UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARLA RENATA SIPERT

**Estudo *in vitro* da produção de quimiocinas e pró-colágeno I por fibroblastos
de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental humanos**

BAURU
2011

CARLA RENATA SIPERT

Estudo *in vitro* da produção de quimiocinas e pró-colágeno I por fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental humanos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas na Área de concentração Estomatologia / Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Versão Corrigida

BAURU
2011

Si74e Sipert, Carla Renata
Estudo *in vitro* da produção de quimiocinas e pró-
colágeno I por fibroblastos de gengiva, ligamento
periodontal e polpa dental humanos/ Carla Renata
Sipert. -- Bauru, 2011.
128 p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 015/2007
Data: 28/3/2007

DEDICATÓRIA

Aos que sempre me apoiaram incondicionalmente:...

...meus Pais: **Vili** e **Marli**!

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À **Universidade de São Paulo**, pela formação acadêmica e científica ao longo dos 12 anos em que fui aluna desta renomada instituição.

À **Faculdade de Odontologia** de Bauru por tantas oportunidades de aprendizado proporcionadas por esta escola.

À **Secretaria de Pós-Graduação** pela orientação e suporte acadêmico.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pela concessão de Bolsa de Doutorado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, pelo respeito, apoio e especialmente, pelo exemplo de líder e ser humano.

À **Prof^a Dr^a Ana Paula Campanelli**, por ter me acolhido durante tantos anos e por dedicar sua paciência e atenção.

À **Prof^a Dr^a Sandra Helena Penha de Oliveira**, pelo suporte, incentivo e confiança.

Ao **Dr. Winston Patrick Kuo**, por tornar possível a inimaginável oportunidade de adentrar pelas portas de Harvard.

Ao **Dr. Hajime Sasaki**, pela confiança que permitiu nossa colaboração com o Instituto Forsyth.

Aos amigos e colegas da Farmacologia: **Adriana Calvo, Andrea Senes, Caio Figueiredo, Daniel Brozski, Fernanda Veronese, Marta Cunha Lima e Thaís Garbieri**. Às antigas colegas e hoje docentes **Prof^a Dr^a Thaís Marchini de Oliveira** e **Prof^a Dr^a Lucimara Teixeira das Neves**. Agradeço a contribuição de cada um de vocês em momentos distintos da minha pós-graduação.

Às parceiras de trabalho **Ana Carolina Morandini, Bella Luna Colombini-Ishikiriama** e **Karin Modena** pelo intenso suporte e apoio ao longo destes anos.

Ao grande amigo **Ms. Thiago Dionísio**, pela paciência, exemplo, conselhos e bom humor.

À secretária **Vera Rufino Rosa**, exemplo de competência e força, pelo respeito, compreensão e suporte.

À amiga **Thelma Silva**, pela toda paciência e bom humor.

À querida **Giuliana Bertozzi** por sua constante disponibilidade em ensinar.

À grande amiga **Dr^a Luciane Capelo**, pelos meses de companheirismo durante minha permanência em Boston.

Aos amigos e colegas da Microbiologia: **Carine Oliveira, Cláudia Pinheiro, Eduardo Belai, Hayana Lima e Thaís Gasparoto** por dividirem espaço e conhecimento durante todo o curso de minha pós-graduação. Aos queridos **André Silva** e **Dalva Oliveira**, agradeço pelos longos anos de ajuda e amizade.

Ao **Departamento de Endodontia** pela amizade, aprendizado e confiança. Aos docentes: **Dr. Clóvis Bramante, Dr. Ivaldo Moraes, Dr. Roberto Brandão Garcia, Dr. Norberti Bernardinelli, Dr. Marco Antônio Duarte e Dr^a Flaviana Andrade**; meus sinceros agradecimentos por me receberem novamente nas clínicas e no departamento. À secretária **Sueli Bettio** pela amizade e atenção constantes. A **Edimauro de Andrade** e **Neide Leandro**, meu eterno carinho, gratidão e respeito.

Ao **Departamento de Odontopediatria** pela colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Ao **Departamento de Saúde Coletiva**, por me aceitarem como membro da 21^a Expedição USP em Rondônia. Também aos queridos **Cléia, Ziley, Odemir e Marcos** pela grande parceria de trabalho construída.

Ao **Setor de Endodontia do HRAC**, pela contínua colaboração e aprendizado.

Àqueles que ao longo de minha carreira dedicaram parte de seu tempo e de sua atenção como meus orientadores: **Prof. Dr. Alceu Sérgio Trindade Jr., Prof. Dr. Sérgio Torres** e **Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama**.

Aos mestres que marcaram minha vida e dos quais trago comigo memórias e ensinamentos: **Tia Rina, Tia Célia, Prof^a Cristina de Abreu Catapirra, Miti Warangae** (*in memoriam*), **Neusa Rosa de Oliveira, Selva Stroessner, Veronika Brunnis, Prof. Yuji, Dr Flávio Augusto Cardoso de Faria, Dr. Clóvis Bramante, Dr. Norberti Bernardinelli, Dr. Roberto Brandão Garcia, Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Dr. José Humberto Damante, Dr. Alberto Consolaro, Dr^a Vanessa Soares Lara, Dr. Celso Kenji Nishiyama, Dr^a Renata Pardini Hussne** e **Dr. Fernando de Queiroz Cunha**.

A todos os meus amigos com quem dividi meus risos e angústias, meu eterno carinho;. em especial **Carlos Eduardo Repeke, Cintia Silva, Deise Yamashiba, Hugo Vidotti, Luciana Rezende, Marcela Claudino, Pedro Coesta, Ricardo Kusuda, Tatiana Malaspina** e **Wagner Baseggio**.

À **família Maciel**, por me acolher em sua casa com alegria e respeito.

Ao mais especial dentre meus colegas, **Rubens Maciel**, pelo seu companheirismo e carinho constantes.

Ao meu primo **Fábio Reffatti**, pelos meses em que fizemos companhia um ao outro sempre com muito bom humor.

À minha avó, **Melida Reffatti**, pelo seu exemplo de delicadeza, paciência e carinho.

Aos avós **Anicleto Reffatti**, **Erna Sipert** e **Evaldo Sipert** pela educação e ensinamentos que deixaram e dos quais sempre vou me lembrar com muito orgulho e respeito.

Ao meu irmão e eterno melhor amigo, **Tiago Sipert**, por dividir angústias, risos e memórias.

A **Deus** pela vida, pela saúde e por me guiar pelos caminhos da Sua vontade.

**“Obra de Doutorado.
Escrevi-a com a caneta da ansiedade e a tinta da euforia.”**

(Paráfrase de Machado de Assis)

Carla Sipert, 2008

RESUMO

Fibroblastos são as células mais numerosas encontradas nos tecidos orais como gengiva, ligamento periodontal e polpa dental. Além de exercerem função estrutural, estas células também desempenham papel importante na resposta imune destes tecidos através do reconhecimento de antígenos e produção de mediadores inflamatórios e citocinas. Evidências apontam ainda para o fato de que fibroblastos não constituem um grupo único de células. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: (I) avaliar a produção diferencial de fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental de dentes permanentes e decíduos quanto à produção das quimiocinas CCL3 e CXCL12; (II) avaliar a produção de pró-colágeno I pelas células de polpa e (III) avaliar a expressão diferencial dos fibroblastos quanto a microRNAs. Dentes recentemente extraídos (terceiros molares hígidos) e fragmentos de gengivas saudáveis de três pacientes adultos foram obtidos no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica da Faculdade de Odontologia de Bauru. Caninos decíduos de dois pacientes com indicação para extração por motivos ortodônticos foram obtidos na Clínica de Odontopediatria da mesma unidade. Culturas primárias de fibroblastos de gengiva (n=3), ligamento periodontal (n=3) e polpa de dente permanente (n=3) e polpa dental de dente decíduo (n=2) foram estabelecidas a partir de tecidos humanos por meio de técnica de *explant*. Após a quarta passagem, a produção de CCL3 e de CXCL12 foi avaliada após estímulo com concentrações crescentes (0 – 10 µg/mL) de ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* (EfLTA), lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) ou LPS de *Escherichia coli* (EcLPS) por ELISA após 1, 6 e 24 h. O RNAm para as quimiocinas no grupo estimulado com EcLPS por 24 h foi avaliado por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa. A produção de pró-colágeno I por células de polpa estimuladas com EfLTA e PgLPS foi avaliada por imunofluorescência. O perfil de expressão de microRNAs foi investigado por ensaio de microarranjo. A produção de CCL3 foi aumentada ($p < 0,05$) pelos antígenos empregados, porém de maneira mais evidente para EcLPS em células de gengiva. A quimiocina CXCL12 foi detectada em níveis basais em todos os grupos de células, porém em maiores quantidades em fibroblastos de gengiva seguidos pelos de ligamento periodontal. A adição dos antígenos diminuiu a produção de CXCL12 de maneira distinta entre células e entre antígenos ($p < 0,05$).

Fibroblastos de polpa decídua não apresentaram qualquer alteração na produção desta quimiocina pelos antígenos ($p > 0,05$). No período experimental de 24 h, a expressão do RNAm para CXCL12 não foi alterada enquanto a de CCL3 não foi detectada. A produção de pró-colágeno I se mostrou aumentada ($p < 0,05$) na presença do desafio antigênico em células de polpa com exceção para fibroblastos de polpa permanente que apresentaram diminuição na produção desta proteína quando estimulados com EfLTA. Em condições basais, fibroblastos do mesmo doador apresentaram perfil distinto de expressão de microRNAs envolvidos com a produção das proteínas-alvo deste estudo. A expressão de imunomiRs por EcLPS também se mostrou modificada de maneira distinta entre os fibroblastos, em especial os de ligamento periodontal. Com base nestes resultados, pode-se concluir que fibroblastos de diferentes tecidos orais apresentam comportamento diferencial frente a antígenos bacterianos comumente relacionados a patologias que afetam a cavidade oral.

Palavras chave: Fibroblastos. Quimiocinas. Colágeno. MicroRNA.

ABSTRACT

***In vitro* study of chemokines and procollagen I by human gingival, periodontal ligament and dental pulp fibroblasts**

Fibroblasts are the dominant cells within oral tissues such as gingiva, periodontal ligament and dental pulp. Besides the architectural maintenance of the connective tissues, fibroblasts are also involved in connective tissue immune response through antigen recognition and production of inflammatory mediators and cytokines. Recent studies also demonstrated that fibroblasts do not constitute a unique group of cells. Taken this together, the objectives of the present study were: (I) to evaluate the production of the chemokines CCL3 and CXCL12 by human gingival, periodontal ligament as well as permanent and deciduous dental pulp fibroblasts; (II) to evaluate the production of procollagen I by dental pulp fibroblasts and (III) to evaluate the differential pattern of expression of microRNAs by the oral fibroblasts. Recently extracted teeth (non-carious third molars) and fragments of healthy gingiva from three adults were obtained at the Laboratory for Clinical Pharmacology and Physiology at Dental School of Bauru. Deciduous canines from two patients with orthodontic indication for extraction were obtained at Pediatrics Clinics of Dental School of Bauru. Primary cultures of fibroblasts from gingiva (n=3), periodontal ligament (n=3) as well as permanent pulp (n=3) and deciduous pulp (n=2) were established through an explant technique. After the fourth passage, fibroblasts were challenged with increasing concentrations (0 – 10 µg/mL) of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid (EfLTA), *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (PgLPS) or *Escherichia coli* LPS (EcLPS) for 1, 6 and 24 h. The chemokines were assessed through ELISA while the mRNA for CCL3 and CXCL12 (EcLPS at 24 h) were assessed through reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction. The expression of microRNAs was screened through a microarray assay. The production of CCL3 on cell supernatants was detected in all cellular groups, with higher amounts at gingival fibroblasts. EcLPS induced more important chemokine differences compared to the other antigens. CXCL12 basal levels were higher for gingival fibroblasts followed by periodontal ligament ones, but also detected in dental pulp fibroblasts. The production of this chemokine was decreased by stimulation in a different fashion for each antigen and cell type. Deciduous pulp fibroblasts did not

display any differences in CXCL12 synthesis even in the presence of the microbial challenge. No differences were detected at mRNA level for CXCL12, while no expression for CCL3 could be detected at 24 h. Increased production of procollagen type I was observed for dental pulp cells in general, with the only exception for permanent pulp cells which displayed decreased production of the protein with EfLTA. Microarray analysis showed differential expression pattern of microRNAs comparing unstimulated cells from the same donor. EcLPS was able to alter immunomiRs expression in some of the cellular groups, in particular periodontal ligament fibroblasts. In conclusion, our results showed that fibroblasts from distinct oral tissues display differential behavior against bacterial antigens commonly related to the diseases that affect the oral cavity.

Key words: Fibroblasts. Chemokines. Collagen. MicroRNA.

Lista de Abreviaturas e Siglas

LTA	<i>Lipoteichoic acid</i> – Ácido lipoteicóico
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> – Lipopolissacarídeo
VBNC	<i>Viable But Nonculturable</i>
EfLTA	Ácido lipoteicóico de <i>Enterococcus faecalis</i>
PgLPS	Lipopolissacarídeo de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
EcLPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
MAMPs	<i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>
MD-2	<i>Myeloid Differentiation</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
IL	Interleucina
IFN	Interferon
PGE	Prostaglandina
RNA _m	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido ribonucleico mensageiro
C	Cisteína
X	Aminoácido não conhecido
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
SDF	<i>Stromal-cell Derived Factor</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
CpGDNA	Oligodeoxinucleotídeo contendo frações CpG não metiladas
CXCR	Receptor (R) para quimiocina CXC
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein</i>
Pam ₃ CSK ₄	Lipopeptídeo sintético triacilado
MALP	<i>Macrophage-Activating Lipopeptide</i>

Lista de Abreviaturas e Siglas (continuação)

NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor associated-Receptor Factor</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i> - Óxido Nítrico
miRNA	microRNA
miR	microRNA
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
LAL	<i>Limulus Amoebocyte Lisate</i> – Lisado de Amebócito de Limulus
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Solução salina tamponada por fosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Soroalbumina Bovina
DEPC	Dietil pirocarbonato
cDNA	DNA complementar
RPL13A	<i>Ribosomal Protein L13a</i>
CT	<i>Cicle Threshold</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
Ig	Imunoglobulina
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindol
LBP	<i>LPS Binding Protein</i>
MMP	Metaloproteinase
MAL	<i>MyD88-adaptor-like</i>
TIR	<i>Toll and Interleukin 1 Receptor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFNβ</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IP	<i>Interferon gama-induced protein</i>
COX	Cicloxygenase
iNOS	<i>Inducible NO Synthase</i>

SUMÁRIO

1	Introdução e Síntese Bibliográfica	3
2	Proposição	23
3	Material e Métodos	27
3.1	Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos	27
3.2	Ensaio de Lisado de Amebócito Limulus (LAL)	28
3.3	Estimulação dos Fibroblastos	28
3.4	Detecção de CCL3 e CXCL12 por ELISA	29
3.5	Avaliação da expressão gênica de CCL3 e CXCL12	30
3.6	Detecção da produção de pró-colágeno tipo I por imunofluorescência	32
3.7	Ensaio de micro-arranjo para análise da expressão de microRNAs	33
3.8	Análise estatística	33
4	Resultados	37
4.1	Cultura dos fibroblastos	37
4.2	Ensaio do Lisado de Amebócito de Limulus (LAL)	39
4.3	Produção de MIP-1 α /CCL3 por ELISA	39
4.4	Produção de SDF-1/CXCL12 por ELISA .	49
4.5	Estudo da expressão do RNAm para CCL3 e CXCL12	59
4.6	Estudo da expressão de pró-colágeno tipo I por imunofluorescência	63
4.7	Estudo da expressão de microRNAs por ensaio de micro-arranjo	71
5	Discussão	77
6	Conclusão	97
	Referências Bibliográficas	101

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

A cavidade oral é comumente colonizada por mais de 300 espécies microbianas, na sua grande maioria, bactérias (LOVE; JENKINSON, 2002). Estas bactérias possuem a capacidade de se organizarem em biofilmes complexos especialmente na superfície do esmalte dentário (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). A presença destes biofilmes na superfície dentária poderá levar a processos patológicos diversos. O periodonto de proteção reconhecerá a presença destes microrganismos na superfície do esmalte e do cimento e o processo inflamatório caracterizado como gengivite se iniciará (TATAKIS; KUMAR, 2005). Se o biofilme microbiano persistir, o processo poderá evoluir para periodontite caracterizando-se pela destruição da estrutura óssea de suporte dentário (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). O acúmulo de biofilmes em esmalte dentário poderá também resultar em cárie, patologia que consiste na desmineralização de estrutura de esmalte e dentina em consequência da presença e metabolismo de bactérias acidogênicas (HAHN; LIEWEHR, 2007). À medida que a estrutura mineralizada é amolecida pela atividade bacteriana, os microrganismos são então capazes de adentrar o tecido agora fragilizado e suas endotoxinas e produtos do metabolismo bacteriano podem se difundir pelos túbulos dentinários (LOVE; JENKINSON, 2002). Em resposta à invasão bacteriana, o tecido pulpar dará início à pulpite (WARFVINGE; DAHLEN; BERGENHOLTZ, 1985). Devido à baixa complacência deste tecido, freqüentemente a inflamação evolui para um quadro irreversível e resulta em necrose (HEYERAAS; BERGGREEN, 1999). Quando isso ocorre, gradativamente a cavidade pulpar livre de tecido conjuntivo será colonizada por microrganismos e à medida que o processo infeccioso avança em direção apical, os microrganismos encontram limitações nutricionais e diminuição de oxigênio no interior dos canais radiculares. Ocorre então uma mudança no perfil microbiológico com seleção de microrganismos anaeróbios (SUNDQVIST, 1992). No interior do canal radicular, as bactérias serão novamente capazes de se organizarem em biofilmes complexos que quando em contato com o periodonto apical, desencadearão algum tipo de resposta inflamatória nestes tecidos. Este processo poderá assumir um perfil agudo ou crônico. Este último é caracterizado pela presença de reabsorção óssea, quadro denominado de periodontite apical (FOUAD; ACOSTA, 2001, RICUCCI; SIQUEIRA, 2010). Fatores comuns aos processos

patológicos descritos acima como antígenos bacterianos bem como células residentes dos tecidos que elaboram a resposta inflamatória a estes patógenos serão detalhados a seguir.

Cárie e doença periodontal constituem a maioria das doenças bucais e ambas são conhecidas como infecções causadas por biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Bactérias oriundas da cárie dental ou seus subprodutos são a causa mais comum de pulpite (SELTZER; FARBER, 1994). De maneira geral, a microbiota relacionada à cárie dental é predominantemente composta por bactérias Gram-positivas (HAHN; FALKLER; MINAH, 1991). Em lesões cariosas superficiais, é comumente descrita uma alta frequência de *Streptococcus sp.*, *Actinomyces sp.*, *Eubacterium sp.* e *Lactobacillus sp.* Já em lesões profundas, predomina a presença de anaeróbios como *Eubacterium sp.*, *Propionibacterium sp.* e *Bifidobacterium sp.* (LOVE; JENKINSON, 2002, LIMA et al., 2011). A presença de *Enterococcus sp.* também é relatada em dentina cariada (MARTIN et al., 2002). Bactérias Gram-positivas possuem ao longo da estrutura de sua parede celular um importante fator de virulência: o ácido lipoteicoico (LTA) (HAHN; FALKLER; MINAH, 1991). O LTA é uma molécula anfifílica ancorada à parede celular bacteriana e está associado a processos inflamatórios. LTAs possuem duas cadeias lipídicas aderidas a uma estrutura de glicerol que é conectada a um glicerofosfato hidrofílico ou a uma cadeia de polímero de tetrassacarídeo ribitol fosforilada (JIN et al., 2007). O LTA age como uma molécula de adesão para diversas espécies Gram-positivas facilitando a colonização e invasão de bactérias para o interior dos tecidos (GINSBURG, 2002).

Bactérias Gram-negativas como *Prevotella* e *Porphyromonas* também são encontradas em dentes cariados sintomáticos (LOVE; JENKINSON, 2002). Estas bactérias desempenham papel importante no desenvolvimento de sintomas clínicos através da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (KOGA et al., 1985). A parede celular destes microrganismos contém um fator de virulência de extrema importância: o lipopolissacarídeo (LPS) (KOGA et al., 1985, MAYRAND; HOLT, 1988). Trata-se de uma molécula estável ao calor composta de polissacarídeos e fosfolipídios. Warfvinge, Dahlen e Bergenholtz (1985) demonstraram que componentes de parede celular de *Lactobacillus casei* e LPS de *Prevotella oralis* e

de *Veillonella parvula* são capazes de induzir processos inflamatórios no tecido pulpar ainda que aplicados somente em dentina.

Como descrito anteriormente, o processo inflamatório desencadeado pela cárie poderá culminar na necrose do tecido pulpar e o espaço antes ocupado pela polpa será colonizado por microrganismos que darão início a um processo inflamatório agora no periápice (FOUAD; ACOSTA, 2001, LEONARDO et al., 2004, SIQUEIRA; ROÇAS, 2008). A importância de microrganismos na etiopatogenia da doença periapical já vem sendo amplamente elucidada pela literatura (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965, MOLLER et al., 2004, SIQUEIRA; ROÇAS, 2008). Mais de 40 espécies bacterianas já foram isoladas de canais radiculares de dentes com necrose pulpar (ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006, ROÇAS; SIQUEIRA, 2008, RICUCCI; SIQUEIRA, 2010). Especial atenção tem sido destinada ao perfil microbiológico dos casos de insucesso do tratamento endodôntico. Neste contexto, vários estudos têm relacionado a prevalência de *Enterococcus faecalis* a lesões periapicais que não regridem após a descontaminação decorrente do tratamento endodôntico (KAUFMAN et al., 2005, SEDGLEY et al., 2006, WILLIAMS et al., 2006, ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006, ROÇAS; SIQUEIRA, 2008). Enterococos habitam, de forma comensal, o trato gastrointestinal de humanos, mas podem desencadear uma grande variedade de doenças como infecções urinárias, endocardite bacteriana, dentre outras (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994). *E. faecalis* é encontrado na cavidade oral em locais como o dorso da língua, sulco gengival, canais radiculares e também na saliva (SEDGLEY; LENNAN; CLEWELL, 2004, SEDGLEY; BUCK; APPELBE, 2006). É notável, entretanto, a sua alta prevalência em casos de insucesso do tratamento endodôntico. Os estudos mais recentes mencionam prevalências deste microrganismo em canais radiculares com lesões periapicais persistentes de 12,1% (KAUFMAN et al., 2005), 40,6% (ZHU et al., 2010), 43% (WILLIAMS et al., 2006), 80% (ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006) e 89,6% (SEDGLEY et al., 2006). Williams et al. (2006) relatam que *E. faecalis* foi de duas a três vezes mais freqüente em infecções refratárias do que em primárias. As possíveis razões para esses achados podem estar relacionadas à capacidade de *E. faecalis* em se adaptar a condições adversas (FLAHAUT et al., 1996), como ocorre durante as diferentes fases do tratamento endodôntico (WILLIAMS et al., 2006, SIQUEIRA; ROÇAS, 2008). Estes mecanismos de defesa estão diretamente

relacionados a alguns de seus fatores de virulência, como por exemplo, adesinas que se ligam ao colágeno tipo I (ROZDZINSKI et al., 2001), principal componente orgânico da dentina (LINDE; GOLDBERG, 1993), conferindo à bactéria a capacidade de se alojar nos túbulos dentinários, permanecendo inatingíveis pela ação do preparo biomecânico dos canais (WILLIAMS et al., 2006). Por ser o trato gastrointestinal seu nicho natural, o ambiente alcalino proporcionado pelo uso da medicação intracanal de hidróxido de cálcio não é capaz de inviabilizá-lo como a outros microrganismos (BYSTROM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985, DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002, DELGADO et al., 2010), uma vez que esta bactéria resiste a estas condições por meio de uma bomba de prótons que a mantém viável em condições alcalinas (EVANS et al., 2002). Além disso, em ambientes desfavoráveis, *E. faecalis* é capaz de assumir um estado denominado VBNC (*viable but nonculturable* – viável mas não cultivável) (SIGNORETTO et al., 2000), uma estratégia de sobrevivência que o mantém metabolicamente ativo até que no meio em que ele se encontra, as condições favoráveis sejam restabelecidas (OLIVER, 2005). *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva e seu LTA é considerado um fator de virulência importante (SIGNORETTO et al., 2000, BRUSERUD; WENDELBO; PAULSEN, 2004, KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004, BAIK et al., 2008). A produção e liberação desta molécula por *E. faecalis* em estado VBNC é mais do que duas vezes superior àquela observada durante o crescimento exponencial e estacionário da bactéria (SIGNORETTO et al., 2000). Devido à relevância do LTA nos processos patológicos ligados à pulpite e pela importância de *E. faecalis* na patologia de infecções persistentes em endodontia, esta molécula foi um dos antígenos escolhidos para este estudo.

Além de serem capazes de induzir o estabelecimento de lesões periapicais crônicas (FOUAD; ACOSTA, 2001), infecções bacterianas do canal radicular podem levar a quadros agudos como abscessos dento-alveolares (FERREIRA et al., 2011). No entanto, o microambiente do sistema de canais radiculares favorece a seleção de microrganismos anaeróbios com predominância de cepas Gram-negativas (SUNDQVIST, 1992). Dentre eles, *Porphyromonas gingivalis* encontra-se comumente associado a lesões sintomáticas periapicais, como abscessos (SUNDQVIST; JOHANSSON; SJOGREN, 1989, JACINTO et al., 2006, FERREIRA et al., 2011). *P. gingivalis* é um dos bacteróides com pigmentação

negra isolado principalmente no sulco gengival, sendo a placa dentobacteriana seu nicho ecológico (VAN WINKELHOFF; VAN STEENBERGEN; DE GRAAFF, 1988). Tem sido associada a quadros patológicos sintomáticos como abscessos tanto de origem endodôntica como periodontal, pericoronarite e complicações pós-exodontia (VAN WINKELHOFF; VAN STEENBERGEN; DE GRAAFF, 1988, JACINTO et al., 2006, FERREIRA et al., 2011). Nas infecções endodônticas, *P. gingivalis* é freqüentemente encontrado em 44% das infecções primárias (DAHLÉN, 1979), sendo ainda relacionado a fístulas de longa duração associadas a lesões periapicais refratárias à terapia endodôntica convencional (JACINTO et al., 2006). *P. gingivalis* é um microrganismo comumente isolado também em bolsa periodontal de pacientes com doença periodontal crônica (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994) e é atualmente considerado o principal patógeno envolvido com este quadro inflamatório (FENG; WEINBERG, 2006). Este microrganismo tem sido descrito como um dos mais patogênicos encontrados na cavidade bucal (MAYRAND; HOLT, 1988). Essa virulência é resultado de moléculas presentes nessas bactérias como fímbrias, cápsulas, hemaglutinina e, em especial, lipopolissacarídeos (LPS) (GOMES et al., 2005).

A estrutura do LPS consiste em um componente anfipático lípide A, que permanece inserido na superfície externa da membrana celular bacteriana e que se encontra covalentemente ligado a uma região polissacarídica. Esta região é subdividida em cadeia lateral (antígeno O) e região do núcleo que, por sua vez, são os responsáveis pelas interações externas. O lípide A representa o padrão molecular conservado do LPS e é o principal indutor das respostas imunológicas a este antígeno (KOGA et al., 1985, PARK et al., 2009). Grande parte do conhecimento que se tem acerca da estrutura da molécula de LPS é concentrada no antígeno derivado da enterobactéria *Escherichia coli* (KOGA et al., 1985). No entanto, estudos mostram que o LPS de *P. gingivalis* apresenta algumas peculiaridades em relação ao de *E. coli*. Koga et al. (1985) relatam a existência de polipeptídeos maiores na molécula de LPS de *P. gingivalis* (PgLPS) quando comparada ao LPS de *E. coli* (EcLPS). Ogawa (1993), demonstrou que PgLPS apresenta atividade endotóxica menor do que EcLPS. Esta atividade tóxica mais branda é atribuída pelos autores a diferenças na estrutura do lípide A desta molécula: ocorre a falta de um dos grupos lipídicos acil ligados por éster em comparação com a molécula de *E. coli*. Sendo assim, enquanto

o lípide A de EcLPS apresenta seis cadeias acil, o de PgLPS apresenta cinco. Além disso, nesta última, as cadeias lipídicas possuem ácidos graxos mais longos do que as enterobactérias (KOGA et al., 1985, OGAWA, 1993, KUMADA et al., 1995). Atualmente, é consagrado na literatura o fato de que a atividade biológica de diferentes moléculas de LPS é altamente variável (BOTERO et al., 2010). Dada a importância do patógeno *P. gingivalis* tanto nas infecções endodônticas como na doença periodontal, o LPS deste microrganismo foi também escolhido para esta investigação. Devido, adicionalmente, à heterogeneidade do LPS desta bactéria com o de *E. coli*, mais amplamente estudado pela literatura, este último também foi utilizado como desafio antigênico.

Há mais de 20 anos, Charles Janeway sugeriu a existência de um mecanismo de reconhecimento relacionado à imunidade inata que seria capaz de identificar estruturas moleculares conservadas expressas por agentes microbianos, mas não por hospedeiros eucarióticos (JANEWAY, 1989). Em 1996, Lemaitre e colaboradores descreveram o papel do receptor Toll na resposta imune a fungos em drosófila (LEMAITRE et al., 1996). Finalmente em 1997, o grupo de Janeway relata a presença em humanos de um grupo de receptores que seria homólogo aos receptores Toll: *Toll-like receptors* (TLRs) (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Atualmente, estes receptores são parte de um grupo denominado receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs), dentre os quais os TLRs são os mais bem caracterizados (BRODSKY; MEDZHITOV, 2007). Os receptores desta família possuem uma organização estrutural semelhante entre si com um domínio de reconhecimento extracelular que consiste de repetições ricas em leucina, um único domínio transmembrana e um domínio de sinalização denominado *Toll/IL-1 receptor* (TIR) (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Até o presente, foram descritos 10 receptores da família TLRs em humanos sendo enumerados de 1 a 10. Esta família desempenha um papel crucial na imunidade inata através do reconhecimento de padrões conservados em diversas moléculas microbianas incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos, flagelina, ácidos nucleicos, dentre outros (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001, AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Estes padrões são denominados hoje de ¹*Microbe-*

¹Terminologia recomendada por Ausubel, F.M. (2005) em substituição à expressão “*Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs)”.

Associated Molecular Patterns (MAMPs) e TLRs os reconhecem nas fases iniciais da resposta imune inata do hospedeiro. Em consequência a este reconhecimento, ocorre a indução da expressão de muitos genes relacionados à resposta imune e inflamatória (HIRAO et al., 2009, PARK et al., 2009).

O reconhecimento de moléculas microbianas por TLR tem sido mais bem compreendido ao longo dos últimos anos. A sinalização intracelular via TLR4 e TLR2 ocorre em consequência da dimerização dos domínios extracelulares dos receptores (JIN et al., 2007, KIM et al., 2007, PARK et al., 2009). A dimerização de TLR4 ocorre em resposta à presença de um ligante agonista, como o LPS de *E. coli*. Este receptor forma um complexo com a molécula MD-2 (*Myeloid Differentiation*) resultando na associação TLR4-MD-2 que é a responsável pelo reconhecimento fisiológico de LPS. Uma vez que este se liga à molécula MD-2, o multímero se compõe de duas cópias do complexo TLR4-MD-2-LPS arranjados de maneira simétrica. A estrutura do LPS contém componentes hidrofílicos e hidrofóbicos que contribuirão com a interação com o receptor. O lípide A de LPS interage diretamente com a molécula MD-2 e sua estrutura resulta na atividade imunológica do antígeno. O número total de cadeias lipídicas é o fator mais importante neste aspecto: lípidos A com seis cadeias, como o LPS de *E. coli*, exercem atividade inflamatória ótima enquanto lípidos A com 5 cadeias são 100 vezes menos ativos e por fim, aqueles com apenas 4 cadeias perdem completamente a atividade agonista (KIM et al., 2007, PARK et al., 2009). Como mencionado anteriormente, o lípide A de LPS de *P. gingivalis* possui uma cadeia lipídica a menos do que o LPS de *E. coli*. (OGAWA, 1993, KUMADA et al., 1995, HASHIMOTO; ASAI; OGAWA, 2004). Em estudo recente de Curtis et al. (2011), foi demonstrada a existência de um mecanismo de remodelação de lípide A de LPS de *P. gingivalis*. Este mecanismo faz com que o lípide A deste LPS tenha sua estrutura modificada com o aumento da temperatura: a 37°C, esta molécula se apresenta tetra-acilada enquanto que a 41°C, a estrutura se apresenta predominantemente penta-acilada. Como demonstrado por Park et al. (2009), as cadeias aciladas do lípide A desempenham papel central na resposta biológica de LPS via TLR4.

Embora o receptor TLR4 tenha recebido intensa atenção devido à sua capacidade de reconhecimento de um antígeno de extrema importância para as ciências da saúde, como é o caso do LPS (HOSHINO et al., 1999, BOTERO et al., 2006, KIM et al., 2007, ZHANG et al., 2008, HIRAO et al., 2009, PARK et al., 2009,

SHIBATA et al., 2011), até o presente momento sabe-se que TLR2 é o receptor capaz de interagir com a maior variedade de ligantes dentre os receptores da família TLR (JIN et al., 2007). Adicionalmente a lipopeptídeos ou lipoproteínas, uma grande variedade de compostos incluindo ácidos lipoteicóicos, lipoarabinomanana e zimosan têm sido descritos como ligantes de complexos envolvendo TLR2 (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001). Este receptor forma dímeros com TLR1 ou TLR6 (BRODSKY; MEDZHITOV, 2007, JIN et al., 2007, INTO et al., 2010). TLR1 e TLR2 são receptores capazes de se ligarem a lipopeptídeos triacilados através de um bolso de ligação a lipídeos formado na face convexa do receptor TLR2. Esta bolsa acomoda duas das três cadeias acil do agonista enquanto um bolso similar em TLR1 acomoda a terceira cadeia (BRODSKY; MEDZHITOV, 2007). Hashimoto, Asai e Ogawa (2004) demonstraram em LPS de *P. gingivalis* a existência de uma lipoproteína triacilada que, segundo os autores, seria o principal componente imunoestimulatório deste LPS ao invés do lípido A. Por constituir um lipopeptídeo triacilado, esta molécula desencadearia respostas celulares por meio de seu reconhecimento por TLR2/TLR1. A dimerização de TLR2 com TLR6 leva ao reconhecimento de lipopeptídeos diacilados, uma vez que TLR6 não possui o bolso de ligação hidrofóbica como TLR1. Sugere-se que TLR6 interaja diretamente com a porção peptídica de lipopeptídeos diacilados ou com a fração glicerofosfato de ácido lipoteicóico. As cadeias hidrofóbicas deste último se ligariam a TLR2 (BRODSKY; MEDZHITOV, 2007).

Resposta inflamatória a bactérias e seus subprodutos é desencadeada pela polpa no processo de cárie (WARFVINGE; DAHLEN; BERGENHOLTZ, 1985, WATTS; PATERSON, 1992), pela gengiva ao longo da gengivite e pelo ligamento periodontal nos quadros de doença periodontal avançada (NAIR et al., 1996) e de infecção dos canais radiculares (FOUAD; ACOSTA, 2001). O estabelecimento destes processos inflamatórios a partir de condições de homeostasia é mediado por TLRs presentes nas células residentes destes tecidos. Dentre a população de células que os compõem, se destacam os fibroblastos por serem, dentre todas, as mais numerosas (CHIEGO JR.; AVERY, 2002, HATAKEYAMA et al., 2003, GOLDBERG; SMITH, 2004).

Fibroblastos constituem o grupo de células mais ubíquo do organismo humano. Eles têm a capacidade de produzir diversos fatores que mantêm a

integridade e a arquitetura de tecidos por meio da síntese de proteínas de matriz extracelular (SMITH et al., 1997, XIE; TSAPRILIS; CHEN, 2005). Em atenção especial aos fibroblastos da cavidade oral, estudos das duas últimas décadas têm mostrado que além de exercer função estrutural, eles são capazes também de reconhecer antígenos via CD14 e TLRs e responder a este reconhecimento com a produção de mediadores inflamatórios (SISMEY-DURRANT; HOPPS, 1991, TAMURA et al., 1992, YAMAJI et al., 1995). A importância destas células nos eventos relacionados à resposta imune vem sendo elucidada pela literatura de maneira cada vez mais sólida. Ainda que se considere o fato de que leucócitos elicitam respostas mais potentes a reconhecimento de antígenos, fibroblastos de gengiva humana, por exemplo, não desencadeiam o desenvolvimento de tolerância a LPS mediante exposição prolongada a este antígeno, como o fazem células do sistema imune (ARA et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado ainda que fibroblastos expressariam constitutivamente HLA-DQ, uma das moléculas de HLA-II (*Human Leucocyte Antigen*) e que a sua ativação seria capaz de levar linfócitos TCD4⁺ a um perfil de polarização Th₂, com produção de Interleucina –(IL)13 e IL-5 predominante sobre IFN- γ (Interferon) (KATO-KOGOE et al., 2010). Estes estudos reforçam a relevância deste grupo de células no estabelecimento de respostas imunes. Além de serem capazes de desencadear respostas por meio do reconhecimento de antígenos, fibroblastos também seriam capazes de sustentar o fenótipo inflamatório mesmo após a remoção dos antígenos microbianos, podendo exercer algum papel importante na manutenção da resposta imune e não apenas no seu estabelecimento (EL-AWADY et al., 2010).

Sismey-Durrant et al. (1991) demonstraram que LPS de *P. gingivalis* era capaz de aumentar os níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) e Interleucina(IL)-1 β em fibroblastos de periósteo de rato e gengiva humana em cultura. Em 1992, Tamura e colaboradores observaram que fibroblastos de gengiva humana estimulados por LPS de *Prevotella intermedia* e de *P. gingivalis* apresentavam níveis de RNA mensageiro (RNAm) para IL-8 aumentados e indução de RNAm para IL-1 α em consequência à adição dos antígenos (TAMURA et al., 1992). A indução da síntese protéica de IL-6 e IL-8 por LPS de *E. coli* e de *P. gingivalis* em fibroblastos de ligamento periodontal humano *in vitro* foi demonstrada por Yamaji et al. (1995). Este estudo é especialmente importante por mostrar que estes antígenos podem

desencadear respostas celulares sutilmente diferentes: LPS de *E. coli*, mas não LPS de *P. gingivalis*, foi capaz de induzir a proliferação dos fibroblastos. A indução do RNAm para IL-6 e IL-8, por outro lado, ocorre a partir de concentrações menores de PgLPS. Quanto à detecção das citocinas no sobrenadante das células, esta relação só se mantém no caso de IL-8, em que se observa um aumento significativo da proteína em todas as concentrações de PgLPS utilizadas (1, 10 e 100 µg/mL), enquanto que fibroblastos só produziram quantidades significativamente maiores de IL-8 por EcLPS a 10 e 100 µg/mL.

A capacidade de fibroblastos de produzirem IL-8 em resposta a antígenos é particularmente importante pelo fato desta citocina exercer atividade quimiotática. Esta característica é comum a um grande grupo de citocinas que devido a esta propriedade foram classificadas como quimiocinas (citocinas quimiotáticas). Tratam-se de polipeptídeos entre 8 e 14 kDa e são classificadas em subfamílias com base no número e posição dos resíduos de cisteína N-terminal (C). As duas maiores subfamílias são a CC (resíduos de cisteína adjacentes) e a CXC (resíduos separados por um aminoácido). Um número menor de quimiocinas é classificado como C (apenas um resíduo de cisteína) ou CX₃C (três aminoácidos separando os resíduos) (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000). As quimiocinas dos grupos CC e CXC são produzidas por leucócitos, células endoteliais, células epiteliais e também por fibroblastos. A produção destas quimiocinas pode ser modulada pelo reconhecimento de antígenos e por outras citocinas como TNF (*Tumor Necrosis Factor*) e IL-1. A produção de quimiocinas constitui um fenômeno essencial à resposta imune, uma vez que o gradiente formado por estas proteínas resulta no recrutamento dos leucócitos para a região onde ocorre a infecção (DIEU et al., 1998, DIEU-NOSJEAN et al., 1999).

Além da indução gênica ou protéica de IL-8/CXCL8 por fibroblastos de gengiva (HATAKEYAMA et al., 2003, HOSOKAWA et al., 2005, MAHANONDA et al., 2007, UEHARA; TAKADA; 2007, ARA et al., 2009, BRUNNER et al., 2010, HIJIYA et al., 2010, TAMAI et al., 2011), ligamento periodontal (YAMAJI et al., 1995, HATAKEYAMA et al., 2003, EL-AWADY et al., 2010, TANG et al. 2011) e polpa dental tanto de dentes permanentes (TOKUDA; NAGAOKA; TORII; 2002, YANG et al., 2003, HIRAO et al., 2009, KELLER et al., 2009) como decíduos (FERREIRA; BRITO; CAVALCANTI, 2009), fibroblastos oriundos de tecidos orais são capazes de

produzir outras quimiocinas. A literatura relata produção de MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein*)/CCL2 por fibroblastos de gengiva (FEDYK et al., 2001, UEHARA; TAKADA; 2007, JONES et al., 2010, SCHERES et al., 2010), ligamento periodontal (JONES et al., 2010, SCHERES et al., 2010) e polpa permanente (STAQUET et al., 2008, HIRAO et al., 2009), o que é importante para o recrutamento de monócitos ao local da lesão (YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Muitas outras quimiocinas têm sido relatadas como resultado de estímulo antigênico a fibroblastos (STAQUET et al., 2008, HIRAO et al., 2009, JONES et al., 2010). Dentre as quimiocinas da família CC, destaca-se MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein*)/CCL3. Esta quimiocina exerce quimiotaxia para monócitos (migração transendotelial), linfócitos B, neutrófilos ativados (BONECCHI et al., 1999) e eosinófilos (MAURER; VON STEBUT, 2004). É capaz de atrair ainda linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ tanto sob fenótipo de memória como *naïve* (SCHALL et al., 1993). A partir de evidências demonstradas pela literatura, constata-se que MIP-1 α /CCL3 desempenha uma função muito importante na indução e modulação da resposta imune participando tanto do processo agudo como crônico da inflamação (MAURER; VON STEBUT, 2004). A produção desta quimiocina por fibroblastos de gengiva humana foi relatada por Botero, Contreras e Parra (2008). Quando submetidos à infecção por citomegalovírus, os fibroblastos exibiram produção aumentada de CCL3 após 24 e 72 h. Recentemente, Jones et al. (2010) demonstraram a indução de RNAm para CCL3 em fibroblastos de gengiva humanos por EcLPS e PgLPS. Enzerink et al. (2009) relatam altas concentrações de CCL3 produzidas por fibroblastos de pele e pulmão quando agrupados em estruturas similares a esferas. Dada a importância que a quimiocina CCL3 exerce nos processos inflamatórios e a escassez de trabalhos que relatam a sua produção por fibroblastos de tecidos orais, este trabalho tem CCL3 como um dos seus alvos.

Outra quimiocina que vem sendo amplamente estudada é SDF-1 (*Stromal-cell Derived Factor*)/CXCL12. Ao contrário de outras quimiocinas, CXCL12 é altamente expressa em condições basais e, portanto, é considerada uma quimiocina constitutiva (FEDYK et al., 2001, KARIN, 2010). Sua atividade quimiotática é exercida sobre linfócitos, monócitos e neutrófilos. Estudos recentes têm sugerido um papel importante de CXCL12 na quimiotaxia de células dendríticas imaturas (RICART et al., 2011) e ainda na proliferação de queratinócitos cutâneos

(FLORIN et al., 2005). Entretanto, o motivo que leva a uma vasta quantidade de estudos em torno de CXCL12 é a capacidade desta quimiocina em recrutar de células tronco CD34⁺ (AIUTI et al., 1997, RATAJCZAK et al., 2003, KARIN, 2010). A produção constitutiva desta quimiocina tem sido relacionada com a formação de nichos onde se podem encontrar células-tronco tecido-específicas (PITUCH-NOWOROLSKA et al., 2003). Devido a relatos de alta produção desta quimiocina em condições basais, ela tem sido freqüentemente relacionada à manutenção da homeostasia tecidual (FEDYK et al., 2001, KARIN, 2010). Contudo, o perfil de expressão de CXCL12 durante processos inflamatórios varia de um estudo para outro. Pablos et al. (1999), relatam discreta produção de CXCL12 em condições de normalidade no tecido conjuntivo cutâneo enquanto Fedyk et al. (2001) demonstram a diminuição da produção desta quimiocina pelo processo inflamatório neste mesmo tecido. Este último estudo relata ainda produções altas de CXCL12 por fibroblastos de pele e gengiva humanos *in vitro* em condições basais. Quando submetidos a tratamento com sobrenadante de monócitos ativados, os fibroblastos sofreram importante inibição da produção de CXCL12. Fenômeno semelhante foi observado por Hosokawa et al. (2005) em cultura de fibroblastos gengivais. O estímulo com LPS de *P. gingivalis* e com a bactéria inativada por calor induziu a diminuição de CXCL12 no sobrenadante dos fibroblastos. No entanto, este mesmo estudo relata a ocorrência do aumento desta quimiocina induzido por TNF- α , IFN- γ , TGF- β (*Tumor Growth Factor*), RANTES (*Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*), MIP-3 α além de EcLPS e CpGDNA (oligodeoxinucleotídeos contendo frações CpG não metiladas). Em polpas dentais inflamadas, estudos relatam aumento da expressão de CXCL12 e seu receptor, CXCR4 (JIANG; LING; GONG, 2008, JIANG et al., 2008). Em estudo prévio do nosso grupo, observamos um discreto aumento de CXCL12 por fibroblastos de polpa dental humana estimulados por *E. faecalis* inativado por calor (SIPERT et al., 2010). Embora sejam contrastantes os resultados acerca da cinética de produção de CXCL12 em processos inflamatórios, é consolidada pela literatura a importância e a robustez de fibroblastos como produtores de CXCL12 tecidual (FEDYK et al., 2001, BOURCIER et al., 2003, RATAJCZAK et al., 2003, FLORIN et al., 2005) e por este motivo, essa quimiocina foi também selecionada como alvo para o presente estudo.

Em consequência a estímulos microbianos, fibroblastos também alteram a taxa de produção de colágeno. A síntese de colágeno, de maneira geral, é acelerada nos processos de reparo (OKIJI; HARGREAVES; GOODIS, 2002, TROWBRIDGE; HARGREAVES; GOODIS, 2002). Mediante a ação de citocinas como IL-1 β , a produção de colágeno se mostrou maior quando da presença desta citocina no sobrenadante tanto por fibroblastos de polpa dental (LERTCHIRAKARN; BIRNER; MESSER, 1998, BARKHORDAR et al., 2002) como de gengiva humanos (BARKHORDAR et al., 2002). Em fibroblastos de polpa, Chan et al. (2005) demonstraram a influência das citocinas TGF- β 1 e TGF- β 2 no aumento da produção de colágeno, provável razão pela qual fibroblastos oriundos de tecidos inflamados depositam colágeno em maior quantidade do que as mesmas células em condições normais (BARKHORDAR et al., 2002). Botero, Contreras e Parra (2008), demonstraram aumento da expressão de RNAm para colágeno tipo I por fibroblastos de gengiva humana infectados com citomegalovírus humano. Em estudo recente com fibroblastos de pulmão murino em cultura; He, Zhu e Jiang (2009) demonstraram o papel da sinalização via TLR4 no aumento da produção de colágeno tipo I induzida por LPS. Por outro lado, Fragiadaki et al. (2011) mostram que em condições de altas concentrações de TGF- β , ocorre importante diminuição da expressão de RNAm para colágeno tipo I por fibroblastos de gengiva. A síntese de colágeno por fibroblastos durante o processo inflamatório é um evento fundamental para o reparo do tecido conjuntivo (CHAN et al., 2005) e por essa razão este foi o terceiro alvo escolhido pelo presente estudo.

A capacidade de fibroblastos em responder a antígenos microbianos se deve ao fato de que estas células expressam membros importantes da família TLR (WANG et al., 2000, MAHANONDA et al., 2007, UEHARA; TAKADA, 2007). Wang et al. (2000) demonstraram que fibroblastos de gengiva expressam TLR4 e este receptor se mostrou funcional quando do estímulo com LPS de *P. gingivalis*. Mahanonda et al. (2007) demonstram que além de TLR4, fibroblastos de gengiva humana expressam TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6 e TLR9. Estes autores mostram ainda que ligantes para TLR2, TLR3, TLR4 e TLR5 levaram à produção de IL-8, mostrando a relevância funcional destes receptores. No mesmo ano, Uehara e Takada reforçam a evidência em torno da expressão de membros desta família como TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9 em fibroblastos de gengiva.

Além destes receptores, este grupo relata ainda a expressão de MD-2 e MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*), moléculas essenciais ao reconhecimento e sinalização via TLR4, respectivamente. A expressão dos receptores de reconhecimento de padrão intracelulares NOD1 e NOD2 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein*) também foi detectada (UEHARA; TAKADA, 2007). Hirao et al. (2009) relataram a expressão e funcionalidade dos receptores TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2 em fibroblastos de polpa dental humana em cultura. Em estudo recente, Into et al. (2010) demonstraram que fibroblastos de gengiva respondem com intensidade inferior a ligantes dos dímeros TLR2/TLR1 [Pam₃CSK₄ – lipopeptídeo sintético triacilado – Pam₃-Cys-Ser(Lys)₄], TLR2/TLR4 [MALP-2 (*macrophage-activating lipopeptide*) e FSL-1 – ambos lipopeptídeos diacilados] do que a LPS de *E. coli*, ligante do complexo TLR4-MD-2, quando avaliada a produção de IL-6 e IL-8. Utilizando como antígeno lípido A de *E. coli*, Tamai, Sugiyama e Kiyoura (2011) demonstraram o aumento da produção de IL-6, IL-8 e da ativação do fator de transcrição NF-κB (*Nuclear Factor*) por fibroblastos de gengiva humana. Tang et al. (2011) demonstraram a expressão e funcionalidade de TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2 por fibroblastos de ligamento periodontal. Além da produção de IL-1β, IL-6 e IL-8 induzida pelos agonistas destes receptores, os autores demonstraram ainda o aumento da expressão do RNAm para uma das moléculas envolvidas com a sinalização de TLRs: TRAF6 (*Tumor necrosis factor associated-Receptor Factor*).

Um aspecto importante acerca da resposta de fibroblastos a antígenos consiste no perfil diferencial que assumem estas células quando originadas de tecidos distintos. A expressão de receptores TLR e CD14 (*Cluster of Differentiation 14* – receptor auxiliar no reconhecimento de LPS por TLR4-MD-2) por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal humano dos mesmos doadores foi demonstrado por Hatakeyama et al. (2003). Neste estudo, os autores relatam maior expressão de CD14 em fibroblastos originados de gengiva. Ao contrário, a expressão de TLR2 e MD-2 foi mais significativa por fibroblastos de ligamento periodontal. A expressão de IL-8/CXCL8 por estas células também se mostrou diferenciada: fibroblastos de gengiva produziram quantidades maiores de IL-8 em comparação aos de ligamento periodontal quando ambos eram estimulados com LPS de *Salmonella enterica*. O bloqueio dos receptores CD14 e TLR4 foi mais importante para a diminuição da

produção de IL-8 induzida por LPS nas células de gengiva do que nas de ligamento periodontal. Ghosh et al. (2008), demonstraram que fibroblastos de ligamento periodontal se mostraram capazes de produzir quantidades significativamente maiores do mediador pró-inflamatório óxido nítrico (NO) em resposta ao desafio com *P. gingivalis*, *E. coli* e *Streptococcus mutans* viáveis quando comparados a fibroblastos de gengiva. Em estudos recentes do nosso grupo, foi demonstrado que fibroblastos de gengiva humana produzem quantidades maiores de IL-6 e TGF- β do que as mesmas células originadas de ligamento periodontal (MORANDINI et al., 2010, MORANDINI et al., 2011). Estes dados em conjunto corroboram os achados de Brouty-Boye et al. (2000). Quantidades variáveis de quimiocinas foram quantificadas por ELISA no sobrenadante de fibroblastos de tecido hematopoiético, mama e pulmão; tanto originados de tecidos saudáveis como de tecidos patológicos. Eotaxina/CCL11 foi mais produzida por células de tecido hematopoiético patológico, enquanto RANTES/CCL5 e MIP-1 α /CCL3 o foram por tecido hematopoiético saudável. CXCL8 foi produzida por todas as linhagens, exceto pelas oriundas de pulmão, o qual originou células capazes de produzirem de maneira expressiva apenas MCP-1 se originadas de tecido normal. Kamata et al. (2004) relataram a imortalização de linhagens de fibroblastos originados de papila dental, polpa dental, ligamento periodontal e gengiva humanos. Neste estudo, os autores mostraram formação de matriz extracelular mineralizada muito mais significativa para fibroblastos de papila dental do que aquela produzida pelas demais linhagens, com ligamento periodontal e gengiva exercendo os valores menores de atividade de fosfatase alcalina. Sendo assim, embora presentes em tecidos ao longo de todo o organismo humano, atualmente evidências inequívocas apontam para o fato de que fibroblastos não constituem um grupo único de células e o seu fenótipo e características funcionais dependem diretamente do sítio anatômico de onde são originados (BROUTY-BOYE et al., 2000).

Estudos dos últimos anos têm mostrado evidências cada vez mais fortes a respeito da importância de um grupo de moléculas diretamente envolvido com os fenômenos de síntese protéica e sua especificidade nos diferentes órgãos do organismo humano: os microRNAs (SONKOLY; STAHL; PIVARCSI, 2008, O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011, QUINN; O'NEILL, 2011). MicroRNAs (miRNAs, miRs) consistem de nucleotídeos pequenos (18-25 pares de base) que pertencem à

chamada família de RNAs não codificadores de proteína (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). A maioria dos *loci* de microRNAs humanos está localizada no meio de regiões intrônicas entre regiões codificadoras ou não e são transcritos em paralelo com outros transcritos (PAULEY; CHAN, 2008). MiRNAs se ligam às regiões 3' não traduzidas (3'-UTR) de genes-alvo específicos e regulam a expressão destes promovendo sua degradação ou inibindo o processo de tradução (BARTEL, 2004). Assim, os microRNAs promovem a chamada regulação fina da expressão gênica de maneira rápida e precisa (MALLICK; CHAKRABARTI; GHOSH, 2011). Cada microRNA possui diversos RNAm-alvo, assim como cada RNAm é regulado por diversos microRNAs (SONKOLY; STAHLER; PIVARCSI, 2008). Considerando isso, estima-se que estas moléculas sejam capazes de regular até 30% dos genes codificadores de proteína dentro do genoma humano, destacando então sua importância como reguladores de expressão gênica (BEREZIKOV et al., 2006, BENTWICH, 2008). Até o presente, já foram descritas 1.424 seqüências de microRNAs humanos (GRIFFITHS-JONES, 2004).

A expressão de microRNAs pode ser regulada de forma dinâmica em resposta a estímulos inflamatórios e imunológicos (SHEEDY; O'NEILL, 2008). Diversos ligantes de TLRs bem como outros estímulos inflamatórios são capazes de regular a expressão de alguns microRNAs. LPS pode induzir o aumento da expressão de miR-25, miR-27b, miR-100, miR-140, miR-142-3p, miR-181c, miR-187, miR-194, miR-214, miR-223, miR-224. MiR-146 foi relacionado à regulação negativa de moléculas de sinalização intracelular por TLR por diminuir os níveis de IRAK-1 (*Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-1*) e TRAF-6 (TAGANOV et al., 2006) em fibroblastos de articulações com artrite reumatóide. MicroRNAs são considerados moléculas essenciais ao controle pós-transcricional da expressão gênica (SHEEDY; O'NEILL, 2008). MiR-155 e miR-132 também têm sido relacionados à resposta imune inata a infecção bacteriana (PAULEY; CHAN, 2008). Chen et al. (2007) demonstraram correlação negativa entre a expressão de let-7i com TLR4 em colangiócitos. A expressão deste microRNA foi diminuída quando do estímulo com LPS, levando ao aumento da expressão de TLR4. Em estudo recente, Nahid et al. (2011) demonstraram o aumento da expressão de miR-146a em doença periodontal polimicrobiana induzida por *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. As evidências apontam hoje para um papel importante de microRNAs na regulação

final da resposta imune inata por TLRs (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011). MicroRNAs também parecem sofrer um perfil de expressão que varia de um órgão para outro bem como em determinados quadros patológicos (SONKOLY; STAHL; PIVARCSI, 2008). Pelo crescente avanço nos estudos envolvendo microRNAs, resposta imune e especificidade tecidual, estas moléculas também foram alvo da presente investigação.

Os processos inflamatórios comumente encontrados na cavidade oral são objeto de intenso estudo pela odontologia. A microbiota bacteriana é conhecida por ser um agente etiológico comum a estes processos. Polpa, gengiva e ligamento periodontal são alguns dos tecidos conjuntivos que respondem aos microrganismos da cavidade oral e compartilham um mesmo grupo de células residentes, os fibroblastos, que apresentam fundamental importância na manutenção da estrutura dos tecidos e ainda participam de forma ativa na articulação da resposta imune inata a microrganismos. Apesar de constituírem um grupo celular presente em todo o organismo humano, fibroblastos diferem quanto à resposta a antígenos microbianos. Apesar da grande quantidade de estudos que têm estas células como seu foco central, com base no levantamento bibliográfico realizado, ainda são poucos os trabalhos que visam demonstrar as diferenças entre fibroblastos de tecidos orais. Assim sendo, este estudo procurou demonstrar eventuais diferenças quanto à expressão de microRNAs, produção de colágeno tipo I e principalmente de quimiocinas entre fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental tanto de dentes permanentes como decíduos.

2 Proposição

2 Proposição

2.1 – Objetivo geral

Investigar se fibroblastos originados de diferentes tecidos orais humanos apresentam comportamento diferencial frente a antígenos bacterianos comumente encontrados na cavidade oral.

2.2 – Objetivos específicos

1. Avaliar a produção das quimiocinas CCL3 e CXCL12 por fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental de dentes permanentes e decíduos estimulados com ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* e lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*.

2. Analisar comparativamente a produção destas quimiocinas em células de mesma origem tecidual quanto à resposta frente aos diferentes estímulos.

3. Analisar comparativamente a produção destas quimiocinas entre células de origem tecidual distinta frente ao mesmo estímulo.

4. Avaliar a produção de pró-colágeno tipo I por fibroblastos de polpa dental permanente e decídua frente ao desafio antigênico com LTA de *E. faecalis* e LPS de *P. gingivalis*.

5. Investigar a produção diferencial de microRNAs entre células de origem tecidual distinta.

3 Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 – Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos

Dentes recentemente extraídos (terceiros molares hígidos) e fragmentos de gengivas saudáveis (gengiva inserida a estes mesmos dentes) de 3 (três) pacientes adultos livres de doenças sistêmicas foram obtidos no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia e Clínica (LAFFIC) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Caninos decíduos de 2 (dois) pacientes com indicação para extração seriada foram obtidos na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru. A doação dos dentes e a autorização para remoção de gengiva foram feitos pelos mesmos ou seus responsáveis em formulário específico devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP (Processo nº 15/2007). Os espécimes foram transportados em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) até o laboratório de cultura de células. Sob condições assépticas, os dentes tiveram primeiramente o tecido gengival removido, o qual foi descartado, e o ligamento periodontal foi obtido por meio de raspagem do tecido na região interna da furca (terço médio da raiz), evitando assim eventual contaminação com tecido gengival ou pulpar. Após obtenção de ligamento periodontal para cultura, todo o restante de tecido aderido foi removido e um sulco transversal na região da junção amelocementária foi feito com o auxílio de uma ponta diamantada cilíndrica em alta rotação (SSWhite, Lakewood, NJ, EUA) em toda a circunferência do dente. Em seguida, o dente foi fraturado e aberto, removendo-se assim sua polpa. Os fragmentos de gengiva do mesmo paciente foram armazenados e transportados em DMEM. Também sob condições assépticas, as gengivas foram lavadas vigorosamente com meio de cultura para remoção de sangue presente nos espécimes. Para os dentes decíduos, o tecido pulpar foi removido através do ápice com o auxílio de limas endodônticas (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Os tecidos coletados foram fragmentados até que se conseguissem espécimes de 1 mm de espessura aproximadamente. Após a fragmentação, seguiu-se uma centrifugação de 200 x *g*/5 min/temperatura ambiente (TA) e os fragmentos foram ressuspensos e colocados em frascos para cultura de 25 cm² imersos em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 µg/mL de penicilina,

100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (todos os reagentes provenientes de Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. As culturas foram mantidas neste primeiro frasco até os fibroblastos alcançarem confluência com trocas de meio a cada 2-3 dias. Após confluência, os fibroblastos foram repicados e este procedimento se repetiu conforme a proliferação das células. A utilização de fibroblastos para os ensaios ocorreu a partir da 4ª passagem. Foram seguidos os protocolos para a cultura dos fibroblastos conforme já estabelecido no laboratório da Prof^a Dr^a Sandra Helena Penha de Oliveira (Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP) e reproduzido pelo nosso grupo (MORANDINI et al., 2010, SIPERT et al., 2010, MORANDINI et al., 2011).

3.2 – Ensaio de Lisado de Amebócito de Limulus (LAL)

Para detecção e quantificação de endotoxinas contaminantes possivelmente presentes no LTA de *E. faecalis* adquirido comercialmente, foi utilizado o ensaio de Lisado de Amebócito de Limulus (LAL) (DURAND et al., 2006). Para tanto, 50 µL de solução de LAL com sensibilidade de detecção de 0,125 UE (Unidade de Endotoxina) (Gel Clot LAL, Cambrex Bio Sciences, Walkersville, EUA) foram incubados com o mesmo volume de LTA diluído em água apirogênica partindo da concentração de 1 µg/mL em diluições seriadas de 1/2. Esta incubação foi feita a 37°C por 60 min. Amostras eram consideradas positivas quando foi observada a formação de um coágulo no interior do tubo de ensaio, sendo este resistente ao escoamento quando os tubos de ensaio eram invertidos. Controles positivos (endotoxina padrão) diluídos de maneira igual e controles negativos (água apirogênica somente) também foram submetidos ao teste. O ensaio foi feito em duplicata.

3.3 – Estimulação dos Fibroblastos

Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 células por poço e deixados para aderirem por 18 h. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura (1 mL) contendo ácido lipoteicoico (LTA) de *Enterococcus faecalis* (EfLTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (EcLPS)

(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) ou LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Invivogen, San Diego, CA, EUA) nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/mL foi adicionado aos poços em duplicata. Ao grupo controle era adicionado meio somente. Após 1, 6 e 24 h, o sobrenadante das células foi coletado, centrifugado a 500 x g/10 min/4°C e armazenado a -80°C. O RNA total foi coletado por meio do uso de 1 mL de Trizol[®] sobre ambas duplicatas.

Fibroblastos de polpa de dente permanente e decíduo foram também semeados em duplicata sobre lamínulas estéreis e estimulados por PgLPS e EfLTA nas mesmas condições experimentais descritas acima. Transcorridos os períodos de 1, 6 e 24 h; as lamínulas foram removidas e as células pré-fixadas em solução de acetona e congeladas a -20°C para os ensaios de imunofluorescência.

3.4 – Detecção de CCL3 e CXCL12 por ELISA

A detecção das quimiocinas no sobrenadante das células foi feita por meio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas durante 15-18 h em TA, com anticorpos anti-MIP-1α (Anti-human CCL3/MIP-1α Antibody – AF-270-NA – R&D Systems, Minneapolis, EUA) ou anti-SDF-1 (Monoclonal Anti-human/mouse CXCL12/SDF-1 Antibody – MAB 350 – R&D Systems, Minneapolis, EUA) diluídos em PBS (*Phosphate Buffered Saline* – Solução salina tamponada por fosfato). Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, contendo Tween 20 0,05% e bloqueadas durante 2 h, em temperatura ambiente, com PBS contendo soroalbumina bovina (PBS BSA) (Sigma-Aldrich) 1%. As placas, então, foram lavadas com PBS Tween e incubadas com quantidades conhecidas de MIP-1α/CCL3 ou SDF-1/CXCL12 recombinantes (R&D Systems: MIP-1α - 270-LD-010; SDF-1α - 350-NS, Minneapolis, EUA) (curvas-padrão) durante 2 h em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo biotinilado (Biotinylated Anti-human CCL3/MIP-1α Antibody – BAF 270 - R&D Systems; Biotinylated Anti-human CXCL12/SDF-1 Antibody – BAF 310 – R&D Systems, Minneapolis) por 2 h em temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi realizada a incubação da enzima estreptavidina por 20 min (Becton, Dickinson & Co. – BD – Franklin Lakes, NJ, EUA) na proporção de 1:250 em PBS BSA 1%. As placas foram lavadas novamente e o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina na proporção de 1:1) (BD)

adicionado conforme as instruções do fabricante. Após 30 min, a solução de paralisação da reação (ácido sulfúrico 4N) foi adicionada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm (Bio-Rad, .Hercules, CA, EUA).

3.5 – Avaliação da expressão gênica de CCL3 e CXCL12

Após o estímulo feito por LPS de *E. coli* no período experimental de 24 h, a expressão de RNAm de CCL3 (MIP-1 α) e CXCL12 (SDF-1 α) foi avaliada por transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa.

3.5.1 – Extração de RNA total

A extração de RNA total foi feita pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio conforme descrito na literatura e reproduzido pelo nosso grupo (MORANDINI et al., 2010, SILVA et al., 2010). Os fibroblastos foram homogeneizados em Trizol[®] (Invitrogen, Life Technologies) e congelados a -80°C. Após descongelamento, as amostras foram incubadas por 5 min em TA. Um volume de 30% de clorofórmio foi adicionado e os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso em TA por 5 min, sendo em seguida centrifugados a 13000 x g/15 min/4°C. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 300 μ L em tubos de microcentrífuga contendo 600 μ L de isopropanol e 20 μ L de glicogênio de ostra (Applied Biosystems, Life Technologies). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso em TA por 10 min. Após centrifugação a 13000 x g/10 min/4°C, foi descartado o sobrenadante e 1 mL de etanol 75% [em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%] foi adicionado e os tubos foram agitados vigorosamente. Nova centrifugação foi realizada a 8000 x g/5 min/4°C, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se outra centrifugação com 0,5mL de etanol 100% a 8000 x g/10 min/4°C. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram deixadas em TA até secarem. A ressuspensão do RNA total foi realizada com 15 μ L de água DEPC 0,1% e armazenadas a -80°C.

3.5.2 – Quantificação do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro aplicando-se 1 μL de cada amostra num dispositivo Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Foram consideradas as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm. A concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/ μL .

3.5.3 – Transcrição reversa

A transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA foi realizada por meio do kit comercial Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a quantidade de RNA total de partida foi definida com base no volume máximo de amostra recomendado pelo fabricante (12 μL) multiplicado pela concentração da amostra que obteve menor rendimento. Com base neste cálculo, 678,6 ng de RNA total foram diluídos em quantidade suficiente de água para 12 μL e 2 μL de *gDNAse Wipeout Buffer* foram adicionados a cada amostra. Seguiu-se uma incubação de 42°C por 2 min. Em seguida, 1 μL da enzima transcriptase reversa, 4 μL de tampão e 1 μL de RT primer foram adicionados por amostra e uma nova incubação foi realizada a 42°C por 30 min seguida de 95°C por 3 min num volume final de reação de 20 μL .

3.5.4 - PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para CXCL12 e CCL3 foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho ViiA7 (Applied Biosystems, Life Technologies). Para esta reação, foram utilizados primers e sonda inventoriados disponibilizados pela mesma empresa: CXCL12 (Cat.: Hs0017022_m1) e CCL3 (Hs00234142_m1). Paralelamente, também foi realizada a amplificação do gene para RPL13A como gene constitutivo. A sequência de primers e sonda utilizados para amplificação de RPL13A humano foram: F: 5'-CCGCTCTGGACCGTCTCAA-3', R: CCTGGTACTTCCAGCCAACCT e Sonda: 5'-(VIC)-TGACGGCATCCCACCGCCCT-(TAMRA)-3' (Palmqvist et al., 2008). Alíquotas de 0,5 μL do DNA complementar sintetizado a partir do RNAm foram utilizadas

juntamente com reagentes *Taqman*[®] *Gene Expression Mastermix* (Applied Biosystems, Life Technologies), primers e sondas como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 5 µL. A reação de amplificação compreende 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C, conforme recomendado pela empresa. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação a um controle interno (RPL13A), e então comparados com um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas, obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.6 – Detecção da produção de pró-colágeno tipo I por imunofluorescência

Para a realização deste ensaio, células foram semeadas sobre lamínulas circulares (20 mm de diâmetro) e após os tempos experimentais de 1, 6 e 24 h, as lamínulas foram removidas dos poços e pré-fixadas em acetona e armazenadas a -20°C. No momento da marcação, as células foram fixadas com acetona por 2 min e em seguida, lavadas com PBS. As lamínulas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com PBS soro de coelho para o bloqueio de ligações inespecíficas. O anticorpo anti-pró-colágeno tipo I (sc-25973 - Santa Cruz Biotech., Califórnia, EUA) foi incubado a uma diluição de 1:100 em PBS por 18 h a 4°C. Após nova lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo anti-goat IgG conjugado a fluoresceína (FITC anti-goat IgG FI5000 – Vector Labs., Califórnia, EUA) na diluição de 1:200. Em seguida, as células foram montadas em lâminas para microscopia imersas em meio de montagem contendo DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) (H-1200 - Vector Labs, Califórnia, EUA).

A análise e captura das imagens foram realizadas em microscópio confocal invertido Leica TCS-SPE (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). A quantificação da intensidade de fluorescência para pró-colágeno foi realizada utilizando-se o programa Image J (*National Institutes of Health*, EUA).

3.7 – Ensaio de micro-arranjo para análise da expressão de microRNAs

Para a realização deste ensaio, os fibroblastos foram estimulados com meio somente ou contendo EcLPS a 10 µg/mL por 24 h. Após este período, o RNA total das células foi obtido através de Trizol[®] seguindo-se o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Após a quantificação do RNA total nas amostras e utilizando o kit comercial *NCode miRNA rapid labeling system* (Cat. MIRLSRPD-20, Invitrogen), os microRNAs foram marcados com o corante Alexa Fluor Cy3, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram incubadas para hibridização em lâminas para ensaio de micro-arranjo para a obtenção de painel de expressão de miRNAs (NCode Multi-Species miRNA microarray kit V2, Invitrogen). Após 18 h, as lâminas foram lavadas em concentrações decrescentes de uma solução 0,3 M de citrato trissódico e 3 M de cloreto de sódio (SSC) seguindo orientações do fabricante. Após secagem por meio de centrifugação, as lâminas tiveram suas imagens capturadas pelo seletor eletrônico GenePix 400B *Scanner* (Motorola, USA). Para a análise dos resultados, os dados codificados em arquivos “gpr” foram importados para o programa JMP Genomics[®] 4.0 (Cary, NC, EUA) no qual foi feita a análise comparativa da expressão dos microRNAs. A projeção de microRNAs candidatos à interação com o RNAm para CCL3, CXCL12 e Colágeno I foi feita por meio do programa Target Scan Human (www.targetscan.org). Estes experimentos foram realizados na *Harvard Medical School – Laboratory for Innovative Translational Technologies* sob supervisão do Dr. Winston Patrick Kuo, com apoio financeiro da FAPESP (reserva técnica de bola de doutorado, processo 2007/00306-1).

3.8 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.0. Para análise dos ensaios de ELISA, PCR, Imunofluorescência e Micro-arranjo, foi utilizado o teste ANOVA a um critério com pós-teste de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5%.

4 Resultados

4 Resultados

4.1 – Cultura dos fibroblastos

A Figura 1 ilustra fotografias de cultura primária de fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa permanente e polpa decídua humanos.

Figura 1: Fibroblastos de gengiva (A), ligamento periodontal (B), polpa dental permanente (C) e polpa dental decídua (D) humanos. Cultura primária de fibroblastos foi estabelecida por meio de uma técnica de *explant*. Imagens capturadas em microscópio invertido com contraste de fases com aumento de 100x.

4.2 – Ensaio do Lisado de Amebócito de Limulus (LAL)

Conforme relatos da literatura (Durand et al., 2006, Keller et al., 2009), é muito freqüente a ocorrência de contaminação de amostras de ácido lipoteicóico com LPS e assim sendo, julgamos conveniente quantificar o LPS presente nas alíquotas de LTA de *Enterococcus faecalis* adquiridas comercialmente. Os resultados deste ensaio indicam que, para cada 1 µg de LTA de *E. faecalis*, foi detectada a presença de 0,25 UE, o que, de acordo com informações fornecidas pelo fabricante, corresponderia a 0,05 ng de endotoxina contaminante.

4.3 – Produção de MIP-1α/CCL3 por ELISA

A produção de CCL3 pelas células em cultura foi detectada por ELISA a partir da análise do sobrenadante após estímulo. Fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa permanente e polpa decídua humanos foram estimulados com concentrações crescentes de LTA de *Enterococcus faecalis* (EfLTA), LPS de *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) e LPS de *Escherichia coli* (EcLPS) por 1, 6 e 24 h. Os dados obtidos em pg/mL estão ilustrados nas Figuras 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

Estes resultados mostram aumento da produção de CCL3 pelas células estudadas, porém de maneira distinta de acordo com o tecido de origem e com o estímulo empregado.

Figura 2: Produção *in vitro* de CCL3/MIP-1 α por fibroblastos de gengiva humana estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos de 3 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 3: Produção *in vitro* de CCL3/MIP-1 α por fibroblastos de ligamento periodontal humano estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos de 3 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 4: Produção *in vitro* de CCL3/MIP-1 α por fibroblastos de polpa de dente permanente humano estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos de 3 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 5: Produção *in vitro* de CCL3/MIP-1 α por fibroblastos de polpa de dente decíduo humano estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos de 2 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

4.4 – Produção de SDF-1/CXCL12 por ELISA

A produção de CXCL12 pelas células em cultura foi detectada por ELISA a partir da análise do sobrenadante após estímulo. Fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa permanente e polpa decídua humanos foram estimulados com concentrações crescentes de LTA de *Enterococcus faecalis* (EfLTA), LPS de *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) e LPS de *Escherichia coli* (EcLPS) por 1, 6 e 24 h. Os dados obtidos em pg/mL estão ilustrados nas Figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

Os fibroblastos analisados neste estudo apresentaram altas concentrações de CXCL12 em estado basal e variações dependendo da origem tecidual das células e do antígeno utilizado puderam ser observadas.

Figura 6: Produção *in vitro* de CXCL12/SDF-1 por fibroblastos de gengiva humana estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos da média e erro padrão de 3 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 7: Produção *in vitro* de CXCL12/SDF-1 por fibroblastos de ligamento periodontal humano estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos da média e erro padrão de 3 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 8: Produção *in vitro* de CXCL12/SDF-1 por fibroblastos de polpa de dente permanente humano estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos da média e erro padrão de 3 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 9: Produção *in vitro* de CXCL12/SDF-1 por fibroblastos de polpa de dente decíduo humano estimulados por (A) LTA de *E. faecalis*, (B) LPS de *P. gingivalis* e (C) LPS de *E. coli* nas concentrações indicadas ou com meio somente (0). Resultados representativos da média e erro padrão de 2 doadores com ensaios em duplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por (*) quando $p < 0,05$, (**) quando $p < 0,01$ e (***) quando $p < 0,001$ em comparação com o grupo não estimulado (0). Diferenças observadas no grupo de mesma concentração de antígeno representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

4.5 – Estudo da expressão do RNAm para CCL3 e CXCL12

O estudo da expressão gênica das quimiocinas pelos fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa permanente e polpa decídua foi realizado por transcrição reversa seguida de PCR quantitativo para amostras de células estimuladas com LPS de *E. coli* na concentração de 0-10 µg/mL no tempo experimental de 24 h.

A partir de um ensaio de amplificação de uma diluição seriada (1/2) de uma amostra elaborada a partir de alíquotas iguais do conjunto de todas as amostras (*pool*), foi possível observar a amplificação do gene de referência RPL13 e do gene para CXCL12. Não foi possível observar quaisquer sinais de amplificação de CCL3 neste conjunto de amostras. Sendo assim, pode-se sugerir que no tempo experimental testado (24 h), não foi detectada a expressão gênica de CCL3.

Em sequência, a amplificação de CXCL12 foi avaliada e normalizada pelo gene de referência RPL13. A Figura 10 ilustra a expressão do gene da quimiocina em relação a uma amostra do grupo controle (não estimulado).

Figura 10: Expressão do RNAm para CXCL12 por fibroblastos de gengiva (A) (n=3), ligamento periodontal (B) (n=3), polpa de dentes permanentes (C) (n=3) dos mesmos doadores e polpa de dentes decíduos (D) (n=2) em cultura estimulados por concentrações crescentes de LPS de *E. coli* por 24 h. Dados representativos de 3 experimentos em duplicata. Valores da expressão de CXCL12 normalizados pelo gene de referência RPL13A. Valores representativos das médias e erros padrão.

4.6 – Estudo da expressão de pró-colágeno tipo I por imunofluorescência

Para a avaliação da produção diferencial de pró-colágeno tipo I por fibroblastos de polpa de dente permanente e decíduo submetidos a desafio antigênico com LTA de *Enterococcus faecalis* e LPS de *Porphyromonas gingivalis*, foi utilizada a técnica de imunofluorescência. A Figura 11 ilustra imagens representativas deste ensaio, enquanto as Figuras 12 e 13 ilustram as diferenças quantitativas na síntese desta proteína em consequência aos estímulos com os antígenos.

Figura 11: Marcação para pró-colágeno tipo I em fibroblastos de polpa dental humana (dente permanente e dente decíduo) por imunofluorescência. A: polpa permanente controle 24 h, B: polpa permanente PgLPS 1μg/mL 24 h, C: polpa permanente (controle negativo), D: polpa decídua controle 1h, E: polpa decídua PgLPS 1μg/mL e F: polpa decídua controle negativo. Imagens capturadas em microscópio invertido confocal. Barras representativas de 20 μm.

Figura 12: Produção de pró-colágeno tipo I por fibroblastos de polpa de dente permanente humano em cultura (n=1) estimulados por LTA de *E. faecalis* (painel superior) e por LPS de *P. gingivalis* (painel inferior) pelas concentrações e tempos indicados. Valores expressos em porcentagem de produção em relação ao controle (não estimulado). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle representadas por (*) para $p < 0,05$, (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$. Valores representativos das médias e erros padrão.

Figura 13: Produção de pró-colágeno tipo I por fibroblastos de polpa de dente decíduo humano em cultura (n=1) estimulados por LTA de *E. faecalis* (painel superior) e por LPS de *P. gingivalis* (painel inferior) pelas concentrações e tempos indicados. Valores expressos em percentagem de produção em relação ao controle (não estimulado). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle representadas por (*) para $p < 0,05$, (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$. Valores representativos das médias e erros padrão.

4.7 – Estudo da expressão de microRNAs por ensaio de micro-arranjo

Para a melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos com o comportamento diferencial das células utilizadas neste estudo frente à produção de quimiocinas, foi realizado um ensaio de micro-arranjo para o estudo da expressão de microRNAs. A Figura 14 ilustra imagens representativas do gráfico de agrupamento hierárquico gerado pela análise global dos resultados de micro-arranjo.

Figura 14: Heat map da análise global de amostras de fibroblastos de estruturas orais quanto à expressão de microRNAs por microarranjo. Amostras coletadas após 24 h de incubação com meio somente (DMEM) ou com LPS de *E. coli* na concentração de 10 µg/mL. s1 e s3: decíduos DMEM, s2, s4 e s6: decíduos LPS; s7: polpa permanente DMEM; s8 e s14: polpa permanente LPS; s9 e s15: gengiva DMEM; s10: gengiva LPS; s11: ligamento periodontal DMEM; s12 e s18: ligamento periodontal LPS. A coloração em vermelho indica aumento de expressão.

A análise detalhada da expressão dos microRNAs permitiu a montagem de um gráfico de agrupamento hierárquico de onde podemos destacar microRNAs que teriam complementaridade com os genes para CXCL12, CCL3 e pró-colágeno I por meio de análise computacional, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Análise de microRNAs expressos em condições basais (meio somente) por fibroblastos de polpa, gengiva e ligamento periodontal de um mesmo indivíduo. Dados obtidos a partir de agrupamento hierárquico gerado pelo software JMP genomics®.

Gene alvo	microRNA	Células que apresentaram expressão
CXCL12	miR-141	Polpa
	miR-200a	Gengiva e Ligamento periodontal
CCL3	miR-296	Gengiva
	miR-370	Gengiva
	miR-484	Ligamento periodontal
	miR-24	Polpa
	let-7b	Gengiva e Ligamento periodontal
	let-7i	Gengiva e Polpa
	let-7a	Gengiva e Ligamento periodontal
	let-7c	Todas
	miR-98	Gengiva
	let-7f	Gengiva e Ligamento periodontal
	let-7g	nenhuma
	let-7e	Polpa e Gengiva
	let-7d	Gengiva
	miR-182	Gengiva e Ligamento periodontal
	miR-96	Polpa e Gengiva
	miR-644	Gengiva
	miR-128a	Gengiva
	miR-128b	Gengiva
	miR-603	Ligamento periodontal
	miR-189	Gengiva
	miR-9	Gengiva
	miR-622	Polpa
Pró-colágeno I	miR-223	Gengiva e Ligamento periodontal
	miR-92	Gengiva e Ligamento periodontal
	miR-367	Gengiva
	miR-32	Polpa e Gengiva
	miR-25	Polpa e Gengiva
	miR-92	Gengiva e Ligamento periodontal
	miR-196a	Gengiva
	miR-196b	todas

A análise dos dados de microarranjo também nos permitiram verificar diferenças na expressão de microRNAs envolvidos com resposta imune inata, conforme relatos prévios da literatura (PAULEY; CHAN, 2008, NAHID et al., 2011, O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011, QUINN; O'NEILL, 2011).

Tabela 2: Análise da expressão de lmunomiRs por fibroblastos de tecidos orais humanos a partir de um gráfico de agrupamento hierárquico gerado pelo software JMP genomics (fibroblastos de um mesmo indivíduo e de polpa de dente decíduo).

microRNA	Células que apresentaram expressão
miR-146a	Gengiva (meio e LPS)
	Ligamento Periodontal (LPS)
	Polpa de Dente Permanente (meio e LPS)
	Polpa de Dente Decíduo (meio)
let-7i	Gengiva (meio e LPS)
	Ligamento Periodontal (LPS)
	Polpa de Dente Permanente (meio e LPS)
miR-155	Gengiva (meio e LPS)
	Ligamento Periodontal (meio)
	Polpa de Dente Permanente (meio e LPS)
	Polpa de Dente Decíduo (LPS)
miR-21	Gengiva (meio)
	Ligamento Periodontal (LPS)
	Polpa de Dente Permanente (meio)

5 Discussão

5 Discussão

A heterogeneidade de fibroblastos quanto à produção de citocinas já vem sendo demonstrada pela literatura desde o trabalho de Brouty-Boyé et al. (2000). Os estudos que investigaram células originadas de diferentes tecidos de um mesmo paciente reforçam a hipótese de que fibroblastos não constituem um grupo único de células, mesmo estando presentes ao longo do organismo como um todo e mesmo nos tecidos de curta proximidade, como é o caso de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental (HATAKEYAMA et al., 2003, SCHERES et al., 2010). Os resultados obtidos por este estudo corroboram a hipótese de que fibroblastos constituem um grupo heterogêneo de células e isso pode ser observado nos tecidos orais envolvidos.

A relevância de fibroblastos em eventos relacionados à resposta imune vem sendo demonstrada pela literatura ao longo dos últimos anos e esses dados parecem assumir importância cada vez maior, uma vez que se sabe que estas células expressam receptores relacionados ao reconhecimento de antígenos como a família de Receptores do Tipo Toll (TLRs) e NODs (HATAKEYAMA et al., 2003, MAHANONDA et al., 2007, UEHARA; TAKADA, 2007, STAQUET et al., 2008, HIRAO et al., 2009). Especula-se ainda que fibroblastos poderiam exercer algum papel na polarização Th₂ de resposta imune adaptativa por meio da expressão e ativação de receptores HLA-II (KATO-KOGOE et al., 2010). Como resultado ao reconhecimento de antígenos e aos eventos de sinalização intracelular desencadeados por este processo, uma gama de mediadores pró-inflamatórios (SISMEY-DURRANT; HOPPS, 1991, YANG et al., 2004, GUTIERREZ-VENEGAS et al., 2005, GHOSH et al., 2008, SIPERT et al., 2010), citocinas (SISMEY-DURRANT; HOPPS, 1991, WANG et al., 1999, WANG et al., 2000, TOKUDA; NAGAOKA; TORII, 2002, YANG et al., 2003, COIL; TAM; WATERFIELD, 2004, UEHARA; TAKADA, 2007, HIRAO et al., 2009, BOTERO et al., 2010, JONES et al., 2010, MORANDINI et al. 2010, SUN et al., 2010, MORANDINI et al., 2011, TAMAI; SUGIYAMA; KIYOURA, 2011, TANG et al., 2011) e quimiocinas (TAMURA et al., 1992, HATAKEYAMA et al., 2003, YANG et al., 2003, TARDIF; ROSS; ROUABHIA, 2004, HOSOKAWA et al., 2005, UEHARA; TAKADA, 2007, STAQUET et al., 2008, HIRAO et al., 2009, INTO et al., 2010, JONES et al. 2010, SUN et al., 2010, TAMAI; SUGIYAMA; KIYOURA, 2011, TANG et al., 2011) são produzidos em resposta ao desafio antigênico. Além

da expressão e funcionalidade destes receptores, também se especula que fibroblastos exerceriam um papel importante na sustentação da resposta imune nos tecidos conjuntivos devido ao não desenvolvimento de tolerância a antígenos como LPS (ARA et al., 2009) e ainda à capacidade de sustentação do fenótipo pró-inflamatório quando extraídos de tecidos inflamados e cultivados *in vitro* mesmo na ausência de estímulos microbianos (EL-AWADY et al., 2010).

O lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* é comumente utilizado como estímulo em diversos ensaios experimentais de indução de respostas imunológica e pró-inflamatória (WANG et al., 1998, COIL; TAM; WATERFIELD, 2004, TARDIF; ROSS; ROUABHIA, 2004, HOSOKAWA et al., 2005, MAHANONDA et al., 2007, ARA et al., 2009, HIRAO et al., 2009, INTO et al., 2010, TANG et al., 2011) e por esta razão, este estímulo foi empregado neste estudo. O reconhecimento desta molécula pelo sistema imune se dá por meio do complexo TLR4-MD-2. O LPS é removido de membranas bacterianas e apresentado ao complexo TLR4-MD-2 pela molécula CD14. O processo de reconhecimento é melhorado na presença da proteína de ligação a LPS (LBP – *LPS Binding Protein*) (HENNESSY; PARKER; O'NEILL, 2010). Uma vez tendo LPS ligado a MD-2, o multímero se compõe de duas cópias do complexo TLR4-MD-2-LPS arranjados de maneira simétrica (KIM et al., 2007). As interações hidrofóbicas e hidrofílicas do LPS com o complexo TLR4-MD-2 contribuem para a dimerização. O número total de cadeias lipídicas do lípide A é considerado o fator mais importante relacionado à imunogenicidade do antígeno. Lípidos A com seis cadeias lipídicas, como é o caso do LPS de *E. coli*, exercem atividade inflamatória ótima (PARK et al., 2009). Já lípidos A com 5 cadeias são 100 vezes menos ativos, como ocorre com o lípide A de LPS de *P. gingivalis* (HASHIMOTO; ASAI; OGAWA, 2004). Apesar da atividade inferior exercida pelo lípide A de *P. gingivalis* quanto ao seu reconhecimento por TLR4, este LPS possui como componente antigênico importante a lipoproteína, que por sua vez levaria à ativação celular por meio de interação com TLR2/TLR1 (HASHIMOTO; ASAI; OGAWA, 2004, JIN et al., 2007, CURTIS et al., 2011). A escolha por este antígeno como estímulo para os fibroblastos se deve à importância que *P. gingivalis* exerce em fenômenos inflamatórios distintos da cavidade oral como gengivite, periodontite, pulpite e lesões periapicais, especialmente nos quadros sintomáticos (SUNDQVIST; JOHANSSON; SJOGREN, 1989, SIQUEIRA, 2002, GOMES et al., 2005, JACINTO

et al., 2006). A escolha de um componente de parede celular de microrganismos Gram-positivos como estímulo também nos pareceu importante, uma vez que as infecções da cavidade oral são polimicrobianas e estes microrganismos podem ser encontrados em grande frequência e quantidade, tendo uma correlação bastante importante em quadros de pulpite. A escolha pelo ácido lipoteicoico (LTA) de *E. faecalis* se justifica pelo fato deste microrganismo ser comumente encontrado em lesões periapicais persistentes e seu papel na indução da doença periapical não ser ainda claramente elucidado (SEDGLEY; BUCK; APPELBE, 2006, SPANGBERG, 2006, ROÇAS; SIQUEIRA, 2008). Especula-se que a resposta celular a LTA seja desencadeada a partir da interação deste antígeno com o dímero TLR2/TLR6 (JIN et al., 2007).

Os resultados do presente estudo mostram produção diferencial de CCL3 por fibroblastos de diferentes tecidos orais relacionados à estrutura dentária (Figuras 2, 3, 4 e 5). Podemos observar que de maneira geral, a produção basal desta quimiocina é bastante discreta nos quatro grupos de linhagens estabelecidas. O estímulo com LTA de *E. faecalis* induziu a produção de CCL3 por fibroblastos de gengiva (Figura 2) e ligamento periodontal (Figura 3) nas maiores concentrações de estímulo. As alterações observadas pelos fibroblastos de polpa tanto de dente permanente como de dente decíduo foram muito discretas (Figuras 4 e 5). Especialmente com relação às células de ligamento periodontal, este dado se mostra interessante, uma vez que *E. faecalis* é um microrganismo comumente encontrado em lesões endodônticas crônicas persistentes aos protocolos de tratamento empregados até o presente. Embora a literatura correlacione frequentemente a detecção desta bactéria em canais radiculares com a persistência de lesões, ainda não é conhecido o real papel deste patógeno na persistência das lesões (SPANGBERG, 2006). Os resultados do presente estudo mostram que, mesmo em estímulo por tempos experimentais curtos, como 6 e 24 h, o principal antígeno derivado de *E. faecalis*, o LTA, foi capaz de induzir a expressão de CCL3 em fibroblastos de ligamento periodontal (Figura 3). Este dado é especialmente importante, já que *E. faecalis* produz altas quantidades de LTA quando em condições ambientais desfavoráveis, como no caso de canais radiculares tratados e obturados (SIGNORETTO et al., 2000). Por outro lado, ao analisarmos fibroblastos de polpa permanente e polpa decídua, observamos uma resposta muito discreta

com relação à produção desta quimiocina, sendo que no caso de polpa de dente permanente, o resultado mais expressivo se dá com a maior concentração de antígeno no tempo experimental de 24 h (Figura 4). A produção de CCL3 por fibroblastos em monocultura de fato costuma alcançar níveis muito discretos mesmo quando as células são desafiadas por estímulos antigênicos (ENZERINK et al., 2009).

A produção de CCL3 induzida por LPS de *P. gingivalis* foi aumentada pelas células de gengiva apenas na menor concentração do estímulo, especialmente após 24 h (Figura 2). Em células de ligamento periodontal, este antígeno não foi capaz de alterar a produção da quimiocina em questão (Figura 3). Esta maior sensibilidade das células de gengiva em comparação com as de ligamento periodontal quanto à produção de CCL3 neste contexto pode ser indício de que células da gengiva sejam evolutivamente mais prontas a se depararem com antígenos na cavidade bucal, uma vez que se deparam com este antígenos com determinada frequência devido à sua localização anatômica mais vulnerável; o que não ocorre com células de ligamento periodontal e polpa (HOSOKAWA et al., 2005). De maneira contrária, em ambos grupos de fibroblastos de polpa (dente permanente e decíduo), observa-se uma tendência de aumento da produção desta quimiocina à medida que a concentração do antígeno aumenta (Figuras 4 e 5). A produção discretamente mais intensa de CCL3 induzida por LPS de *P. gingivalis* em comparação àquela induzida por LTA de *E. faecalis* pode ser resultado da estimulação conjunta dos receptores TLR4-MD-2 e TLR2/TLR1 pelo lípide A e pela lipoproteína constituintes do primeiro antígeno, respectivamente, enquanto o segundo provavelmente estimularia apenas TLR2/TLR6. A estimulação *in vitro* de ambos TLR4 e TLR2 por LPS de *P. gingivalis* foi demonstrada por Kocgozlu et al. (2009) em células endoteliais e epiteliais humanas.

A produção mais expressiva de CCL3 pôde ser observada nas células de gengiva quando estimuladas por LPS de *E. coli* na menor concentração de antígeno no tempo experimental de 1 h. Após 24 h de estímulo, apenas a concentração de 1 µg/mL foi capaz de alterar de forma significativa a produção desta quimiocina (Figura 2). Este resultado visivelmente mais expressivo induzido por EcLPS pode ser explicado pelo potente poder imunogênico que este LPS exibe, como demonstrado por Park et al. (2009). As demais células também apresentaram produção

importante de CCL3 após 1 h de estímulo com a menor concentração de EcLPS (0,1 µg/mL). Neste caso, porém, deve-se ressaltar que fibroblastos de gengiva produziram quantidades maiores de CCL3 em comparação aos fibroblastos dos demais tecidos. Além disso, cada grupo de células exibiu perfil de produção discretamente diferente. Além do já exposto, fibroblastos de ligamento periodontal apresentam produção significativamente maior com 1 e 10 µg/mL de LPS do que os respectivos controles com 24 h de estímulo (Figura 3). Neste mesmo tempo experimental, fibroblastos de polpa de dentes permanentes tiveram a produção de CCL3 visivelmente aumentada para as concentrações de estímulo. Além disso, com 0,1 e 10 µg/mL, o aumento de CCL3 foi significativo também após 1 e 6 h (Figura 4). Quando se analisa, porém, fibroblastos de polpa de dentes decíduos, observa-se que apenas a concentração de 1 µg/mL foi capaz de induzir aumento significativo desta quimiocina após 24 h de estímulo (Figura 5). Estes resultados mostram, de maneira inédita, a heterogeneidade de fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa de dentes permanentes e polpa de dentes decíduos quanto à produção *in vitro* de CCL3. Alguns estudos mostram a produção desta quimiocina de maneira intensa por fibroblastos originados de tecidos patológicos, como fibrose pulmonar, sem produção importante por fibroblastos de tecido normal (LUKACS et al., 1994). Estudo de Enzerink et al. (2009) mostra produção expressiva de CCL3 por fibroblastos de pulmão murino em condições de aglomeração de formato esferóide, com produção muito discreta no caso de células em monocamada.

Jones et al. (2010) relataram expressão de RNAm para MIP-1α por fibroblastos de gengiva humana estimulados com EcLPS e PgLPS, mas neste estudo não há relato acerca da quantificação protéica desta quimiocina. No presente estudo, a amplificação do RNAm para CCL3 não pôde ser detectada no período experimental de 24 h em células estimuladas com LPS. A análise da expressão deste RNA em amostras do grupo experimental que apresentaram produção protéica importante de CCL3 também não mostrou resultados positivos. Isso pode ter sido resultado da degradação rápida deste RNA nas condições experimentais empregadas ou ainda da expressão rápida deste RNA em períodos não avaliados. Ensaio futuros com estimulação por tempos experimentais diferentes seriam necessários para se conseguir compreender melhor a indução da expressão do RNAm para CCL3 em fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental.

A produção de CXCL12 em fibroblastos de tecidos orais também foi avaliada por este estudo com base em trabalhos da literatura que demonstraram a importância dos fibroblastos na produção desta quimiocina (FEDYK et al., 2001, HOSOKAWA et al., 2005). Os resultados aqui apresentados corroboram estes dados. Fibroblastos dos quatro tecidos orais estudados produziram CXCL12 constitutivamente. São notáveis, no entanto, as quantidades maiores de quimiocina produzidas por células da gengiva em comparação com as demais (Figura 6). Neste grupo de células, a estimulação com LTA de *E. faecalis* foi capaz de reduzir de maneira importante a produção de CXCL12 no tempo experimental de 24 h com qualquer concentração de estímulo. No tempo experimental de 6 h, também se observa redução importante, porém apenas com a concentração de 0,1 µg/mL de LTA. A produção de CXCL12 por fibroblastos de ligamento periodontal também foi reduzida, porém apenas pela maior concentração de LTA nos tempos de 6 e 24 h (Figura 7). No entanto, a redução de CXCL12 por LTA de *E. faecalis* que mais chama a atenção foi aquela ocorrida em fibroblastos de polpa de dentes permanentes em que se observa inibição quase completa da produção desta quimiocina em todas as condições experimentais testadas com este antígeno (Figura 8). De maneira interessante, este fenômeno não ocorre em fibroblastos de polpa de dentes decíduos, onde se observa que as alterações causadas por LTA são discretas e não significativas (Figura 9). Este dado é especialmente importante, uma vez que LTA é um componente comum a bactérias Gram-positivas, que por sua vez, predominam a colonização da dentina quando do processo de cárie (LOVE; JENKINSON, 2002). Com estes resultados, nota-se que LTA é capaz de abalar significativamente o quadro de homeostasia das células de polpa dental e parece afetar fibroblastos de polpa permanente de forma mais expressiva do que os de polpa decídua.

Ao analisar a alteração da produção de CXCL12 por fibroblastos de gengiva estimulados com LPS de *P. gingivalis*, pode ser observada redução discreta desta quimiocina apenas na maior concentração de antígeno após 24 h de estímulo (Figura 6). O mesmo ocorre com fibroblastos de ligamento periodontal (Figura 7). De maneira interessante, observa-se que fibroblastos de polpa de dentes permanentes e de dentes decíduos não tiveram a produção desta quimiocina alterada por LPS de *P. gingivalis* (Figuras 8 e 9). A diminuição de CXCL12 em fibroblastos de gengiva foi

descrita em 2005, por Hosokawa et al. utilizando tanto PgLPS como bactéria íntegra inativada por calor (HOSOKAWA et al., 2005).

Ao analisar mais uma vez a produção de CXCL12 por fibroblastos de gengiva, agora frente ao estímulo antigênico com LPS de *E. coli*, nota-se redução mais importante do que aquelas observadas com os outros estímulos. Com exceção apenas para o tempo experimental de 1 h, este LPS foi capaz de reduzir a produção de CXCL12 em todas as demais condições experimentais (Figura 6). Estes achados são contrários aos relatados por Hosokawa et al. (2005) em que houve aumento de CXCL12 por fibroblastos de gengiva estimulados com EcLPS. De volta ao presente estudo, redução mais expressiva se observa com as células provenientes de ligamento periodontal e de polpa de dentes permanentes. Porém, no caso de células de ligamento periodontal, nota-se maior inibição na menor concentração de antígeno, sendo que com as concentrações de 1 e 10 µg/mL, tem-se um aumento da produção da quimiocina tendendo ao perfil basal (Figura 7). No caso das células de polpa de dentes permanentes, nota-se inibição quase total desta quimiocina, como ocorrido com LTA (Figura 8). Mais uma vez, ao analisar a produção de CXCL12, nota-se que o antígeno não foi capaz de alterar a produção desta quimiocina em fibroblastos de polpa de dentes decíduos (Figura 9). Há relatos na literatura que mencionam a diminuição de CXCL12 em condições pró-inflamatórias. Apesar de Hosokawa et al. (2005) demonstrarem aumento desta quimiocina quando do estímulo com EcLPS, estes mesmos autores demonstram um padrão de resposta concentração dependente antagônico entre a produção de CXCL8 e CXCL12. Com a adição de *P. gingivalis* inativado por calor, a concentração da primeira quimiocina aumenta, enquanto a da segunda diminui. Por outro lado, na presença de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , RANTES, MIP-3 α , os autores descrevem aumento da produção de CXCL12. Fedyk et al. (2001) demonstraram que fibroblastos de gengiva e pele humanos em condições pró-inflamatórias apresentavam diminuição da produção de CXCL12. Em lesões cutâneas, estes autores observaram a queda da expressão de RNAm para CXCL12 durante o processo inflamatório com retorno desta expressão após o reparo tecidual. Em outro estudo, Toksoy et al. (2007) demonstraram que fibroblastos cutâneos humanos apresentavam redução gênica e protéica da síntese de CXCL12 na presença de TNF- α e IFN- γ isoladamente ou em conjunto. Por meio de hibridização *in situ* e imunoistoquímica, estes autores demonstraram ainda em

lesões cutâneas humanas o aumento de CXCL12 nos primeiros dias e em seguida uma diminuição drástica de CXCL12 no neoestroma formado.

Analisando novamente os dados do presente estudo, apesar das diferenças evidentes encontradas nos níveis protéicos de CXCL12, não foram encontradas diferenças importantes no que diz respeito à expressão de RNAm para esta quimiocina no tempo experimental de 24 h com estímulo por EcLPS (Figura 10). Alguns fatos podem ser sugeridos para justificar tais achados. As diminuições observadas nos níveis de proteína podem ter sido fruto de redução na expressão de RNAm em tempos experimentais anteriores ao período de 24 h. Pode ser sugerida ainda a ocorrência de regulação pós-transcricional da produção desta proteína. Uma terceira hipótese seria a degradação da quimiocina como consequência indireta do estímulo antigênico. Num contexto pró-inflamatório, da mesma forma em que ocorre a indução de síntese de citocinas, ocorre também o aumento da produção de metaloproteinases (MMPs) por fibroblastos (LIN et al., 2001, WISITHPHROM; MURRAY; WINDSOR, 2006, WISITHPHROM; WINDSOR, 2006, ZHOU; WINDSOR, 2006). As proteínas da matriz extracelular tecidual não são os únicos substratos destas enzimas. A quimiocina CXCL12 é um substrato de diversas MMPs, como MMP-1, -2, -3, -9, -13 e -14 e a ação destas enzimas é capaz de inativar esta quimiocina, comprometendo de maneira importante a capacidade de ligação com seu receptor (OVERALL, 2002, MANICONE; MCGUIRE, 2008). Independente do mecanismo envolvido com a sua diminuição, podemos sugerir que a redução da produção de CXCL12 por fibroblastos, especialmente de polpa permanente, pode resultar em migração celular mais branda de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ durante o processo inflamatório. Também podemos sugerir que a diminuição desta quimiocina durante o processo infeccioso facilitará a migração de células dendríticas maduras, que provavelmente foram ativadas pelos mesmos agentes antigênicos que o fizeram com fibroblastos, do sítio inflamatório para a circulação sangüínea. A responsividade de células dendríticas a CXCL12 ocorre em seu fenótipo imaturo. Em consequência à ativação destas células pelo reconhecimento de MAMPs, o receptor CCR7 é expresso e estas células, agora maduras, passariam a migrar seguindo o gradiente das quimiocinas CCL19 e CCL21 (RICART et al., 2011). A presença de níveis altos de CXCL12 encontrados em condições basais torna os tecidos conjuntivos favoráveis à permanência de células dendríticas

imaturas que, por sua vez, são consideradas as responsáveis pela ponte entre imunidade inata e adaptativa (RICART et al., 2011). A produção basal de CXCL12 por fibroblastos também pode exercer papel importante na manutenção da homeostasia tecidual por meio da retenção de células-tronco hematopoiéticas nos tecidos conjuntivos (AIUTI et al., 1997, PITUCH-NOWOROLSKA et al., 2003, KARIN, 2010). Florin et al. (2005) também relataram a capacidade de CXCL12 em induzir proliferação de queratinócitos cutâneos. Este dado pode ter alguma relevância na manutenção da homeostasia de queratinócitos gengivais através de fibroblastos e ainda podemos especular algum papel de fibroblastos de ligamento periodontal na manutenção dos restos epiteliais de Malassez, presentes ao redor do ligamento periodontal (LUAN; ITO; DIEKWISCH, 2006) por meio da produção constitutiva de CXCL12.

A produção de pró-colágeno tipo I foi avaliada em fibroblastos de polpa de dente permanente e decíduo frente aos estímulos com LTA de *E. faecalis* e LPS de *P. gingivalis* (Figura 11). O estudo da produção desta proteína também é importante para que se compreenda melhor o comportamento das células em relação à sua função principal, que é a manutenção da estrutura tecidual, frente a estímulos microbianos (LERTCHIRAKARN; BIRNER; MESSER; 1998, BARKHORDAR et al., 2002, CHAN et al., 2005, BOTERO; CONTRERAS; PARRA, 2008). Concentramos esta análise apenas em células provenientes de polpa dental pelo fato de ser bem conhecido o fenômeno de desestruturação completa do tecido quando da implementação de processo inflamatório frente à progressão de cárie dental (TELLES et al., 2003). Nota-se que redução importante da produção desta proteína foi encontrada em células de polpa de dente permanente estimuladas com LTA (Figura 12). Este dado é especialmente importante porque mesmo em porções profundas de cárie dental, a microbiota predominante é Gram-positiva e LTA é um dos fatores de virulência produzidos por estas bactérias (GINSBURG, 2002, COSTA; DE SOUZA-FILHO; BARBOSA, 2003, BRUSERUD; WENDELBO; PAULSEN, 2004, DURAND et al., 2006, BAIK et al., 2008). O fato de que fibroblastos de polpa de dente permanente reduzem de maneira importante a produção de colágeno frente a este antígeno pode ser um dos fatores que acarretam na perda estrutural da polpa durante o processo inflamatório. A resposta de fibroblastos de polpa de dente decíduo frente a este antígeno não seguiu o mesmo perfil. De maneira geral,

observa-se tendência de aumento da produção desta proteína quando da adição do estímulo antigênico ao meio de cultura com aumento significativo nas condições de 0,1 µg/mL em 24 h e 10 µg/mL a 1 h (Figura 13). Tendência à redução da produção de colágeno só pôde ser observada a 1 µg/mL após 6 h de estímulo. Quando as células foram estimuladas com LPS de *P. gingivalis*, observa-se nos fibroblastos de polpa de dente permanente, a tendência de aumento da produção de pró-colágeno (Figura 12). Aumento significativo da proteína pode ser observado nas células de dentes decíduos com redução aparentemente mais importante com 1 µg/mL de LPS após 24 h de estímulo (Figura 13). Estes resultados sugerem que para fibroblastos de polpa de dentes decíduos, o perfil de resposta parece depender da concentração de estímulo utilizada. O processo inflamatório parece de fato afetar a produção de colágeno por fibroblastos. Alguns trabalhos relatam que em ambiente pró-inflamatório ocorre aumento da produção desta proteína por fibroblastos. A presença de IL-1 β leva ao aumento da produção de colágeno I por fibroblastos de polpa (LERTCHIRAKARN; BIRNER; MESSER, 1998, BARKHORDAR et al., 2002) e gengiva (BARKHORDAR ET AL., 2002). Barkhordar et al. (2002) demonstraram que fibroblastos de polpa e gengiva produziram maiores quantidades de colágeno I *in vitro* quando incubados com IL-1 β . A presença de TGF- β 1 e TGF- β 2 levou ao aumento da síntese de colágeno por fibroblastos de polpa dental humana em cultura (CHAN et al., 2005). Em estudo com fibroblastos de pulmão murino, He et al. (2009) mostram que o estímulo com LPS de *E. coli* foi capaz de aumentar a produção de colágeno tipo I por estas células e sugerem ainda que este fenômeno seria dependente de TLR4. Por outro lado, Fragiadaki et al. (2011) relataram que condições de altas concentrações de TGF- β são capazes de diminuir a expressão gênica de colágeno tipo I em fibroblastos murinos NIH3T3. Este dado pode ser justificado pelo fato de TGF- β ser uma citocina comumente relacionada a eventos anti-inflamatórios (TSUNAWAKI et al., 1988). A ausência de consenso na literatura a respeito do perfil de mudança da produção de colágeno durante os processos inflamatórios que envolvem gengiva, ligamento periodontal e polpa se devem ao fato de que nem sempre o aumento da expressão gênica para colágeno resulta no aumento de sua síntese protéica, como discutido por Havemose-Poulsen e Holmstrup (1997). Segundo estes autores, a alteração de matriz extracelular, observada nos processos patológicos envolvendo doenças pulpares e periodontais,

seria fruto do aumento de MMPs em condições inflamatórias. De fato, a degradação do colágeno parece ser um fator importante a se considerar no contexto inflamatório. Estudos com fibroblastos de polpa dental mostram que a presença no sobrenadante de citocinas como IL-1 α (WISITHPHROM; MURRAY; WINDSOR, 2006), IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β 1 levaria à degradação de colágeno por meio da produção de MMPs pelos próprios fibroblastos (WISITHPHROM; WINDSOR, 2006). A indução da síntese de MMPs e conseqüente degradação de colágeno por fibroblastos de gengiva foi relatada por Zhou et al. (2006). Células estimuladas com o sobrenadante de *P. gingivalis* foram capazes de degradar colágeno de maneira muito mais expressiva do que células em situação basal. Os autores mostram ainda que a degradação foi mediada pelos fibroblastos e não pelo sobrenadante *per se*.

Ao analisarmos a produção das quimiocinas e de pró-colágeno pelos fibroblastos estabelecidos ao longo deste estudo, podemos observar que células originadas do mesmo tecido apresentaram perfis de resposta distintos quando os resultados são comparados entre os antígenos utilizados. Isso pode ser explicado pelo fato de que os três antígenos escolhidos para este estudo interagem de maneira distinta com as células (Figura 15, pag. 89). A interação dos antígenos com receptores TLR2, quer seja em dimerização do tipo TLR2/TLR1, como no caso da lipoproteína de LPS de *P. gingivalis*, ou em dimerização do tipo TLR2/TLR6, como provavelmente ocorre com LTA; desencadearia mudanças conformacionais nos receptores levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras no interior da célula, como MyD88 e MAL (*MyD88-adaptor-like* – Adaptador do tipo MyD88). O domínio intracelular dos TLRs – TIR –, não é capaz de interagir diretamente com MyD88 e assim, a proteína MAL funcionaria como ponte entre TIR e MyD88. O recrutamento destas moléculas resulta numa cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B, que por sua vez induz a expressão de genes relacionados com proteínas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, proIL-1 β . Esta mesma via de sinalização é também ativada quando do reconhecimento antigênico por meio de TLR4-MD-2. No entanto, este receptor é capaz também de ativar uma via de sinalização independente de MyD88. Nesta via, são recrutadas as proteínas adaptadoras TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β*) e TRAM (*TRIF-related Adaptor Molecule*), sendo que TRAM funcionaria como molécula ponte entre TRIF e o domínio TIR do receptor. O resultado da sinalização intracelular por

esta via é a ativação tardia do fator de transcrição NF- κ B e a ativação de outro fator de transcrição: IRF3 (*Interferon Regulatory Factor*), que por sua vez levaria à regulação de IFNs tipo I (IFN- α e IFN- β), citocinas essas capazes de exercer potente atividade bacteriana (O'NEILL; BOWIE, 2007, KENNY; O'NEILL, 2008, HENNESSY; PARKER; O'NEILL, 2010, OSTUNI; ZANONI; GRANUCCI, 2010). O recrutamento das proteínas adaptadoras TRAM e TRIF ocorre, no entanto, em compartimentos endossômicos (HUSEBYE et al., 2006, OSTUNI; ZANONI; GRANUCCI, 2010). Considerando que cada antígeno utilizado por este estudo interage com receptores diferentes, podemos especular que as respostas diferenciais obtidas quando da comparação de um mesmo grupo celular foram resultado da ativação de vias de sinalização intracelular distintas. Obviamente experimentos complementares seriam necessários para provarmos essas especulações.

Assim como observado neste estudo, outros trabalhos têm demonstrado respostas diferentes quando da utilização de estímulos antigênicos distintos. Yamaji et al. (1995) relatam aumento significativo da proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal por LPS de *E. coli*, mas não por LPS de *P. gingivalis*. Por outro lado, o RNAm para IL-6 e IL-8 se mostrou aumentado a partir de baixas concentrações de PgLPS, enquanto que no caso de EcLPS, tais respostas só foram observadas quando da maior concentração de antígeno. Com relação à síntese protéica, os autores mostram que o aumento da produção de IL-6 na presença do antígeno foi maior do que no grupo controle (não estimulado), porém não foi diferente ao comparar ambos os antígenos. Entretanto, produções mais significativas puderam ser observadas na síntese de IL-8 por PgLPS. Utilizando como estímulos LTAs de 7 microrganismos diferentes, Sugiyama et al. (1996) demonstraram aumento significativo de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) apenas por LTA de *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Staphylococcus aureus* em fibroblastos de gengiva humana. Hosokawa et al. (2005) mostraram de maneira interessante que 10 μ g/mL de EcLPS levaram ao aumento de CXCL12 por fibroblastos de gengiva. Esta mesma concentração de PgLPS levou à diminuição da síntese desta proteína. Em fibroblastos gengivais, Hashimoto, Asai e Ogawa (2004) mostraram produção de IL-8 mais expressiva quando do desafio com EcLPS do que com PgLPS. Em estudo *in vitro* com fibroblastos de polpa, Staquet et al. (2008) demonstraram que a expressão gênica para CCL2, CCL7 e CCL26 por

Figura 15: Estruturas moleculares e vias de sinalização de TLR2 (a) e TLR4 (b). O LTA de *E. faecalis* e a porção lipoprotéica do LPS de *P. gingivalis* interagem provavelmente com TLR2, dando sequência à sinalização intracelular segundo o diagrama (a). As cadeias tetra- ou penta-aciladas do lípide A do LPS de *P. gingivalis* e as cadeias hexa-aciladas do lípide A do LPS de *E. coli* interagem com TLR4 dando origem a uma sinalização intracelular distinta, conforme ilustrado no diagrama (b). Adaptado de Henessy et al. (2010).

estas células não se mostrou diferente quando do estímulo com LTA de *S. aureus* e LPS de *E. coli*. Segundo Hirao et al. (2009), fibroblastos de polpa dental humana se mostraram mais responsivos a Pam₃CSK₄ (ligante de TLR2/TLR1) do que a LPS de *E. coli* quanto à produção de IL-8, IL-6, MCP-1, IP-10 (*Interferon gama-induced protein* – 10), COX-2 (Ciclooxigenase-2), e PGE₂. Em fibroblastos de gengiva, Inomata, Into e Murakami (2010) mostraram expressão de RNAm para IL-6 e IL-8 visivelmente maior para LPS de *E. coli* em comparação com LPS de *P. gingivalis*. Por outro lado, a expressão de RNAm para IP-10 (CXCL10) se mostrou semelhante para ambos os antígenos. O mesmo grupo demonstrou em outro estudo novamente respostas mais intensas a LPS de *E. coli* em comparação com Pam₃CSK₄ e MALP-2 e FSL-1 (sendo os dois últimos ligantes de TLR2/TLR6) quanto à expressão de RNAm para IL-8 e IL-6 (INTO et al., 2010). Fenômeno semelhante foi relatado por Jones et al. (2010) com produção mais robusta de genes inflamatórios, como IL-6, iNOS (*inducible NO Synthase*), MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β em resposta a EcLPS do que a PgLPS por fibroblastos de gengiva humanos. Os níveis protéicos de IL-6 e MCP-1 também se mostraram maiores quando do estímulo com EcLPS. Em estudo com fibroblastos de ligamento periodontal humano em cultura, Sun et al. (2010) demonstraram quantidades maiores de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS de *E. coli* em comparação com LPS de *P. gingivalis*. Os autores demonstraram ainda que a resposta destas células a LPS de *P. gingivalis* pareceu resultar predominantemente da interação deste antígeno com o receptor TLR2. Tang et al., (2011) também mostraram, através do estudo da expressão do RNAm para TRAF6 e da produção de citocinas pró-inflamatórias, que fibroblastos de ligamento periodontal desenvolveram respostas celulares quantitativamente semelhantes com quantidades 100 vezes inferiores de LPS de *E. coli* em comparação com Pam₃CSK₄.

Os dados da literatura nos levam a sugerir que a resposta celular desencadeada pelo reconhecimento de antígenos é bastante variável de acordo o tipo celular envolvido, mesmo no caso de fibroblastos, considerando-os como pertencentes a grupos teciduais distintos dependendo do tecido de origem das células. Um dado interessante que suporta esta hipótese foi demonstrado por Hatakeyama et al. (2003). Este estudo foi realizado com fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal dos mesmos doadores estimulados com LPS de *E. coli*, peptidoglicana de *Staphylococcus epidermidis* e muramildipeptídeo. A produção de

IL-8 por fibroblastos de gengiva foi ligeiramente maior quando estimulados por EcLPS do que quando estimulados pelos demais antígenos (considerando concentrações iguais). Por outro lado, a produção de IL-8 foi visivelmente maior quando do estímulo com peptidoglicana (componente celular de bactérias Gram-positivas) e muramildipeptídeo em fibroblastos de ligamento periodontal. Estes autores mostram ainda que a expressão de TLR2 é ligeiramente maior em fibroblastos de ligamento periodontal do que nas células de gengiva, enquanto que estes últimos expressam mais CD14 do que os primeiros. Os autores correlacionam a produção diferencial de IL-8 com a expressão diferencial dos receptores. Ghosh et al. (2008) mostraram níveis maiores da produção de NO (óxido nítrico) por fibroblastos de ligamento periodontal quando comparados a fibroblastos de gengiva estimulados por cepas viáveis de *P. gingivais*, *E. coli* e *S. mutans*. Scheres et al. (2010) mostraram que a expressão gênica de IL-6 e IL-8 entre células de gengiva e ligamento periodontal variou de maneira significativa entre os doadores. Os autores sugerem que a escala de resposta de células de gengiva e ligamento periodontal varia de maneira muito importante entre indivíduos. Os dados deste estudo podem justificar as diferenças observadas na resposta celular a diferentes antígenos descritas por estudos prévios na literatura. Para diminuir este viés, na presente investigação foram estabelecidas culturas de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental dos mesmos indivíduos. Este dado fortalece os resultados obtidos por este estudo quanto ao comportamento diferencial de fibroblastos oriundos de tecidos dentários distintos.

Uma vez que a expressão de microRNAs é relatada como sendo tecido-específica (BARTEL, 2004), nos pareceu apropriado investigar até que ponto estas moléculas estariam envolvidas com a resposta diferencial demonstrada pelas células deste estudo. Com relação à modulação da produção protéica de CCL3 por microRNAs, a literatura ainda não dispõe de dados concretos que fundamentem a prospecção *in silico*. Na análise do ensaio de micro-arranjo, foi possível observar que fibroblastos oriundos do mesmo indivíduo expressaram de maneira diferencial uma quantidade importante de microRNAs candidatos obtidos por meio de análise computacional. Também não encontramos na literatura dados que suportem o papel dos microRNAs listados na Tabela 1 com a expressão de CXCL12 e pró-colágeno tipo I. Para que pudéssemos sugerir o envolvimento destes microRNAs na produção

diferencial de CCL3, CXCL12 e pró-colágeno I por fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal e polpa dental humanos, experimentos de validação dos resultados obtidos pelos ensaios de micro-arranjo precisariam ser realizados. Sendo assim, podemos especular que possam existir diferenças entre fibroblastos na dinâmica de expressão de microRNAs envolvidos com as proteínas avaliadas por este estudo.

De acordo com dados recentes da literatura, também podemos tecer considerações a respeito de microRNAs sabidamente envolvidos com a resposta imune inata desencadeada por TLRs (PAULEY; CHAN, 2008, NAHID et al., 2011, O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011, QUINN; O'NEILL, 2011). De acordo com os dados gerados em forma de agrupamento hierárquico a partir das lâminas de micro-arranjo, os chamados imunomiRs se mostraram expressos também de forma diferencial pelos fibroblastos avaliados neste estudo. O miR-146a, envolvido com a sinalização *downstream* a MyD88 se mostrou expresso por fibroblastos de gengiva e polpa dental tanto em condição basal como estimulados. Em células de ligamento periodontal, este microRNA só foi expresso quando estimuladas com LPS enquanto que as de decíduo só mostraram expressão na condição basal. O miR-155 obedece a perfil semelhante para gengiva e polpa, porém aparece expresso de maneira contrária em ligamento periodontal e polpa de dentes decíduos: em condições basais para ligamento periodontal e apenas com estímulo em decíduos. Este microRNA também é capaz de agir na regulação de vias de sinalização dependentes de MyD88, porém também é capaz de regular moléculas presentes no braço TRIF da sinalização via TLR4. A expressão de miR-21 tem sido relatada em resposta à ativação de NF- κ B, embora em nosso estudo ele estivesse expresso em condições estimuladas apenas em fibroblastos de ligamento periodontal. Em células de polpa e gengiva, este miRNA só apareceu expresso em condições basais. Este microRNA parece exercer papel importante na troca de perfil pró- e anti-inflamatório de respostas imunes através da correlação positiva de sua expressão com a de IL-10 (SHEEDY et al., 2010). Finalmente, também observamos expressão diferencial de let-7i em fibroblastos de gengiva (basal e estimulados), polpa (basal e estimulados) e ligamento periodontal (apenas estimulados). Este microRNA foi relacionado com a regulação negativa de TLR4 em colangiócitos (células epiteliais de bile) humanos (CHEN et al., 2007). Estes achados sugerem que diversos microRNAs possam estar

envolvidos com a expressão de receptores TLR e ainda com a expressão de moléculas envolvidas com a sinalização intracelular desencadeada por estes receptores (QUINN; O'NEILL, 2011). Perfis diferenciais de expressão de microRNAs podem estar envolvidos com respostas distintas desencadeadas por antígenos em fibroblastos de estruturas parendodônticas, sendo necessários estudos futuros para confirmarem esta hipótese.

O papel dos fibroblastos na resposta imune dos tecidos conjuntivos orais vem sendo descrito de maneira importante pela literatura ao longo dos últimos anos. Já é consagrado o conhecimento do potencial destas células na participação da resposta inflamatória em reação à invasão tecidual por microrganismos da cavidade oral e na produção de proteínas da matriz extracelular, fundamental para a construção do alicerce tecidual. As diferenças fenotípicas e comportamentais que os fibroblastos apresentam quando desafiados imunologicamente levam a intrigantes questionamentos acerca do papel destas células na identidade dos tecidos das estruturas orais, permitindo presumir que as referidas diferenças poderiam ser consequência do microambiente constituído por esses tecidos. A produção diferencial de quimiocinas como CCL3 e CXCL12 e de pró-colágeno I demonstrada por este estudo corrobora achados anteriores da literatura sobre a singularidade de fibroblastos originados de diferentes tecidos ao longo do organismo humano. O papel de proteínas envolvidas no reconhecimento de antígenos, de moléculas envolvidas na sinalização intracelular e na regulação fina da expressão destas proteínas, como fazem os microRNAs, é objeto de estudos extensos que deverão ser desenvolvidos ao longo das próximas décadas e que poderão elucidar de forma mais clara os mecanismos moleculares envolvidos na singularidade e importância de fibroblastos no desencadeamento de processos inflamatórios que acometem os tecidos orais.

6 Conclusão

6 Conclusão

Nas condições em que este trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

Fibroblastos humanos de gengiva, ligamento periodontal e polpa de dentes permanentes e decíduos diferem quanto à produção da quimiocina CCL3 e CXCL12 quando estimulados por ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* e lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*.

Fibroblastos de polpa de dente permanente e decíduo apresentaram perfil distinto de produção de pró-colágeno I quando estimulados com LTA de *E. faecalis* e LPS de *P. gingivalis*.

Fibroblastos de gengiva, ligamento periodontal, polpa de dente permanente e de dente decíduo apresentaram perfil de expressão de microRNAs distinto de acordo com o tecido de origem das células.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997 Jan 6;185(1):111-20.

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

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.

Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009 Feb;44(1):21-7.

Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*. 2005 Oct;6(10):973-9.

Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):975-82.

Barkhordar RA, Ghani QP, Russell TR, Hussain MZ. Interleukin-1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2002 Mar;28(3):157-9.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

Bentwich I. Identifying human microRNAs. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;320:257-69.

Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, et al. Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*. 2006 Oct;16(10):1289-98.

Bonecchi R, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Bernasconi S, Locati M, et al. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):474-9.

Botero JE, Contreras A, Parra B. Profiling of inflammatory cytokines produced by gingival fibroblasts after human cytomegalovirus infection. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):291-8.

Botero JE, Contreras A, Parra B. Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2008 Dec;43(6):649-57.

Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, Nor JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *J Endod*. 2006 Oct;32(10):951-5.

Botero TM, Son JS, Vodopyanov D, Hasegawa M, Shelburne CE, Nor JE. MAPK signaling is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells. *J Dent Res*. 2010 Mar;89(3):264-9.

Bourcier T, Berbar T, Paquet S, Rondeau N, Thomas F, Borderie V, et al. Characterization and functionality of CXCR4 chemokine receptor and SDF-1 in human corneal fibroblasts. *Mol Vis*. 2003 Apr 2;9:96-102.

Brodsky I, Medzhitov R. Two modes of ligand recognition by TLRs. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):979-81.

Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol*. 2000 Mar;30(3):914-9.

Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol*. 2010;10:5.

Bruserud O, Wendelbo O, Paulsen K. Lipoteichoic acid derived from *Enterococcus faecalis* modulates the functional characteristics of both normal peripheral blood leukocytes and native human acute myelogenous leukemia blasts. *Eur J Haematol*. 2004 Nov;73(5):340-50.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985 Oct;1(5):170-5.

Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, et al. Effects of TGF-beta on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*. 2005 May;50(5):469-79.

Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem*. 2007 Sep 28;282(39):28929-38.

Chiego Jr. D. Histology of the pulp. In: Avery J, editor. Oral development and histology. 3rd ed. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002. p. 190-212.

Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):88-91.

Costa ED, de Souza-Filho FJ, Barbosa SV. Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. *Braz Dent J*. 2003;14(2):95-8.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22.

Curtis MA, Percival RS, Devine D, Darveau RP, Coats SR, Rangarajan M, et al. Temperature-dependent modulation of *Porphyromonas gingivalis* lipid A structure and interaction with the innate host defenses. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1187-93.

Dahnlén G. Immune response of rats against lipopolysaccharides of *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides oralis* administered in the root canal. *Scand J Dent Res* 1979; 88: 122-9.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1389-93.

Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, Caux C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol.* 1999 Aug;66(2):252-62.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med.* 1998 Jul 20;188(2):373-86.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002 Oct;28(10):689-93.

Durand SH, Flacher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2880-7.

El-Awady AR, Messer RL, Gamal AY, Sharawy MM, Wenger KH, Lapp CA. Periodontal ligament fibroblasts sustain destructive immune modulators of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Sep;81(9):1324-35.

Enzerink A, Salmenpera P, Kankuri E, Vaheri A. Clustering of fibroblasts induces proinflammatory chemokine secretion promoting leukocyte migration. *Mol Immunol.* 2009 May;46(8-9):1787-95.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):221-8.

Fedyk ER, Jones D, Critchley HO, Phipps RP, Blieden TM, Springer TA. Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5749-54.

Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006;40:50-76.

Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. *J Dent Child (Chic).* 2009 Sep-Dec;76(3):194-8.

Ferreira DC, Rocas IN, Paiva SS, Carmo FL, Cavalcante FS, Rosado AS, et al. Viral-bacterial associations in acute apical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Aug;112(2):264-71.

Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 Apr 15;138(1):49-54.

Florin L, Maas-Szabowski N, Werner S, Szabowski A, Angel P. Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J Cell Sci.* 2005 May 1;118(Pt 9):1981-9.

Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. *Int Endod J.* 2001 Oct;34(7):506-13.

Fragiadaki M, Ikeda T, Witherden A, Mason RM, Abraham D, Bou-Gharios G. High doses of TGF- β 1 potentially suppress type I collagen via the transcription factor CUX1. *Mol Biol Cell.* 2011 Jun;22(11):1836-44.

Ghosh A, Park JY, Fenno C, Kapila YL. *Porphyromonas gingivalis*, gamma interferon, and a proapoptotic fibronectin matrix form a synergistic trio that induces c-Jun N-terminal kinase 1-mediated nitric oxide generation and cell death. *Infect Immun*. 2008 Dec;76(12):5514-23.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis*. 2002 Mar;2(3):171-9.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):13-27.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Aug;20(4):211-5.

miRBase: the microRNA database [database on the Internet]. University of Manchester. 2004 [cited 16 July 2011]. Disponível em: <http://www.mirbase.org/>.

Gutierrez-Venegas G, Maldonado-Frias S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cardenas P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci*. 2005 May 20;77(1):60-73.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994 Jun;5:78-111.

Hahn CL, Falkler WA, Jr., Minah GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol*. 1991;36(2):147-53.

Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*. 2007 Mar;33(3):213-9.

Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol*. 2004 Oct;16(10):1431-7.

Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Feb;18(1):14-23.

Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(2):217-36.

He Z, Zhu Y, Jiang H. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-Akt pathway in fibroblasts during acute lung injury. *J Recept Signal Transduct Res*. 2009;29(2):119-25.

Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Apr;9(4):293-307.

Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):328-36.

Hijiya T, Shibata Y, Hayakawa M, Abiko Y. A monoclonal antibody against fimA type II *Porphyromonas gingivalis* inhibits IL-8 production in human gingival fibroblasts. *Hybridoma (Larchmt)*. 2010 Jun;29(3):201-4.

Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanishi T, Matsuo T. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. *J Dent Res*. 2009 Aug;88(8):762-7.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Murakami K, Miyake Y, et al. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clin Exp Immunol*. 2005 Sep;141(3):467-74.

Husebye H, Halaas O, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger O, Bogen B, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J*. 2006 Feb 22;25(4):683-92.

Inomata M, Into T, Murakami Y. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by *Porphyromonas gingivalis* cells and extracts in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2010 Dec;118(6):574-81.

Into T, Inomata M, Shibata K, Murakami Y. Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol*. 2010;264(1):104-9.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J*. 2006 Jan;39(1):62-70.

Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Oct;7(4):462-78.

Jiang HW, Ling JQ, Gong QM. The expression of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) in inflamed human dental pulp. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1351-4.

Jiang L, Zhu YQ, Du R, Gu YX, Xia L, Qin F, et al. The expression and role of stromal cell-derived factor-1alpha-CXCR4 axis in human dental pulp. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):939-44.

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1071-82.

Jones KJ, Ekhlassi S, Montufar-Solis D, Klein JR, Schaefer JS. Differential cytokine patterns in mouse macrophages and gingival fibroblasts after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* or *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontol*. 2010 Dec;81(12):1850-7.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9.

Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, Yasumoto S. Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *J Oral Pathol Med*. 2004 Aug;33(7):417-23.

Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol*. 2010 Sep;88(3):463-73.

Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nishimura F, Meguro M, Yoshizawa S, Okada Y, et al. Fibroblasts stimulated via HLA-II molecules produce prostaglandin E and regulate cytokine production from helper T cells. *Lab Invest*. 2010 Dec;90(12):1747-56.

Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus spp.* in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod*. 2005 Dec;31(12):851-6.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308-20.

Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, et al. Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology*. 2009 Feb 26.

Kenny EF, O'Neill LA. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine*. 2008 Sep;43(3):342-9.

Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):906-17.

Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res*. 2009 Aug;88(8):741-5.

Koga T, Nishihara T, Fujiwara T, Nisizawa T, Okahashi N, Noguchi T, et al. Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1985 Mar;47(3):638-47.

Kumada H, Haishima Y, Umemoto T, Tanamoto K. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 1995 Apr;177(8):2098-106.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973-83.

Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004 Jun;12(2):93-8.

Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Endod*. 1998 Jun;24(6):409-13.

Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IV, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res*. 2011;45(1):21-30.

Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, et al. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod*. 2001 Mar;27(3):185-9.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(5):679-728.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):171-83.

Luan X, Ito Y, Diekwisch TG. Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn*. 2006 May;235(5):1167-80.

Lukacs NW, Chensue SW, Smith RE, Strieter RM, Warmington K, Wilke C, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J Pathol*. 1994 Apr;144(4):711-8.

Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, et al. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol*. 2007 Jan 15;178(2):1151-7.

Mallick B, Chakrabarti J, Ghosh Z. MicroRNA reins in embryonic and cancer stem cells. *RNA Biol*. 2011 May 1;8(3).

Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Feb;19(1):34-41.

Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol*. 2002 May;40(5):1698-704.

Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1882-6.

Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev*. 1988 Mar;52(1):134-52.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci*. 2004 Jun;112(3):207-15.

Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SL, Passanezi E, Rezende ML, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1alpha, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *J Periodontol*. 2010 Feb;81(2):310-7.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF-beta, interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res*. 2011 Apr;25(2):157-62.

Nahid MA, Rivera M, Lucas A, Chan EK, Kesavalu L. Polymicrobial infection with periodontal pathogens specifically enhances microRNA miR-146a in ApoE^{-/-} mice during experimental periodontal disease. *Infect Immun*. 2011 Apr;79(4):1597-605.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*. 1996 Jul;64(7):2371-80.

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353-64.

O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011 Mar;11(3):163-75.

Ogawa T. Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett*. 1993 Oct 11;332(1-2):197-201.

Okiji T. Pulp as a connective tissue. In: Hargreaves K, Goodis H, editors. *Seltzer and Bender's Dental Pulp*. Carol Stream: Quintessence Publishing Co.; 2002. p. 95-122.

Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*. 2005 Feb;43 Spec No:93-100.

Ostuni R, Zanoni I, Granucci F. Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Dec;67(24):4109-34.

Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*. 2002 Sep;22(1):51-86.

Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1577-86.

Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hanstrom L, Lerner UH. IL-1beta and TNF-alpha regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2008 Jun;87(6):558-63.

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1191-5.

Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:226-39.

Pituch-Noworolska A, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Baj-Krzyworzeka M, Urbanowicz B, Malec E, et al. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity. *Folia Histochem Cytobiol*. 2003;41(1):13-21.

Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol*. 2011 Jul;23(7):421-5.

Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrzkowski Z, Peiper S, et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*. 2003;21(3):363-71.

Ricart BG, John B, Lee D, Hunter CA, Hammer DA. Dendritic cells distinguish individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. *J Immunol*. 2011 Jan 1;186(1):53-61.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1277-88.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008 Nov;46(11):3599-606.

Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog.* 2001 Apr;30(4):211-20.

Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med.* 1993 Jun 1;177(6):1821-6.

Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2010 Apr;45(2):262-70.

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):104-9.

Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006 Mar;32(3):173-7.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):95-101.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Nov;78(5):634-45.

Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2008 Dec;67 Suppl 3:iii50-5.

Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol.* 2010 Feb;11(2):141-7.

Shibata T, Motoi Y, Tanimura N, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int Immunol.* 2011 Jun 28.

Signoretto C, Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol.* 2000 May;66(5):1953-9.

Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Dionisio TJ, Santos CF, Bagnato VS, et al. In vivo effects on the expression of vascular endothelial growth factor-A165 messenger ribonucleic acid of an infrared diode laser associated or not with a visible red diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):63-8.

Sipert CR, Moraes IG, Bernardinelli N, Garcia RB, Bramante CM, Gasparoto TH, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultured human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):91-4.

Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Sep;94(3):281-93.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod. 2008 Nov;34(11):1291-301 e3.

Sismey-Durrant HJ, Hopps RM. Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E2 and interleukin-1-beta release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. Oral Microbiol Immunol. 1991 Dec;6(6):378-80.

Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol. 1997 Aug;151(2):317-22.

Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. Clin Exp Dermatol. 2008 May;33(3):312-5.

Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. Semin Cancer Biol. 2008 Apr;18(2):131-40.

Spangberg LS. Infatuated by Enterococci. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Nov;102(5):577-8.

Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. J Dent Res. 2008 Mar;87(3):256-61.

Sugiyama A, Arakaki R, Ohnishi T, Arakaki N, Daikuhara Y, Takada H. Lipoteichoic acid and interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. Infect Immun. 1996 Apr;64(4):1426-31.

Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. J Periodontol. 2010 Oct;81(10):1488-96.

Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. J Endod. 1989 Jan;15(1):13-9.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod. 1992 Sep;18(9):427-30.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 15;103(33):12481-6.

Tamai R, Sugiyama A, Kiyoura Y. Alendronate regulates cytokine production induced by lipid A through nuclear factor-kappaB and Smad3 activation in human gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2011 Feb;46(1):13-20.

Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun. 1992 Nov;60(11):4932-7.

Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, et al. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. Arch Oral Biol. 2011 Mar 30.

Tardif F, Ross G, Rouabhia M. Gingival and dermal fibroblasts produce interleukin-1 beta converting enzyme and interleukin-1 beta but not interleukin-18 even after stimulation with lipopolysaccharide. J Cell Physiol. 2004 Jan;198(1):125-32.

Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. Dent Clin North Am. 2005 Jul;49(3):491-516, v.

Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nor JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. J Dent Res. 2003 Jun;82(6):466-70.

Toksoy A, Muller V, Gillitzer R, Goebeler M. Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing. Br J Dermatol. 2007 Dec;157(6):1148-54.

Tokuda M, Nagaoka S, Torii M. Interleukin-10 inhibits expression of interleukin-6 and -8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor-kappaB deactivation. J Endod. 2002 Mar;28(3):177-80.

Trowbridge H. Histology of pulpal inflammation. In: Hargreaves K, Goodis H, editors. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Carol Stream: Quintessence publishing Co.; 2002. p. 227-45.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. Nature. 1988 Jul 21;334(6179):260-2.

Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in Human Gingival Fibroblasts. J Dent Res. 2007 Mar;86(3):249-54.

van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J. The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. J Clin Periodontol. 1988 Mar;15(3):145-55.

Wang PL, Sato K, Oido M, Fujii T, Kowashi Y, Shinohara M, et al. Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. Arch Oral Biol. 1998 Sep;43(9):687-94.

Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Azuma Y, Daito M, Yasuda H, et al. IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Sep 24;263(2):372-7.

Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Jul 14;273(3):1161-7.

Warfvinge J, Dahlen G, Bergenholz G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. J Dent Res. 1985 Aug;64(8):1046-50.

Watts A, Paterson RC. Pulp response to, and cariogenicity of, a further strain of *Streptococcus mutans* (NCTC 10832). Int Endod J. 1992 May;25(3):142-9.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and Quantitation of *E. faecalis* by Real-time PCR (qPCR), Reverse Transcription-PCR (RT-PCR), and Cultivation During Endodontic Treatment. J Endod. 2006 Aug;32(8):715-21.

Wisithphrom K, Murray PE, Windsor LJ. Interleukin-1 alpha alters the expression of matrix metalloproteinases and collagen degradation by pulp fibroblasts. J Endod. 2006 Mar;32(3):186-92.

Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. J Endod. 2006 Sep;32(9):853-61.

Xie L, Tsapralis G, Chen QM. Proteomic identification of insulin-like growth factor-binding protein-6 induced by sublethal H₂O₂ stress from human diploid fibroblasts. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Sep;4(9):1273-83.

Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov 11;411(21-22):1570-9.

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*. 1995 Sep;63(9):3576-81.

Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *Int Endod J*. 2003 Nov;36(11):774-9.

Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented *Bacteroides* in human pulp cell cultures. *Int Endod J*. 2003 May;36(5):352-7.

Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Su YF, Lai CC, Liu CM, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. *Int Endod J*. 2004 Sep;37(9):588-92.

Zhang Y, Gaekwad J, Wolfert MA, Boons GJ. Synthetic tetra-acylated derivatives of lipid A from *Porphyromonas gingivalis* are antagonists of human TLR4. *Org Biomol Chem*. 2008 Sep 21;6(18):3371-81.

Zhou J, Windsor LJ. *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodontal Res*. 2006 Feb;41(1):47-54.

Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2010 Dec;36(12):1950-5.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):121-7.

Zoletti GO, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and-Independent Approaches. *J Endod*. 2006 Aug;32(8):722-6.

Anexo

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 015/2007

Bauru, 30 de março de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Expressão de pró-colágeno tipo I, MIP-1 α por fibroblastos de gengiva e polpa dental humanas estimulados por ácido lipoteicoico de *Enterococcus faecalis* e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*"**, de autoria de Carla Renata Sipert, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 28 de março de 2007 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos
Docente do Departamento de Ciências Biológicas