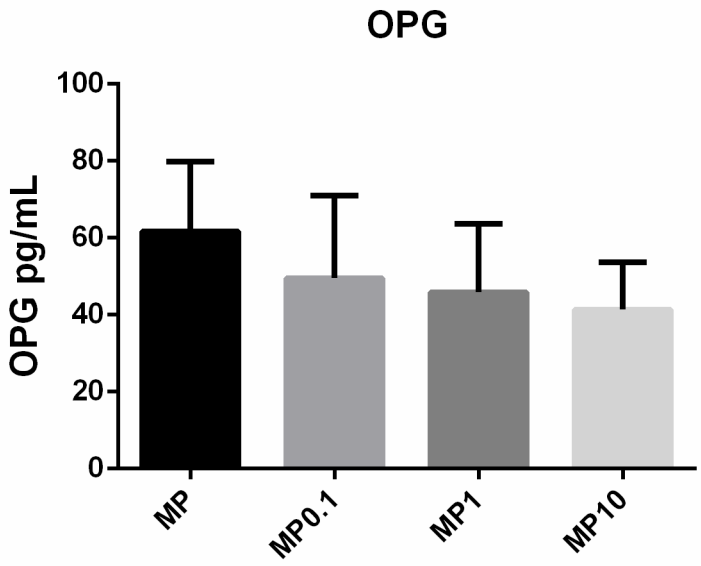
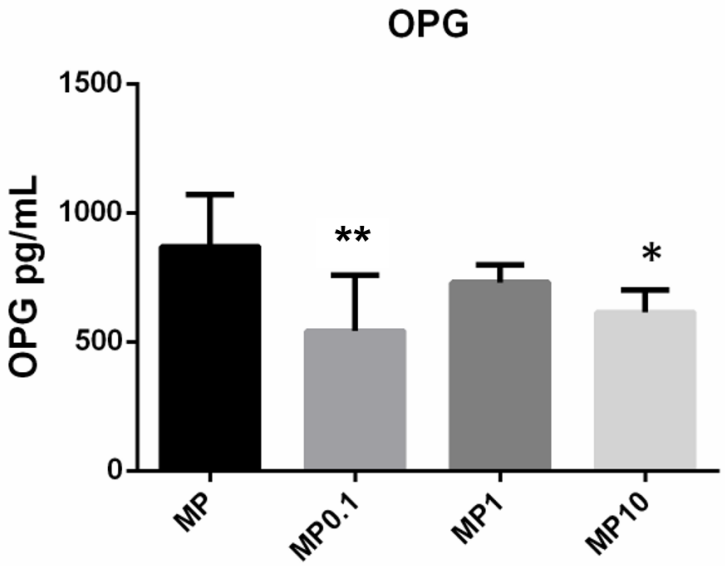


Figura 5.8 - Produção de OPG(pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL l) em 24 horas.




*p< 0,05 em relação a MP
**p< 0,01 em relação a MP

## 5.3 TERCEIRA FASE

Elegeu-se a concentração de estímulo de LPS a 1µg/mL por verificar nessa concentração um aumento da expressão de CCL-2 nas células da papila apical no presente estudo, sendo que aumento da expressão dessa quimiocina tem sido associado ao maior recrutamento de células de defesa para sítios inflamatórios, principalmente monócitos (53). Esta concentração em outros estudos também foi capaz de induzir resposta biológica em células mesenquimais indiferenciadas incluindo CPAs (130-132). Logo, a concentração de 1µg/mL foi utilizada para os ensaios da terceira e quarta fase da pesquisa.

### 5.3.1 Detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

A expressão de RNAm das células da papila apical com estímulo de LPS para os componentes do SRA foi avaliada por reação em cadeia da polimerase quantitativa (*qPCR).*

Em 1, 3 e 5 horas foram expressos Angiotensinogênio (Figura 5.9), Renina (Figura 5.10) e Enzima Conversora de Angiotensina - ECA (Figura 5.11). A ECA teve aumento significativo da expressão em uma hora com estímulo de LPS em relação ao controle e aos outros tempos estimulados com LPS.

O Receptor de Angiontensina tipo 1, responsável pela via clássica do Sistema Renina Angiotensina, esteve presente em uma e 24 horas (Figura 5.12). Em 24 horas a ECA também se manteve presente.

Já o Receptor MAS, Enzima Conversora de Angiotensina-2 e receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT2), responsáveis pela produção de Ang 1-7, não foram encontrados nas células da papila apical nos períodos avaliados de 1, 3, 5 e 24 horas.

Figura 5.9 - Representação gráfica da expressão de Agiotensinogênico (AGT) nas células da papila apical com Meio de Proliferação (controle) e estimuladas com 1µg/mL de LPS em 1, 3 e 5 horas. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.

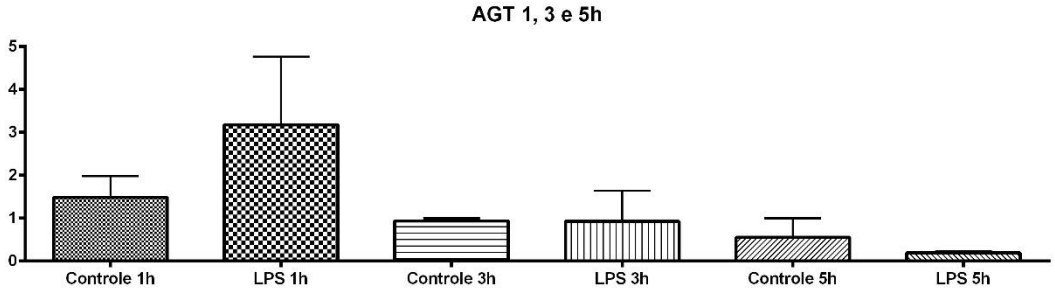


Figura 5.10 - Representação gráfica da expressão Renina nas células da papila apical com Meio de Proliferação (controle) e estimuladas com 1µg/mL de LPS em 1, 3 e 5 horas. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.

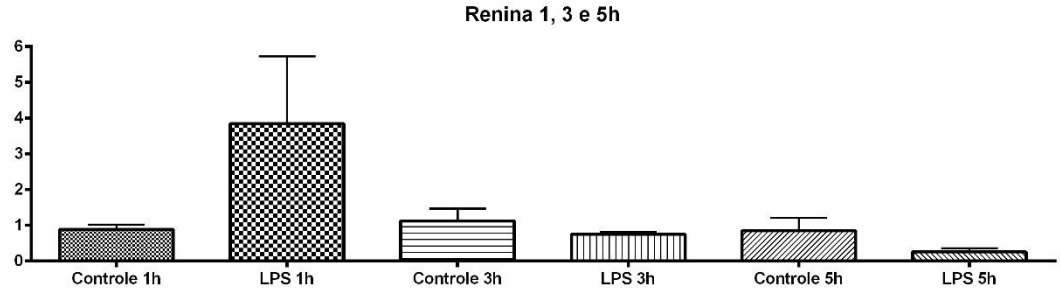
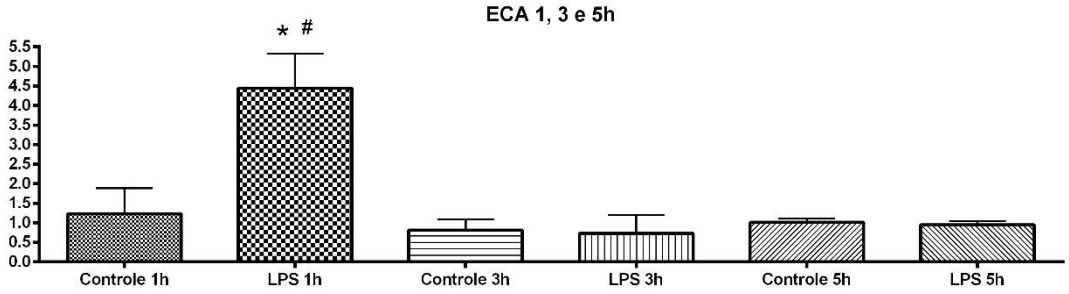
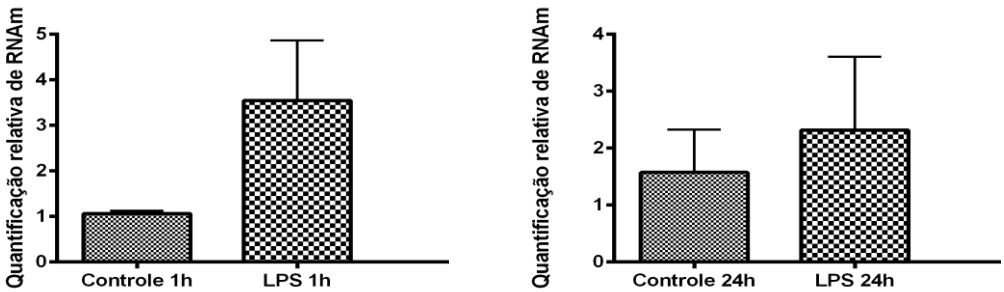



Figura 5.11 - Representação gráfica da expressão Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) nas células da papila apical com Meio de Proliferação (controle) e estimuladas com 1µg/mL de LPS em 1, 3 e 5 horas. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.




*p< 0,05 em relação ao controle 1 hora
#p<0,05 em relação a LPS 3 e 5 h

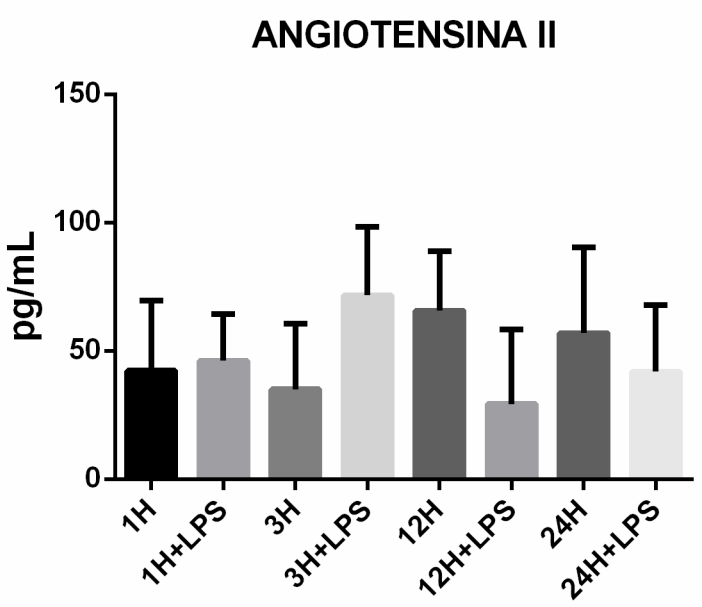
Figura 5.12 - Representação gráfica da expressão do receptor de Angiotensina II tipo 1 -AT1 nas células da papila apical com meio de proliferação (controle) e estimuladas com 1µg/mL de LPS em uma hora (imagem esquerda) e 24 horas (imagem direita). A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.



### 5.3.2 Detecção de produção in vitro de Angiotensina II

Angiotensina II foi produzida pelas células da papila apical em 1, 3, 12 e 24 horas estimuladas ou não por LPS, porém sem diferença estatística entre os grupos (Figura 5.13).

Figura 5.13 - Produção de Angiotensina II pelas células da papila apical em 1, 3, 12 e 24 horas em Meio de Proliferação (controle) e Meio de Proliferação acrescido de LPS 1µg/mL.



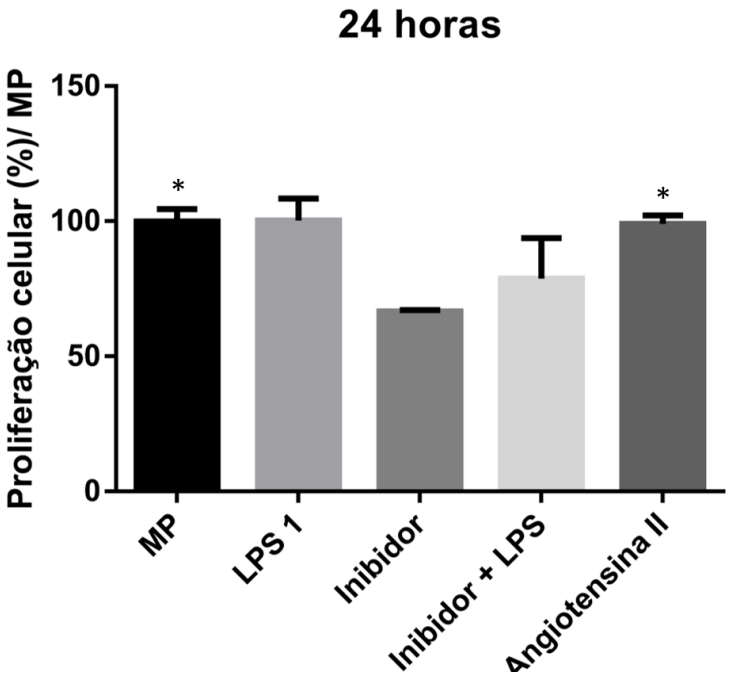

## 5.4 QUARTA FASE

### 5.4.1 Papel da Angiotensina II nas CPA: Viabilidade celular

A fim de analisar o efeito da Angiotensina II sobre a viabilidade das células da apical, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio).

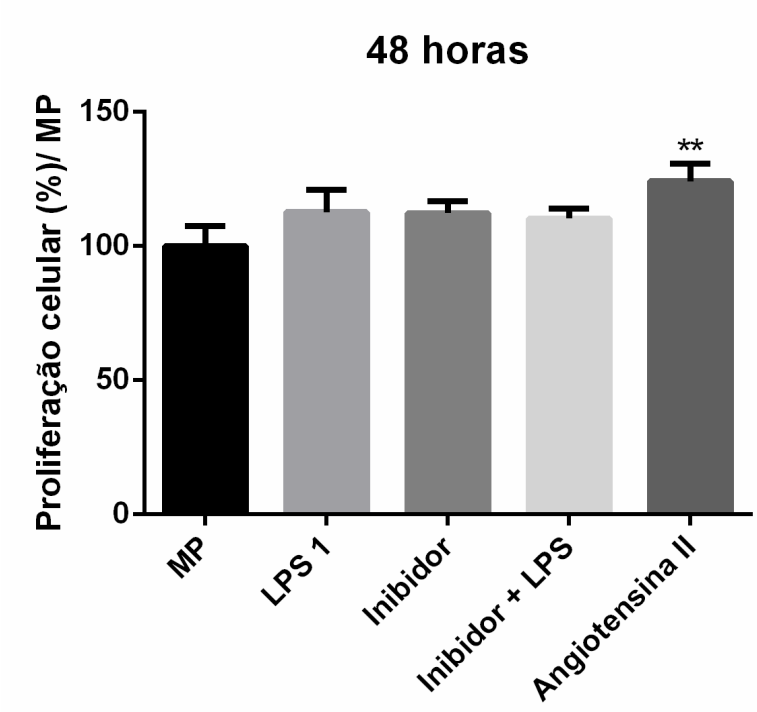
Em 24 horas, o estímulo com Ang II fez as células proliferarem mais quando comparadas com as células com estimuladas com o inibidor de AT1. Paralelamente, inibindo-se AT1 a viabilidade celular foi significativamente menor em relação ao controle (Figura 5.14). Em 48 horas, o estímulo com Angiotensina II teve aumento significativo na viabilidade das células da papila apical comparando-se com o controle (Figura 5.15). Já em 72 horas, inibindo-se AT1 aliado ao estímulo com LPS observou-se redução significativa da viabildade celular comparando-se com todos os grupos (controle, Ang II, LPS 1µg/mL e somente inibidor de AT1). Apenas com o inibidor também houve redução significativa em relação ao controle, Ang II e LPS (Figura 5.16).

Figura 5.14 - Viabilidade de CPA. Células foram mantidas em meio de proliferação MP(controle); LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL por 24 horas.



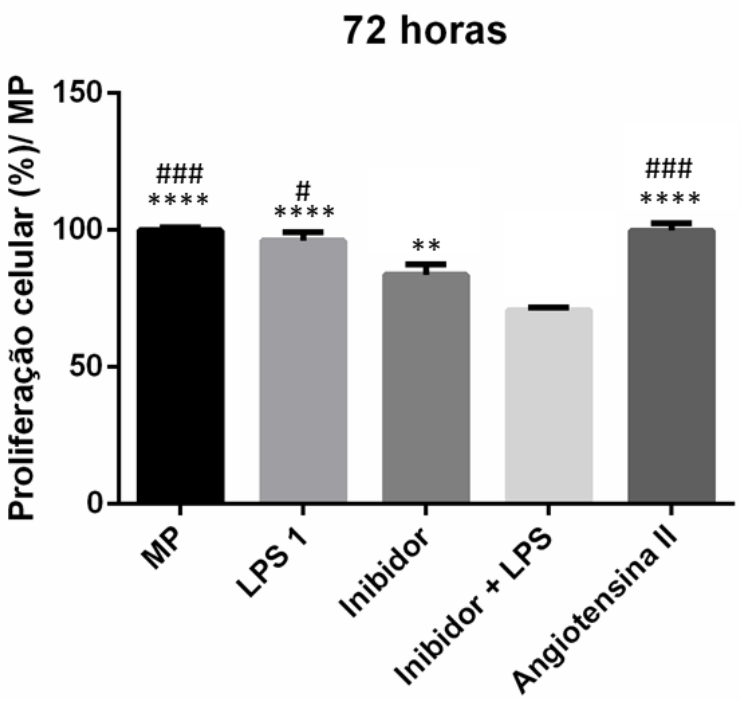

*p< 0,05 em relação ao Inibidor

Figura 5.15 - Viabilidade de CPA. Células foram mantidas em meio de proliferação MP(controle); LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL por 48 horas.




**p< 0,01 em relação a MP

Figura 5.16 - Viabilidade de CPA. Células foram mantidas em meio de proliferação MP(controle); LPS 1µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL por 72 horas




**p< 0,01 em relação ao Inibidor+LPS
****p< 0,0001 em relação ao Inibidor+LPS
#p< 0,05 em relação ao Inibidor
###p< 0,001 em relação ao Inibidor

### 5.4.2 Papel da Angiotensina II nas CPA: Detecção de produção de citocinas inflamatórias por ELISA

A citocina IL-1 β não foi produzida em 24 horas no sobrenadante das CPAs. Já as citocinas IL-6, OPG e MSC-F foram expressas, porém não mostraram diferença significativa entre os grupos controle; LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1; Inibidor associado ao LPS e a própria Ang II (Figura 5.17).

RANKL foi produzido pelas células da papila apical e a expressão foi significativamente maior nas células estimulas por Ang II quando comparadas ao controle (MD) (Figura 5.18).

A quimiocina MCP-1/CCL-2 foi produzida nas células da papila apical. Ang II, LPS 1µg/mL e Inibidor associado ao LPS aumentaram a produção da quimiciona

significativamente em relação ao Inibidor ou controle. Ou seja, a presença do LPS e da Angiotensina aumentou a produção de CCL-2 nas células estudadas (Figura 5.19).

Figura 5.17 - Expressão de IL-6, M-CSF e OPG em pg/mL nas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP); LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL por 24 horas.

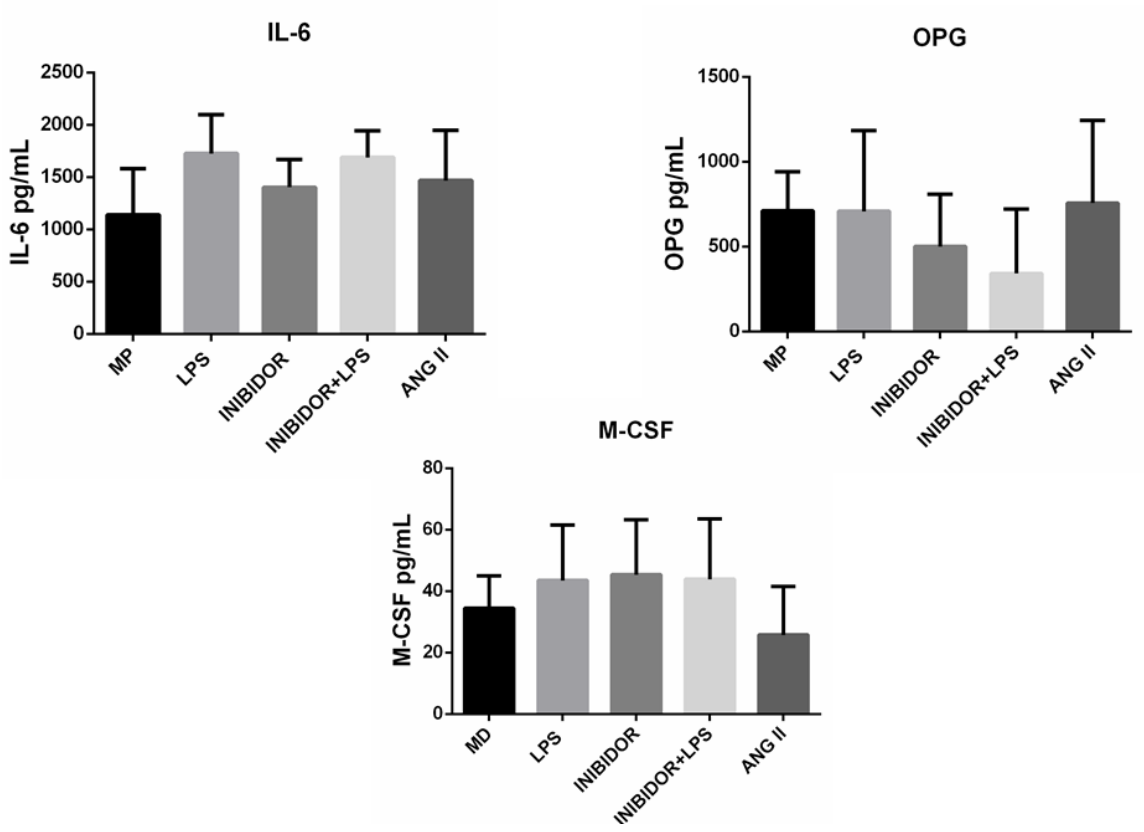
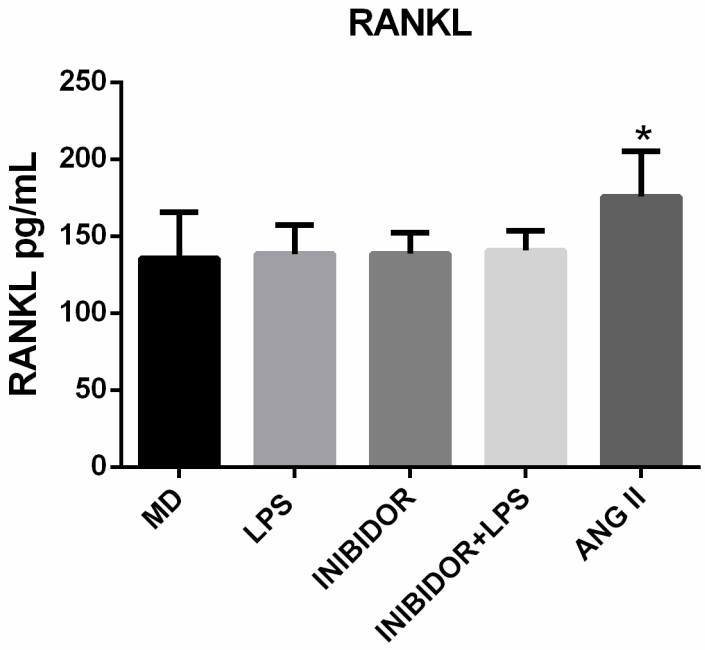
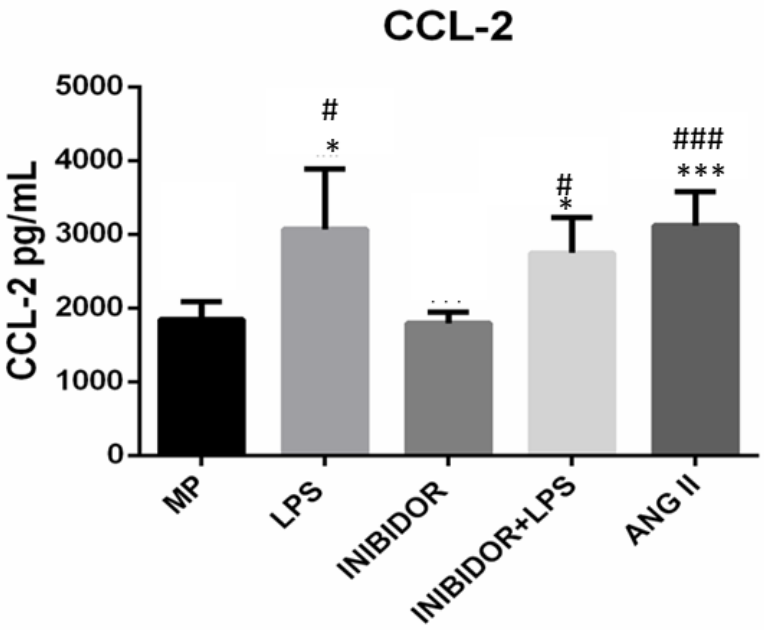


Figura 5.18 - Expressão de RANKL em pg/mL nas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP); LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL por 24 horas.




*p< 0,05 em relação a MD

Figura 5.19 - Expressão de CCL-2 em pg/mL nas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP); LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL por 24 horas.




*p< 0,05 em relação a MP
***p< 0,001em relação a MP
#p<0,05 em relação ao Inibidor
#p<0,001 em relação ao Inibidor

### 5.4.3 Papel da Angiotensina II nas CPA: Diferenciação celular

A formação de nódulos mineralizados foi detectada utilizando o ensaio de Vermelho de Alizarina com o período de indução de 14 dias. Houve diferenciação osteo/odontogênica das CPA, porém sem diferença significativa entre os grupos com meio de diferenciação; LPS; Inibidor de AT1; Inibidor de AT1 associado ao LPS e a própria Ang II (Figuras 5.20 e 5.21).

Figura 5.20: Indução de diferenciação osteo/odontoblástica em células de papila apical. CPA foram mantidas em meio de diferenciação; estimuladas com LPS 1 µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL; Inibidor de AT1 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL. Deposição de cálcio detectada por meio de ensaio de Alizarina S após 14 dias de cultivo, imagens macro e microscópicas.

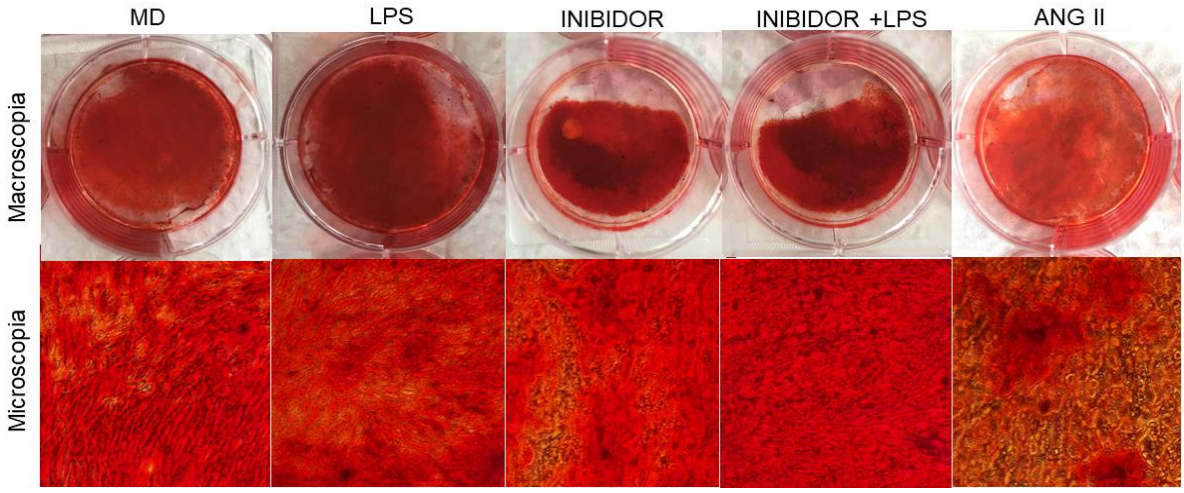
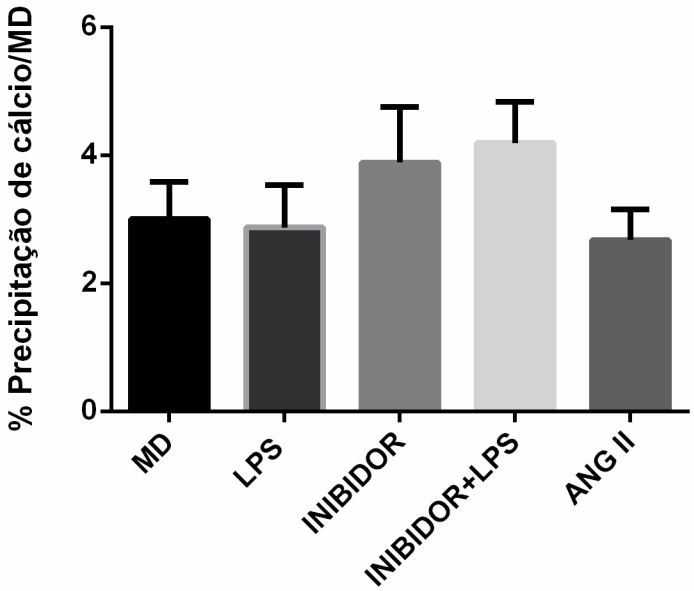



Figura 5.21: Indução de diferenciação osteo/odontoblástica em células de papila apical. CPA foram mantidas em meio de diferenciação; estimuladas com LPS 1 µg/mL; Inibidor de Ang II 10µg/mL; Inibidor de Ang II 10µg/mL associado ao LPS 1µg/mL e a própria Ang II 1µg/mL. Deposição de cálcio detectada por meio de ensaio de Alizarina S após 14 dias de cultivo



# 6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de tornar a discussão deste trabalho clara, inicialmente serão discutidos aspectos pertinentes ao papel do lipopolissacarídeo (LPS) nas células da papila apical e posteriormente, à presença e função do Sistema Renina Angiotensina nas CPA.

## 6.1 CÉLULAS DA PAPILA APICAL E O ESTÍMULO COM LPS

Células da papila apical têm sido descritas como uma fonte de células nos procedimentos regenerativos endodônticos (16). Na primeira fase do estudo, células da papila apical foram isoladas e caracterizadas como sendo células mesenquimais indiferenciadas por apresentarem níveis típicos de marcadores de células tronco: CD146+/STRO-1+/ CD24+ e CD45-/ CD34-. Os resultados estão em concordância com estudos prévios da literatura (9,15) os quais utilizaram tal como o presente trabalho, a citometria de fluxo para identificar os marcadores de superfície.

A infecção do sistema de canais radiculares e inflamação periapical podem afetar a sobrevivência destas células alterar suas funções, o que é crucial para a continuação do desenvolvimento radicular em dentes com rizogênese incompleta que irão receber tratamento endodôntico regenerativo. Sendo assim, tem se tornado uma preocupação frequente compreender o potencial impacto das toxinas bacterianas sobre essa população celular.

Para avaliar se toxinas bacterianas exerciam algum efeito citotóxico nas células da papila apical, as células foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de LPS de *Escherichia coli* (0,1; 1 e 10 µg/mL) por 1, 3, 5 ,7 e 14 dias em meio de proliferação e diferenciação e os resultados mostraram que as células mantiveram-se viáveis e proliferativas independente da concentração, tipo de meio de cultura e do tempo estimuladas.

Esses dados corroboram com os achados que demonstraram que as células da papila apical podem sobreviver a infecção do sistema de canais radiculares (21,

133). Os resultados também estão de acordo com outros estudos, os quais avaliaram o efeito do LPS em células pré-osteobláticas (31), células mesenquimais de medula-óssea (32), células mesenquimais do tecido adiposo(134), nas células do ligamento periodontal (33,34) e principalmente nas células da papila apical (35).

Uma vez que não houve alteração na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, na sequência, determinamos se os LPS teriam algum efeito sobre a resposta inflamatória celular. Os resultados obtidos mostraram que o LPS de *E. coli* na concentração de 1µg/mL foi capaz de induzir um aumento na expressão dos genes para MCP-1/ CCL-2 através de *ELISA*. Estudos na literatura mostram que tal quimiocina está presente em infecções bacterianas como lesões periradiculares (56–58). Também já foi constatado que procedimentos endodônticos que tem por finalidade reduzir a carga microbiana diminuem a expressão de CCL-2 (59,60) e já foi também verificado que a quimiocina é aumentada na presença de LPS de diferentes bactérias em células de polpa (61). Portanto, trabalhos comprovam que a quimiocina está relacionada e exacerbada na presença microbiana, e de fato, no presente estudo, o LPS a 1 e 10 µg/mL aumentaram a expressão de CCL-2, confirmando o que a literatura traz a respeito. O aumento dessa citocina está relacionado com o recrutamento principalmente de monócitos/ macrófagos para sítios inflamatórios, portanto, o resultado nos mostra que a presença de LPS a 1 µg/mL nas células da papila apical ativa a quimiotaxia de células de defesa para a região, sendo esta uma resposta vital para eliminar os patógenos da lesão periradicular através da fagocitose(53). Vale ressaltar também que o conhecimento reunido sobre as funções da CCL2 nas CPA pode abrir caminho para o desenvolvimento de estratégias seguras para o controle dos efeitos indesejáveis da inflamação, sem comprometer seus efeitos benéficos.

A patogênese das lesões periapicais representa uma interação entre o desafio microbiano e a resposta imune do hospedeiro, resultando na produção de citocinas e reabsorção óssea. Nosso estudo demonstrou que as células da papila apical produzem Osteoprotegerina (OPG), que inibe a diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Porém, os resultados mostraram que o OPG teve sua expressão diminuída na presença de LPS a 0,1 e 10µg/mL. O resultado é explicado e supostamente esperado pois a presença do LPS nas células da papila apical inicia uma condição inflamatória (como visto no presente estudo com o aumento do CCL-2), e o equilíbrio entre a expressão de RANKL e OPG é alterada frente a inflamação,

de modo que é ativada uma cascata de transdução de sinais que conduz à osteoclastogênese(62).

Kawashima e Yang em 2000 (65) já haviam comprovado que em lesões periapicais a expressão do OPG diminuiu no período da expansão da lesão e Chuang et al., 2012 (135) demonstram também que é diminuído o OPG em dentes com exposição pulpar em relação aos com polpa intacta. Além de que outro estudo (64) constatou que o LPS é capaz de estimular diretamente os osteoblastos a expressar em RANKL, resultando na diferenciação de osteoclastos. Em células de ligamento periodontal (41) e de cementoblastos (68), o LPS induziu o aumento de RNAm de OPG. Acredita-se que tais células estimuladas por toxinas bacterianas possuam mecanismos defensivos diferentes que inibem a destruição óssea. De fato, nosso estudo demonstrou que as células da papila apical expressam a Osteoprotegerina, porém o desafio bacteriano teve efeito inibitório, sugerindo que a presença microbiana tem potencial de ativação dos osteoclastos e consequente reabsorção óssea.

## 6.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NAS CÉLULAS DA PAPILA APICAL

No presente trabalho, de forma inédita, foram apresentados dados que documentaram a existência de um Sistema Renina Angiotensina local nas células da papila apical humana *in vitro.* Foi detectada a expressão gênica para Angiotensionogênio, Renina, Enzima Conversora de Angiotensina, Receptor AT1 e, comprovando a existência dos componentes da via clássica do SRA nas células estudadas. Uma vez que a produção de proteína é soberana, nosso resultado também evidenciou a produção de Angiotensina II pelas células da papila apical através do *ELISA.* Nesse sentido, nosso achado contribuiu para o estudo do SRA localizado em tecidos específicos independentemente do SRA circulante.

Na literatura há evidênicas da exisência de um ou mais componentes do SRA local nos teciduos bucais. O AT1 já foi encontrado em fibroblastos gengivais de cobaia (97) e humanos (83). AT1 e AT2 em fibroblastos gengivais de coelhos (136), AT1 também já foi detectado na polpa e tecido gengival de furão (98) e no tecido

periodontal de camundongo (101). Os receptores AT1 e AT2 foram encontrados na polpa dentária de ratos (99) e no tecido gengival de ratos, já foi comprovada a expressão de RNAm para Angiotensinogênio, Renina, Receptores AT1, AT2 e ECA (102).

Infere-se também no presente estudo, com o tempo experimental estudado de 24 horas, que nas células da papila apical está presente apenas a via clássica da Angiotensina II, quando esta interage com o receptor AT1. Na população celular estudada e em 24 horas não foi econtrada a expressão gênica para o receptor MAS, ECA-2 e AT2, responsáveis pela formação da Angiotensina 1 -7, porém essa via foi encontrada nas células de polpa e gengival *in vivo* (99,100,102). Sugere-se avaliar outros tempos experimentais na busca dos receptores de Angiotensina 1 -7.

Sabendo-se que as células são a chave do sucesso de procedimentos endodônticos regenerativos e em casos de necrose pulpar ocore a invasão de microrganismos e instalação de processos inflamatórios, sugerimos o papel de lipopolissacarídeo (LPS) sobre as células da papila na indução de componentes do Sistema Renina Angiotensina (SRA).

No presente estudo verificamos uma tendência de aumento da expressão dos componentes do Sistema Renina Angiotensina após uma hora de estímulo com LPS, e de fato, a Enzima Conversora de Angiotensina teve aumento significativo na presença da toxina microbiana neste tempo experimental. É sabido que a presença de bactérias desencadeia uma resposta inflamatória nas células da papila apical, e este nosso resultado vai de encontro ao que a literatura diz, ao considerar que existem estudos que comprovaram que há aumento da expressão de componentes do SRA quando há presença de inflamação (99,137). Ademais, vale a pena ressaltar que a própria Ang II tem ações pró-inflamatórias (138).

Ao avaliar o efeito da Angiotensina II sobre a viablidade celular, nossos resultados demonstraram que em 48 e 72 horas a Ang II aumentou a proliferação das células da papila apical e inibindo a ligação do peptídeo em AT1 houve diminuição do crescimento da população celular estudada. Primeiramente, cabe destacar que a Ang II é conhecida por seu efeito clássico de induzir proliferação celular mediada via receptores AT1 (30,86). Além de que os dados do presente estudo estão de acordo com a literatura pois Ohuchi et al., 2002 (97) demonstraram que o tratamento com fármacos antagonistas de receptores de Ang II diminuiu a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaio. E o mesmo grupo de autores (136),

demonstraram que a Ang II induziu a proliferação de fibroblastos gengivais de coelhos de maneira concentração-dependente. Os dois trabalhos demonstraram que a proliferação induzida pela Ang II nestas células cultivadas ocorre via receptores AT1. Ou seja, nossos dados vêm confirmar o efeito proliferativo da Ang II, demonstrando que nas células da papila apical houve o crescimento celular como discutido anteriormente para células de outros tecidos.

Outro objetivo de nosso estudo foi avaliar o papel da Ang II na produção de citocinas inflamatórias nas células da papila apical, visto que evidências científicas demonstram que a ativação de células da papila por estímulos pró- inflamatórios resulta na inibição da sua diferenciação (51). Suzuki et al., 2003 (107) demonstraram que Ang II devido a suas ligações com AT1, desencadeia a cascata de sinalização intracelular que irá regular vários genes considerados pró- inflamatórios. O resultado da atual pesquisa corrobora com os pesquisadores acima ao avaliar o efeito da Ang II na expressão de MCP-1/ CCL-2 nas células da papila apical, considerando que tal quimiocina é responsável pelo recrutamento de células de defesa para sítios inflamatórios (53). Nosso resultado demonstrou que a presença da Angiotensina II aumentou a expressão de CCL-2 nas células da papila apical. Não somente, foi também constatado que inibindo-se AT1, a expressão da quimiocina decresceu significativamente. Ou seja, na fase da inflamação responsável pelo recrutamento de leucócitos, mais especificamente monócitos/ macrófagos, a atual pesquisa atestou que a Ang II está envolvida desempenhando seu papel pró- inflamatório.

Estudos na literatura corroboram os nossos resultados. Gabriele et al., 2017 (109) verificaram diminuição das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 induzidas por IL-1β em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal de ratos quando o receptor AT1 foi silenciado. Em macrófagos e células vasculares do músculo liso, a Ang II aumentou a expressão de IL-8 e CCL-2 (110). Também nesta população celular a Ang II estimulou, de maneira tempo-concentração dependente, a produção de , IL-6 e IL-8 via receptor AT1 (111). Outro estudo constatou que um bloqueador de Ang diminuiu a expressão de MCP-1 em lesões ateroscleróticas de ratos (112) e por fim, o tratamento com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina atenuou a expressão vascular de MCP-1 e IL-8 em lesões ateroscleróticas (113).

Em contrapartida aos resultados do CCL-2, a citocina inflamatória IL-6 não teve aumento significativo com a presença de Ang II nas células da papila humana *in vitro*. Gabriele et al., 2017(109) também verificaram em fibroblastos de gengiva e

ligamento periodontal de ratos que a Losartan (inibidor de AT1) não modulou a secreção de IL-6 e IL-8 induzida por IL-1β. Nakamura et al., 2011 (103) relataram que o uso de um antagonista do receptor AT1 não reduziu significativamente os níveis de IL-6. Em células do músculo liso vascular de aorta de ratos, um antagonista do receptor de Ang II extracelular também não influenciou os efeitos intracelulares deste peptídeo (139). Sabe-se que a localização nuclear do receptor AT1 resulta numa ativação nuclear específica (140). Sendo assim, estes fatos sugerem que Ang II e o receptor AT1 exercem suas funções principalmente no interior das células (103). Visto isso, mais estudos com foco nos mecanismos das ações da Ang II na inflamação em células da papila humana são necessários.

As lesões perirradiculares são induzidas pela infecção da polpa dental e antígenos microbianos que chegam ao ápice pelo forame apical e estimulam a liberação de citocinas que induzem osteoclastogênse levando à reabsorção óssea progressiva na região periapical. Nessa perspectiva, muitos estudos enfatizam o papel benéfico para a saúde óssea pela inativação da sinalização de Angiotensina II via receptores AT1. Tsubakimoto et al., 2009 (120) descobriu que a inibição de Ang II via AT1 *in vivo* atenuou a diferenciação de monócitos, as células precursoras de osteoclastos. Santos et al., 2015 (118) observaram que o tratamento com Losartan (inibidor de AT1) atenuou a reabsorção óssea (análise da perda óssea) induzida experimentalmente em ratos. Chen et al., 2015(119) demonstraram em ratos que Losartan (inibidor de Ang II) pode aumentar a massa óssea in vivo e suprimir diretamente a osteoclastogênese in vitro mediada por RANKL em osteoclastos. Em uma linhagem de células de ratos, o bloqueio de AT1 reduziu a osteoclastogênese indiretamente, aumentando a taxa de RANKL /OPG em osteoblastos (115). Em camundongos, Losartan diminuiu marcadores de osteoclastos, como RANK, RANKL enquanto OPG foi aumentada (121). Outro estudo com antagonista do receptor AT1reduziu perda óssea em ratos, por diminuir os níveis de RANKL e RANK e aumentar OPG (122).

Coletivamente, esses dados confirmam que a sinalização da Angiotensina influencia a remodelação óssea. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez em células da papila apical, que quando estimulas *in vitro* pela Angiotensina II, houve aumento da produção de RANKL. Ou seja, o presente estudo vai de encontro a literatura quando comprova o efeito pró- reabsorção óssea da Ang II. Nossos dados demonstraram tanto que a Ang II foi capaz de aumentar a quimiocina CCL2

que é considerada um fator mediador da remodelação óssea, por recrutar monócitos, que são os precursores dos osteoclastos (53), assim como aumentou a produção de RANKL, ativador da osteoclastogênese (62).

Um achado interessante da nossa pesquisa foi que com o estímulo *in vitro* da Angiotensina nas células da papila, não houve aumento da expressão do fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF). É sabido que os monócitos/ macrófagos podem se diferenciar em osteoclastos e a maturação pode ocorrer pela ação do fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) e pelo RANKL (63), portanto, nosso estudo demonstrou que apenas o RANKL foi aumentado significativamente na presença da Ang II.

Por fim, avaliamos se a Ang II estava relacionada com a capacidade de mineralização celular nas células da papila apical. Nakai et al, 2015 (123) avaliaram uma linhagem de células de osteosarcoma de ratos e o estímulo com Ang II diminuiu com a mineralização celular. Um estudo com osteoblastos de calvária de ratos também relatou que Ang II suprimiu a formação de nódulos mineralizados em 14 dias (87). Nossos resultados também em 14 dias mostraram uma diminuição, porém não significativa da Ang II na mineralização das células da papila apical. Inibindo-se AT1 observamos uma tendência de aumentar a formação de nódulos mineralizados nas CPA e acreditamos que com o aumento da amostra a diferença significativa possa ocorrer.

Em suma, pela primeira vez um estudo detectou o Sistema Renina Angiotensina nas células da papila apical e evidenciou os efeitos proliferativos, pró-inflamatórios e pró- reabsorção óssea do principal peptídeo efetor do sistema, a Angiotensina II nessas células. Esse conhecimento é essencial para o progresso dos procedimentos clínicos regenerativos, pois uma vez que a Ang II tem esses efeitos nas células-tronco da papila apical, que é considerada a fonte de células para que a rizogênese aconteça, abordagens com enfoque direcionado à reversão das alterações apresentadas por esse peptídeo podem ser benéficas para a revascularização pulpar em dentes necróticos com rizogênese incompleta.

# 7 CONCLUSÃO

- Células da papila apical foram isoladas e caracterizadas como sendo células mesenquimais indiferenciadas.
- As células mantiveram-se viáveis e proliferativas na presença de LPS *Escherichia coli.*
- Os resultados obtidos mostraram que o LPS na concentração de 1µg/mL foi capaz de induzir um aumento na expressão dos genes para MCP-1/ CCL-2.
- Nosso estudo demonstrou que o OPG teve sua produção diminuída na presença de LPS a 0,1 e 10µg/mL.
- Foi detectada, de forma inédita, a expressão gênica para Angiotensionogênio, Renina, Enzima Conversora de Angiotensina e Receptor AT1 comprovando a existência dos componentes da via clássica do SRA nas células estudadas. A Enzima Conversora de Angiotensina teve aumento significativo na presença de LPS.
- Ao avaliar o efeito da Angiotensina II sobre a viablidade celular, nossos resultados demonstraram que em 48 e 72 horas a Ang II aumentou a proliferação das células da papila apical
- A presença da Angiotensina II aumentou a expressão de CCL-2 nas células da papila apical.
- Nossos resultados demonstraram que quando as células da papila apical foram estimuladas *in vitro* pela Angiotensina II, houve aumento da produção de RANKL.
- Inibindo-se AT1 observamos uma tendência de aumentar a formação de nódulos mineralizados nas CPA, porém sem diferença significativa.

## REFERÊNCIAS[1]


1. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. Dent Traumatol. agosto de 2001; 17(4):185-7.

2. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. Dent Traumatol. junho de 2002: 18(3):134-7.

3. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. J Endod. abril de 201: Apr;37(4):562-7

4. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. Acta Odontol Scand. dezembro de 1961: 19:324-53.

5. Banchs F, Trope M. Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? J Endod. 2004;30(4):196-200.

6. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. Pediatr Dent. 2007: Jan-Feb;29(1):47-50.

7. Jung I, Lee S, Hargreaves K. Biologically Based Treatment of Immature Permanent Teeth with Pulpal Necrosis: A Case Series. J Endod. julho de 2008: Jul;34(7):876-87.

8. Kim D-S, Park H-J, Yeom J-H, Seo J-S, Ryu G-J, Park K-H, et al. Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. Int J Oral Sci.. 25 de junho de 2012: 4(2):109-13.

9. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. PLoS One. 2006;1(1):1–8.


[1] De acordo com Estilo Vancouver.

10. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo. Proc Natl Acad Sci. 5 de dezembro de 2000: Dec 5;97(25):13625-30.

11. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci. 13 de maio de 2003: 13;100(10):5807-12

12. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. julho de 2004: 10-16;364(9429):149-55

13. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol [Internet]. abril de 2005: 24(2):155-65

14. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 1 de abril de 2003: 18(4):696-704

15. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. Arch Oral Biol. outubro de 2013: Oct;58(10):1556-68

16. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. J Endod. 2008;34(2):166–71.

17. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftsoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). Arch Oral Biol. julho de 2011: 56(7):709-21

18. Shrestha S, Torneck CD, Kishen A. Dentin Conditioning with Bioactive Molecule Releasing Nanoparticle System Enhances Adherence, Viability, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. J Endod. maio de 2016: 42(5):717-23

19. Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, et al. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. Stem Cell Res. maio de 2012: 8(3):346-56.

20. Wang J-J, Dong R, Wang L-P, Wang J-S, Du J, Wang S-L, et al. Histone demethylase KDM2B inhibits the chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. Int J Clin Exp Med. 2015: Feb 15;8(2):2165-73.

21. Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Marçal Mazza Sundefeld ML, Tadahirowayama M, Lodi CS, et al. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. J Endod. 2014;40(4):538–42.

22. Huang GTJ, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. J Endod. 2008;34(6):645–51.

23. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/Progenitor Cell–Mediated *De Novo* Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an *In Vivo* Model. Tissue Eng Part A. 2010;16(2):605–15.

24. Böttcher DE, Scarparo RK, Batista EL, Fossati ACM, Grecca FS. Histologic evaluation and immunohistochemical localization of STRO-1 and BMP-4 in rat immature teeth: A comparison between vital and induced pulp necrosis. Arch Oral Biol. setembro de 2013: 58(9):1174-9.

25. Sheehy EC, Roberts GJ. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. Br Dent J . 11 de outubro de 1997: 11;183(7):241-6.

26. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med fevereiro de 1987;38(1):417–32.

27. Herrera DR, Silva EJNL, Santos CC, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Root canal content from primary endodontic infection and upregulation of gelatinases in fibroblast cells. Int Endod J. dezembro de 2015: 48(12):1168-74.

28. Marinho ACS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPF de A. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. J Appl Oral Sci [Internet]. 2012 Nov-Dec;20(6):661-6.

29. Martinho FC, Chiesa WMM, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. J Endod. fevereiro de 2011: 37(2):163-7.

30. Zheng X, Wu Y, Zhu L, Chen Q, Zhou Y, Yan H, et al. Angiotensin II promotes differentiation of mouse embryonic stem cells to smooth muscle cells through PI3-kinase signaling pathway and NF-κB. Differentiation 2013;85(1–2):41–54.

31. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from Porphyromonas gingivalis. Infect Immun junho de 1999: 67(6):2841-6.

32. Mo IFY, Yip KHK, Chan WK, Law HKW, Lau YL, Chan GCF. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. BMC Cell Biol.18 de setembro de 2008: 18;9:52.

33. Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson B-O. LPS-induced MCP-1 and IL-6 production is not reversed by oestrogen in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol [Internet]. setembro de 2008: 53(9):896-902.

34. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res. dezembro de 2006: 41(6):554-9.

35. Lertchirakarn V, Aguilar P. Effects of Lipopolysaccharide on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. J Endod. 2017;1–6.

36. Albiero Ml, Amorim Br, Martins L, Casati Mz, Sallum Ea, Nociti Jr Fh, Et Al. Exposure of periodontal ligament progenitor cells to lipopolysaccharide from Escherichia coli changes osteoblast differentiation pattern. J Appl Oral Sci 2015: Mar-Apr;23(2):145-52.

37. He W, Wang Z, Luo Z, Yu Q, Jiang Y, Zhang Y, et al. LPS promote the odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells via MAPK signaling pathway. J Cell Physiol [Internet]. março de 2015: 230(3):554-61

38. Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia CO, Diogenes A, et al. Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. 2017;43(6).

39. Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, et al. Effects of Lipopolysaccharide on Newly Established Rat Dental Pulp–derived Cell Line with Odontoblastic Properties. J Endod [Internet]. outubro de 2007: 33(10):1187-91.

40. Abe S, Imaizumi M, Mikami Y, Wada Y, Tsuchiya S, Irie S, et al. Oral bacterial extracts facilitate early osteogenic/dentinogenic differentiation in human dental pulp-derived cells. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology [Internet]. 2010;109(1):149–54.

41. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. Bone. setembro de 2004: 35(3):629-35.

42. Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang C-Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. J Dent Res. 11 de novembro de 2005: 84(11):994-8.

43. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. Infect Immun. setembro de 1995: 63(9):3576-81.

44. Morsczeck CO, Drees J, Dress J, Gosau M. Lipopolysaccharide from Escherichia coli but not from Porphyromonas gingivalis induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. Arch Oral Biol. dezembro de 2012: 57(12):1595-601

45. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol. 1 de agosto de 2001: 2(8):675-80.

46. Kwon S-M, Kim S-A, Yoon J-H, Ahn S-G. Transforming Growth Factor β1–Induced Heat Shock Protein 27 Activation Promotes Migration of Mouse Dental Papilla–derived MDPC-23 Cells. J Endod. agosto de 2010: ;36(8):1332-5

47. Chang H-H, Chang M-C, Wu I-H, Huang G-F, Huang W-L, Wang Y-L, et al. Role of ALK5/Smad2/3 and MEK1/ERK Signaling in Transforming Growth Factor Beta 1–modulated Growth, Collagen Turnover, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla of Human Tooth. J Endod. agosto de 2015;41(8):1272-80

48. Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, et al. Enhancement of Bone Morphogenetic Protein-2-Induced Ectopic Bone Formation by Transforming Growth Factor-β1. Tissue Eng Part A. março de 2011: 17(5-6):597-606

49. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. Lab Investig. 2 de setembro de 2007: 87(9):858-70.

50. Yang X, Zhang S, Pang X, Fan M. Retracted: Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. J Cell Biochem. fevereiro de 2012: 113(2):669-77

51. Liu C, Xiong H, Chen K, Huang Y, Yin X. Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibits the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. Int Endod J. 2016;49(10):950–9.

52. Marton IJ, Rot A, Schwarzinger E, Szakáll S, Radics T, Vályi-Nagy I, et al. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. Oral Microbiol Immunol. fevereiro de 2000: 15(1):63-5.

53. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. J Interf Cytokine Res. 2009;29(6):313–26.

54. Yu X, Antoniades HN, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. Infect Immun. novembro de 1993: ;61(11):4622-8.

55. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. Infect Immun. setembro de 1994: 62(9):4005-14.

56. Rahimi P, Wang CY, Stashenko P, Lee SK, Lorenzo JA, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and monocyte recruitment in osseous inflammation in the mouse. Endocrinology. junho de 1995: 136(6):2752-9.

57. Marçal JRB, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SAL, et al. T-Helper Cell Type 17/Regulatory T-Cell Immunoregulatory Balance in Human Radicular Cysts and Periapical Granulomas. J Endod [Internet]. junho de 2010: ;36(6):995-9

58. Henriques LCF, De Brito LCN, Tavares WLF, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. J Endod. 2011;37(12):1659–62.

59. Bambirra W, Maciel KF, Thebit MM, De Brito LCN, Vieira LQ, Sobrinho APR. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection. J Endod. 2015;41(7):1085–90.

60. De Brito LCN, Fonseca Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. J Endod. 2012;38(4):481–5.

61. Jiang Y, Russell TR, Schilder H, Graves DT. Endodontic pathogens stimulate monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in mononuclear cells. J Endod. 1998;24(2):86–90.

62. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 15 de maio de 2003: 15;423(6937):337-42

63. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science. 1 de setembro de 2000: 1;289(5484):1504-8

64. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. J Immunol. 1 de março de 2001: 1;166(5):3574-9.

65. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. maio de 2007

66. Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegrin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. J Oral Pathol Med. 2012;41(2):186–93.

67. Armada L, Marotta P dos S, Pires FR, Siqueira JF. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. J Endod. agosto de 2015: 41(8):1281-7.

68. Nociti FH, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. J Dent Res. 20 de agosto de 2004: ;83(8):602-7.

69. Maltos KLM, Menezes GB, Caliari M V, Rocha OA, Santos JMM, Alves DLF, et al. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. Arch Oral Biol. junho de 2004: ;49(6):443-50.

70. Watanabe S, Inoue J. Intracellular delivery of lipopolysaccharide induces effective Th1-immune responses independent of IL-12. Doherty TM, organizador. PLoS One. 17 de julho de 2013: 17;8(7):e68671

71. Kishimoto T, Kaneko T, Ukai T, Yokoyama M, Ayon Haro R, Yoshinaga Y, et al. Peptidoglycan and lipopolysaccharide synergistically enhance bone resorption and osteoclastogenesis. J Periodontal Res. agosto de 2012: 47(4):446-54

72. Oliveira SHP, Santos VAC. Lipopolysaccharide-induced stem cell factor messenger RNA expression and production in odontoblast-like cells. J Endod. maio de 2012: 38(5):623-7.

73. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. J Intern Med. setembro de 2008: 264(3):224-36.

74. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. Hypertens (Dallas, Tex 1979) 1 de dezembro de 2001: Dec 1;38(6):1246-9.

75. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. Physiol Ver. julho de 2006: 86(3):747-803.

76. Ben-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. Am J Physiol. julho de 1988

77. Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. Hypertens (Dallas, Tex 1979). março de 1996;27(3 Pt 2):514–7.

78. Gomez RA, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. Molecular biology of the renal renin-angiotensin system. Kidney Int Suppl. novembro de 1990: 30:S18-23.

79. Ryan JW, Day AR, Schultz DR, Ryan US, Chung A, Marlborough DI, et al. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). I. Preparation of antibody-hemeoctapeptide conjugates. Tissue Cell. 1976: 8(1):111-24.

80. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. Physiol Rev. abril de 1977: 57(2):313-70.

81. Lundergan WP, Ferry D, Kobayashi H, Snowdowne KW. Angiotensin-II increases cytoplasmic calcium, cell number and total DNA for human periodontal ligamental cells in vitro. J Periodontal Res. maio de 1999: 34(4):223-8.

82. Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. Biochem Biophys Res Commun. 3 de janeiro de 1997: 3;230(1):176-8.

83. Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiya H, Furuyama S. Angiotensin II induces prostaglandin E(2) release in human gingival fibroblasts. Life Sci. 3 de janeiro de 2003: 3;72(7):795-803.

84. Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. Cell Signal outubro de 2014: ;26(10):2147-60.

85. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. Mol Cell Endocrinol. 29 de abril de 2009: 29;302(2):148-58

86. Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. Prog Neurobiol. fevereiro de 2008: ;84(2):157-81

87. Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. J Endocrinol . março de 1998: 156(3):543-50.

88. da Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Sachs D, Barroso LC, Costa VV, et al. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. J Immunol. 1 de novembro de 2010: 1;185(9):5569-76

89. Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol abril de 1994: ;27(4):1033-47.

90. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem. 27 de outubro de 2000: 27;275(43):33238-43.

91. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. Hypertens (Dallas, Tex 1979) fevereiro de 1988: 11(2 Pt 2):I153-7.

92. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzhir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest. 1 de junho de 2002: 109(11):1417-27.

93. de Gasparo M, Siragy HM. The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. Regul Pept. 31 de maio de 1999: 31;81(1-3):11-24.

94. Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). Peptides outubro de 2009: 30(10):1945-50.

95. Danser AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? Heart. novembro de 1996: 76(3 Suppl 3):28-32.

96. Griendling KK, Lassègue B, Alexander RW. The vascular angiotensin (AT1) receptor. Thromb Haemost. 1 de julho de 1993: 1;70(1):188-92

97. Ohuchi N, Koike K, Sano M, Kusama T, Kizawa Y, Hayashi K, et al. Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol [Internet]. agosto de 2002: 132(4):451-60.

98. Berggreen E, Heyeraas KJ. Role of K+ATP channels, endothelin A receptors, and effect of angiotensin II on blood flow in oral tissues. J Dent Res: 2003 Jan;82(1):33-7.

99. Souza PPC, Fukada SY, Cunha FQ, Costa CAS, Costa-Neto CM. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. Regul Pept. 5 de abril de 2007

100. Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, et al. Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol. 2004;137(3):281–9.

101. Queiroz-Junior CM, Silveira KD, de Oliveira CR, Moura AP, Madeira MFM, Soriani FM, et al. Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. J Periodontal Res. dezembro de 2015: ;50(6):814-23

102. Santos CF, Akashi AE, Dionísio TJ, Sipert CR, Didier DN, Greene AS, et al. Characterization of a Local Renin-Angiotensin System in Rat Gingival Tissue. J Periodontol. janeiro de 2009: 80(1):130-9.

103. Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1β-induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. Eur J Oral Sci. outubro de 2011

104. Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. Bader M, organizador. PLoS One. 5 de agosto de 2015: 5;10(8):e0134601

105. Leung PS. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. Curr Protein Pept Sci. agosto de 2004: 5(4):267-73.

106. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin–angiotensin system in vascular inflammation. Trends Pharmacol Sci. julho de 2008: ;29(7):367-74.

107. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. junho de 2003: 35(6):881-900

108. Gomez RA, Norling LL, Wilfong N, Isakson P, Lynch KR, Hock R, et al. Leukocytes synthesize angiotensinogen. Hypertens (Dallas, Tex 1979). abril de 1993

109. Gabriele LG, Morandini AC, Dionísio TJ, Santos CF. Angiotensin II Type 1 Receptor Knockdown Impairs Interleukin-1β-Induced Cytokines in Human Periodontal Fibroblasts. J Periodontol. janeiro de 2017: 88(1):e1-e11.

110. Schmidt-Ott KM, Kagiyama S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. Regul Pept. 25 de setembro de 2000

111. Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, Egashira K, Takeda K, Kaibuchi K, et al. Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. Hypertens (Dallas, Tex 1979). julho de 2001

112. Martin G, Dol F, Marés A-M, Berezowski V, Staels B, Hum DW, et al. Lesion progression in apoE-deficient mice: implication of chemokines and effect of the AT1 angiotensin II receptor antagonist irbesartan. J Cardiovasc Pharmacol. fevereiro de 2004: 43(2):191-9.

113. Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. Circulation. 18 de março de 1997: 18;95(6):1532-41.

114. de Cavanagh EM V, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. Am J Hypertens 1 de dezembro de 2010: 23(12):1318-25

115. Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. FASEB J julho de 2008: ;22(7):2465-75.

116. Ma L, Ji JL, Ji H, Yu X, Ding LJ, Liu K, et al. Telmisartan alleviates rosiglitazone-induced bone loss in ovariectomized spontaneous hypertensive rats. Bone. julho de 2010: 47(1):5-11

117. Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, et al. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. J Biol Chem. 20 de fevereiro de 2009: 20;284(8):4857-64.

118. Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. PLoS One. 2015;10(8):1–26.

119. Chen S, Grover M, Sibai T, Black J, Rianon N, Rajagopal A, et al. Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. Mol Genet Metab. maio de 2015

120. Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Kishida S, Takata H, Kawahito H, et al. Bone Marrow Angiotensin AT1 Receptor Regulates Differentiation of Monocyte Lineage Progenitors From Hematopoietic Stem Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1 de outubro de 2009: ;29(10):1529-36.

121. Moura AP, Montalvany-Antonucci CC, Rodrigues de Albuquerque Taddei S, Queiroz-Junior CM, Biguetti CC, Garlet GP, et al. Effects of angiotensin II type I receptor blocker losartan on orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofac Orthop. março de 2016: 149(3):358-65

122. Araújo AA, Lopes de Souza G, Souza TO, de Castro Brito GA, Sabóia Aragão K, Xavier de Medeiros CA, et al. Olmesartan decreases IL-1β and TNF-α levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 19 de outubro de 2013: 386(10):875-84

123. Nakai K, Kawato T, Morita T, Yamazaki Y, Tanaka H, Tonogi M, et al. Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT1 receptor in ROS17/2.8 cells. Arch Med Sci. 19 de junho de 2015: 19;11(3):628-37

124. Raicevic G, Najar M, Pieters K, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. Inflammation and Toll-Like Receptor Ligation Differentially Affect the Osteogenic Potential of Human Mesenchymal Stromal Cells Depending on Their Tissue Origin. Tissue Eng Part A. julho de 2012: 18(13-14):1410-8.

125. Sidney LE, Kirkham GR, Buttery LD. Comparison of osteogenic differentiation of embryonic stem cells and primary osteoblasts revealed by responses to IL-1β, TNF-α, and IFN-γ. Stem Cells Dev. 15 de março de 2014: 15;23(6):605-17

126. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosalinflammation and protection. Am J Physiol Cell Physiol. março de 2000: 278(3):C451-62.

127. Sipert CR, Morandini AC de F, Modena KC da S, Dionísio TJ, Machado MAAM, Oliveira SHP de, et al. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by Porphyromonas gingivalis LPS. J Appl Oral Sci. abril de 2013: Mar-Apr;21(2):99-105

128. Sipert CR, Morandini AC, Dionísio TJ, Machado MAAM, Oliveira SHP, Campanelli AP, et al. In Vitro Regulation of CCL3 and CXCL12 by Bacterial By-products Is Dependent on Site of Origin of Human Oral Fibroblasts. J Endod [Internet]. janeiro de 2014: 40(1):95-100

129. Bond JE, Bergeron A, Thurlow P, Selim MA, Bowers E V, Kuang A, et al. Angiotensin-II mediates nonmuscle myosin II activation and expression and contributes to human keloid disease progression. Mol Med 2011: 17(11-12):1196-203

130. Wang J, Dai J, Liu B, Gu S, Cheng L, Liang J. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide activates canonical Wnt/β-catenin and p38 MAPK signalling in stem cells from the apical papilla. Inflammation. 2013;36(6):1393–402.

131. Tom-Kun Yamagishi V, Torneck CD, Friedman S, Huang GT-J, Glogauer M. Blockade of TLR2 Inhibits Porphyromonas gingivalis Suppression of Mineralized Matrix Formation by Human Dental Pulp Stem Cells. J Endod. junho de 2011;37(6):812-8

132. Zhang J, Zhang Y, Lv H, Yu Q, Zhou Z, Zhu Q, et al. Human stem cells from the apical papilla response to bacterial lipopolysaccharide exposure and anti-inflammatory effects of nuclear factor i C. J Endod 2013;39(11):1416–22.

133. Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. J Endod. 2017;43(4):561–7.

134. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. Stem Cells. dezembro de 2006: 24(12):2744-52.

135. Chuang F-H, Tsai C-C, Chen J-H, Chen K-K, Chen Y-K, Lin Y-C. Long-term sequential receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegrin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. J Oral Pathol Med . fevereiro de 2012: 41(2):186-93

136. Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, et al. Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. março de 2004: 137(3):281-9.

137. Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, Unger T, Artuc M. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. Br J Dermatol. novembro de 2005: 153(5):887-93.

138. Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel S-P, Clément J-F, Chénard V, Moreau P, et al. The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex. J Biol Chem. 12 de maio de 2006: 12;281(19):13275-84.

139. Haller H, Lindschau C, Erdmann B, Quass P, Luft FC. Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Circ Res. outubro de 1996: 79(4):765-72.

140. Morinelli TA, Raymond JR, Baldys A, Yang Q, Lee M-H, Luttrell L, et al. Identification of a putative nuclear localization sequence within ANG II AT(1A) receptor associated with nuclear activation. Am J Physiol Cell Physiol. abril de 2007: 292(4):C1398-408.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo do papel de Angiotensina II na diferenciação de células de papila apical humana in vitro

**Pesquisador:** Carla Renata Sipert

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 64233617.1.0000.0075

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.946.955

**Apresentação do Projeto:**

A revascularização pulpar tem resultado em prognósticos mais favoráveis do que a apicificação no tratamento de dentes com rizogênese incompleta.

Sugere-se que células remanescentes da papila apical sejam a chave para o sucesso deste tipo de tratamento e buscar alternativas para novos tratamentos têm sido uma importante linha de pesquisa da endodontia.

**Objetivo da Pesquisa:**

Investigar o papel de angiotensina II na diferenciação in vitro de células de papila apical imunologicamente ativadas.

Objetivo Secundário:

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:Coleta de dentes: Riscos inerentes a extrações de terceiros molares como alveolite, trismo e fratura de mandíbula.

Benefícios: Não serão previstos benefícios a curto prazo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa com grande potencial para contribuição na área da endodontia e dos tratamentos regeneradores da polpa dentária.

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE, Autorização para uso da clínica, projeto, cronograma adequado, folha de rosto assinada pelo dirigente da FOUSP apresentados de forma adequada.

**Recomendações:**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|---|---|---|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_821380.pdf | 31/01/2017 10:06:20 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto_cep.pdf | 31/01/2017 01:40:49 | LAIS NICOLAY PIZZATTO | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderostoassinada.pdf | 31/01/2017 00:40:40 | LAIS NICOLAY PIZZATTO | Aceito |
| Outros | autoriz_clin_lais_assinado.pdf | 31/01/2017 00:39:01 | LAIS NICOLAY PIZZATTO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle_lais.docx | 23/01/2017 16:59:43 | LAIS NICOLAY PIZZATTO | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

SAO PAULO, 03 de Março de 2017

**Assinado por:**
**Maria Gabriela Haye Biazevic**
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br