**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ANA CAROLINA DE FARIA MORANDINI

**Avaliação do papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de
citocinas por fibroblastos humanos periodontais deficientes desses
receptores**

**BAURU
2012**

ANA CAROLINA DE FARIA MORANDINI

**Avaliação do papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de
citocinas por fibroblastos humanos periodontais deficientes desses
receptores**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Versão Corrigida

**BAURU
2012**

Morandini, Ana Carolina de Faria

M794a Avaliação do papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas por fibroblastos humanos periodontais deficientes desses receptores / Ana Carolina de Faria Morandini. – Bauru, 2012.
128p. : il. ; 30cm.

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 em Pesquisa em Seres Humanos da FOB-USP

Número do processo: 108/2009

Data: 26/08/2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que, de alguma forma, participaram deste trabalho.

*"Obstáculos são aquelas coisas medonhas que você vê
quando tira os olhos de seu objetivo."*

Henry Ford

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo**, escola responsável pela minha formação como cirurgiã-dentista e como pesquisadora, o meu sincero agradecimento e respeito, pelo privilégio de ter a formação acadêmica desta instituição durante esses 10 anos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo financiamento deste trabalho (processo 2010/01230-1) e pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2009/07376-0).

Aos **pacientes voluntários da pesquisa**, por cederem suas gengivas e ligamentos periodontais para fins científicos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, pelo suporte e confiança em meu trabalho.

Ao meu querido amigo **Pedro Paulo Chaves de Souza**, a minha verdadeira gratidão por tudo que me ensinou durante o doutorado e pela excelente colaboração que estabelecemos.

Ao professor colaborador deste trabalho, **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e a toda a **equipe do laboratório de Patologia da FOAr-UNESP**, por me acolherem durante a realização de parte deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Júlio Scharfstein** e toda a sua **equipe do laboratório de Imunologia Molecular do IBCCF-UFRJ**, por me receberem de braços abertos e me proporcionarem momentos de muito aprendizado.

Aos meus colegas de Pós-Graduação: **Carlos Eduardo Repeke, Marcela Claudino, Humberto Schwartz-Filho, Karin Modena, Bella Luna Colombini-Ishikiriana, Carla Sipert, Marta Cunha Lima, Eduardo Aleixo Figueira, Eduardo Belai, Fernanda Veronese, Rubens Maciel, Caio Figueiredo e Dan Brozoski.**

Aos técnicos de laboratório **Thiago Dionísio (Farmaco)**, **Aline Leite** e **Thelma (Bioquímica)**, **André Silva (Microbiologia)**, à **Márcia Graef (CIP)** e também às queridas secretárias **Dalva Oliveira** e **Vera Rufino**, pela atenção e ajuda nos momentos em que mais precisei.

À **Karen** e ao **Grupo Sigma**, por estarem sempre ao meu lado, pela convivência maravilhosa de tantos anos e por compreenderem as minhas ausências em muitos momentos.

À **minha Família** e ao **meu Amore**, por serem as pessoas que mais amo, que posso contar sempre e que estão ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Os fibroblastos são atualmente considerados componentes ativos da resposta imune porque estas células expressam receptores do tipo Toll (TLRs), são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e mediar a produção de citocinas e quimiocinas durante a inflamação. A resposta imune inata do hospedeiro a lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* é incomum, já que diferentes estudos relataram que este LPS pode ser um agonista para TLR2 e um antagonista ou agonista para TLR4. A sinalização por TLRs envolve proteínas adaptadoras, como MyD88 e TRAM, que são necessárias para a transdução do sinal até o núcleo para que ocorra a transcrição de RNAm para os mediadores da inflamação. O objetivo deste estudo foi investigar e comparar se a sinalização por meio de TLR2 ou TLR4 poderia afetar a produção de Interleucina (IL)-6, IL-8 e CXCL12 em fibroblastos humanos gengivais (HGF) e fibroblastos humanos de ligamento periodontal (HPLF). Objetivamos também comparar a participação das moléculas adaptadoras MyD88 e TRAM na expressão do RNAm dos mesmos alvos.

Material e Métodos: Após silenciamento mediado por RNA de interferência de TLR2, TLR4, MyD88 ou TRAM, confirmado por RT-qPCR, HGF e HPLF, provenientes de três doadores voluntários, foram estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis* ou com dois agonistas sintéticos de TLR2, Pam2CSK4 e Pam3CSK4, por 6 horas. A expressão do RNAm e das proteínas IL-6, IL-8, e CXCL12 foram avaliados por qRT-PCR e ELISA, respectivamente. **Resultados:** A expressão do RNAm de TLR2 foi regulada em HGF, mas não em HPLF por todos os estímulos. O silenciamento de TLR2 diminuiu IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS de *P. gingivalis*, Pam2CSK4 e Pam3CSK4 de maneira semelhante, em ambas as subpopulações de fibroblastos ($p < 0,05$). Por outro lado, a produção de CXCL12 permaneceu inalterada pelo silenciamento de TLR2 ou TLR4. No caso do silenciamento de MyD88 e TRAM, em ambos os subtipos de fibroblastos, o RNAm para os mesmos alvos também teve sua expressão diminuída ($p < 0,05$). Já a expressão constitutiva de CXCL12 foi aumentada com o silenciamento de MyD88 ou TRAM ($p < 0,05$). **Conclusão:** Estes resultados sugerem que a sinalização por meio de TLR2, por fibroblastos, as células residentes mais numerosas em gengiva e ligamento periodontal, pode controlar a produção de IL-6 e IL-8, que por sua vez contribuem para a patogênese periodontal, mas não interfere nos níveis de CXCL12, uma quimiocina importante no processo de reparação. Concluímos também que o silenciamento de MyD88 ou TRAM é capaz de diminuir o aumento da transcrição gênica de IL-6 e IL-8 provocado por LPS de *P. gingivalis*, embora a expressão constitutiva de CXCL12 seja regulada positivamente.

Palavras-chave: Fibroblastos. Citocinas. Quimiocinas. *Porphyromonas gingivalis*. Receptores Toll-Like.

ABSTRACT

The role of TLR2 and TLR4 in cytokines production by human periodontal fibroblasts knocked down for these receptors

Fibroblasts are now seen as active components of the immune response because these cells express Toll-like receptors (TLRs), recognize pathogen associated molecular patterns and mediate the production of cytokines and chemokines during inflammation. The innate host response to lipopolysaccharide (LPS) from *Porphyromonas gingivalis* is unusual in that different studies have reported that it can be an agonist for TLR2 and an antagonist or agonist for TLR4. TLRs signaling pathway involves adaptor proteins, like MyD88 and TRAM, which are crucial for signal transduction to the nucleus and mRNA expression of inflammatory mediators. This study investigated and compared whether signaling through TLR2 or TLR4 could affect the production of IL-6, IL-8 and CXCL12 in both human gingival fibroblasts (HGF) and human periodontal ligament fibroblasts (HPLF). The role of MyD88 and TRAM on the mRNA expression of the same targets were also evaluated. **Methods:** After small interfering RNA-mediated silencing of TLR2, TLR4, MyD88 or TRAM, confirmed by RT-qPCR, HGF and HPLF from three volunteer donors were stimulated with *P. gingivalis* LPS or with two synthetic ligands of TLR2, Pam2CSK4 and Pam3CSK4, for 6 hours. IL-6, IL-8, and CXCL12 mRNA expression and protein production were evaluated by RT-qPCR and ELISA, respectively. **Results:** TLR2 mRNA expression was upregulated in HGF but not in HPLF by all the stimuli applied. Knockdown of TLR2 decreased IL-6 and IL-8 in response to *P. gingivalis* LPS, Pam2CSK4 and Pam3CSK4 in a similar manner in both fibroblasts subpopulations. Conversely, CXCL12 remained unchanged by TLR2 or TLR4 silencing. For MyD88 or TRAM silencing, IL-6 and IL-8 mRNA were also decreased, in both fibroblasts subtypes. However CXCL12 mRNA constitutive expression was increased by siMyD88 or siTRAM. **Conclusion:** These results suggest that signaling through TLR2 by fibroblasts, the most numerous resident cells in gingiva and periodontal ligament, may control the production of IL-6 and IL-8, which in turn contribute to periodontal pathogenesis, but does not interfere with CXCL12 levels, an important chemokine in the repair process. Also, MyD88 or TRAM knockdown may decrease the IL-6 and IL-8 LPS-induced upregulation and increase the constitutive CXCL12 mRNA.

Keywords: Fibroblasts. Cytokines. Chemokines. *Porphyromonas gingivalis*. Toll-like receptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** A sinalização via TLRs. Adaptado de Kawai e Akira (2011)..... **27**
- Figura 2 -** **Caracterização fenotípica de HGF e HPLF pela imunomarcação da proteína FSP.** Depois de plaqueadas a uma densidade de 10^4 células / poço, em lâminas de câmara de oito poços, as células foram estimuladas por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL) ou com meio apenas (Medium), durante 24 h. HGF e HPLF apresentaram uma coloração positiva para a proteína FSP (verde) e os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). Barra de escala = 10 µm..... **45**
- Figura 3 -** **Confirmação do silenciamento de TLR2 (A e B) e TLR4 (C e D) pela expressão do mRNA em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h.** A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando-se os ensaios TaqMan de expressão gênica e, em seguida, foram normalizados utilizando o gene de referência RPL13A. Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$)..... **49**

Figura 4 -	Confirmação do silenciamento de MyD88 (A) e TRAM (B) pela expressão do mRNA em fibroblastos estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando-se SyBr Green e foram normalizados utilizando o gene de referência RPL13A. Os valores estão representados como médias ± EPM de 3 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes.....	51
Figura 5 -	Viabilidade celular de HGF e HPLF frente ao silenciamento de TLRs e suas moléculas adaptadoras. A viabilidade celular foi testada pelo ensaio de MTT em HGF e HPLF silenciados para TLR2, TLR4, MyD88 ou TRAM em comparação com o controlo negativo (siSCR). As células não-silenciadas foram definidas como 100% de viabilidade e os valores de densidade óptica foram normalizados pelo controle não-silenciado (meio). Os valores são representados como médias ± EPM de 3 poços por grupo. * Indica diferença estatística em relação ao grupo Meio (p<0,05).....	53
Figura 6 -	Regulação da expressão do mRNA de TLR2 (A) e TLR4 (B) em HGF e HPLF estimulados por LPS de <i>P. gingivalis</i> (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por RPL13A (gene de referência). Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística entre HGF e HPLF no mesmo grupo (p<0,01).....	57

Figura 7 - Efeito do silenciamento de TLR2 e TLR4 sobre a regulação da expressão de mRNA de IL-6 (A, C, E) e produção de proteína (B, D, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram quantificados por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e normalizados com RPL13A (gene de referência). Os níveis de proteína nos sobrenadantes de células foram avaliadas por ELISA. Os valores estão representados como médias $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$). # Indica diferença estatística no siSCR entre HGF e HPLF ($p < 0,05$)....

61

Figura 8 - Efeito do silenciamento de TLR2 e TLR4 sobre a regulação da expressão de mRNA de IL-8 (A, C, E) e produção de proteína (B, D, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram quantificados por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e normalizados com RPL13A (gene de referência). Os níveis de proteína nos sobrenadantes de células foram avaliadas por ELISA. Os valores estão representados como médias $\pm$ EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$). # Indica diferença estatística no siSCR entre HGF e HPLF ($p < 0,05$)....

65

Figura 9 - Efeito do silenciamento de TLR2 e TLR4 sobre a regulação da expressão de mRNA de CXCL12 (A, C, E) e produção de proteína (B, D, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram quantificados por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e normalizados com RPL13A (gene de referência). Os níveis de proteína nos sobrenadantes de células foram avaliadas por ELISA. Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos (p<0,01). # Indica diferença estatística no siSCR entre HGF e HPLF (p<0,05).....

69

Figura 10 - Efeito do silenciamento de MyD88 ou TRAM sobre a regulação da expressão de mRNA de IL-8 (A, B, C) e IL-6 (D, E, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados utilizando RPL13A (gene de referência). Os valores são representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos (p<0,01).....

73

Figura 11 - Efeito do silenciamento de MyD88 ou TRAM sobre a regulação da expressão de mRNA de CXCL12 em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados utilizando RPL13A (gene de referência). Os valores são representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$).....

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole - 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> - Ensaio imunoenzimático
FSP	Fibroblast surface protein – Proteína de superfície de fibroblasto
HGF	<i>human gingival fibroblast</i> – Fibroblasto de Gengiva Humana
HPLF	<i>human periodontal ligament fibroblast</i> – Fibroblasto de Ligamento Periodontal Humano.
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IRF	<i>Interferon Regulated Factor</i> – Fator regulador de Interferon
LPS	Lipopolissacarídeo
MAL/TIRAP	<i>MyD88-adaptor like</i> – Adaptador MyD88-similar
mRNA	<i>messenger RNA</i> - RNA mensageiro
MTT	3-(4,5)-Dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide – brometo de 3-(4,5)-Dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio.
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i> – Fator de diferenciação mielóide 88
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Fator nuclear kappa B
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> – Domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo

<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Solução salina tamponada por fosfato
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline in Tween 20</i> - Solução salina tamponada por fosfato em Tween 20 0,05%
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> – Receptores de Reconhecimento de Padrões
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription – quantitative Polymerase chain reaction</i> – Transcrição reversa seguida de reação quantitativa em cadeia da polimerase
SARM	<i>Sterile alpha and TIR motif containing protein</i> - Proteína contendo domínios TIR e SAM
SDF-1 (CXCL12)	<i>Stromal Cell-Derived Factor or chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i> – Fator celular derivado de estroma ou Quimiocina CXCL12
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	<i>small interfering RNA</i> - RNA de interferência
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> – Fator de crescimento transformador
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> – Receptor <i>Toll-like</i>
TRAM	<i>TRIF related adaptor molecule</i> – Molécula adaptadora relacionada à TRIF
TRIF	<i>TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta</i> – proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon-beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	17
1.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i> e sua associação com doenças periodontais	19
1.2	Fibroblastos como células-sentinela da gengiva e do ligamento periodontal	20
1.3	LPS de <i>P. gingivalis</i>.....	21
1.4	Resposta de Fibroblastos frente ao LPS de <i>P. gingivalis</i>.....	23
1.5	A sinalização via TLRs e sua interação com <i>P. gingivalis</i> e seu LPS....	24
2	PROPOSIÇÃO	29
2.1	Objetivo geral.....	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Cultura primária de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal ..	35
3.2	Imunofluorescência.....	35
3.3	Transfecção com siRNA e estímulo dos fibroblastos	36
3.4	Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	37
3.5	RT-qPCR	37
3.6	ELISA	38
3.7	Análise Estatística	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Caracterização fenotípica de HGF e HPLF	43
4.2	Silenciamento de TLR2 e TLR4 foi de aproximadamente 90% e silenciamento de MyD88 e TRAM foi entre 82% e 96%	47
4.3	RNAm de TLR2 foi mais expresso em HGF quando comparado com HPLF	55
4.4	O aumento de IL-6 foi parcialmente impedido pelo silenciamento de TLR2 e foi maior em HPLF estimulado por agonistas sintéticos de TLR2	59
4.5	Aumento de IL-8 em fibroblastos estimulados foi diminuído com o silenciamento de TLR2.....	63

4.6	A produção proteica de CXCL12 não é influenciada pelo silenciamento de TLR2 nem por TLR4.....	67
4.7	Aumento da expressão de RNAm de IL-8 foi parcialmente impedido por siMyD88 ou siTRAM em HGF e HPLF. O RNAm de IL-6 foi regulado por MyD88 ou TRAM, dependendo do estímulo	71
4.8	A expressão constitutiva do RNAm de CXCL12 foi influenciada por siMyD88 ou siTRAM	75
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE	105
	ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Porphyromonas gingivalis* e sua associação com doenças periodontais

As doenças periodontais (DPs), cuja etiologia está relacionada com a placa dental bacteriana, afetam os tecidos de proteção e sustentação do dente (LOESCHE, 1993). Em condições de saúde plena, os tecidos periodontais convivem com a microbiota comensal e até mesmo com microrganismos patogênicos. As espécies bacterianas que formam o biofilme são agrupadas em complexos identificados por cores, sendo a *Porphyromonas gingivalis* um componente do grupo considerado mais patogênico, chamado complexo vermelho. Antes dessas, a placa bacteriana é sucessivamente colonizada por bactérias dos complexos verde, amarelo, roxo e laranja (SOCRANSKY et al., 1998). Atualmente mais de 700 espécies de bactérias foram detectadas na cavidade bucal (HOJO et al., 2009), e essas espécies bacterianas têm um importante papel na manutenção da saúde oral e na etiologia das doenças da cavidade bucal (KUMAR et al., 2005; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

O acúmulo de biofilme dental é acompanhado por uma mudança na composição da microbiota da placa bacteriana. Inicialmente composta por um biofilme dominado por bactérias Gram-positivas, geralmente encontradas em indivíduos saudáveis, a placa bacteriana se altera para um microambiente rico em bactérias Gram-negativas anaeróbias, frequentemente observadas na periodontite (HOJO et al., 2009). Dessa maneira, uma grande quantidade de produtos microbianos e intensa carga antigênica estão presentes no sulco gengival, sendo o tecido conjuntivo invadido por células e mediadores inflamatórios (KINANE; LAPPIN, 2001; YAMAZAKI; YOSHIE; SEYMOUR, 2003). A periodontite é, portanto, um exemplo de doença cuja evolução é influenciada pela resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro, envolvendo a participação de diversos tipos celulares que atuam no microambiente local e modulam a resposta do hospedeiro em busca do controle da infecção. Uma resposta imunológica exacerbada frente ao constante ataque bacteriano no tecido periodontal pode resultar no desenvolvimento da doença (LOESCHE, 1993; TENG, 2003).

Apesar de a presença de microrganismos patogênicos ser necessária para o início e desenvolvimento da doença periodontal, tem-se mostrado que a amplificação e progressão deste processo são altamente dependentes da resposta imune gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou seus produtos (KINANE; ATTSTROM, 2005; KINANE et al., 2007; KINANE; LAPPIN, 2001). Dentre o grande número de bactérias presentes na cavidade bucal apenas um pequeno grupo de patógenos é reconhecido por sua forte associação com a periodontite, progressão da doença e insucesso na terapia (SOCRANSKY et al., 1998). São eles *Aggregatibacter actinomycetencomitans*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*.

A *P. gingivalis* é um bacteróide Gram-negativo, não móvel de pigmentação negra, asacarolítico, ou seja, que não utiliza a quebra da sacarose como fonte de energia, necessita de um ambiente anaeróbio para crescer, e a presença de heme ou hemina assim como vitamina K no seu conjunto de nutrientes. Seu ganho de energia é pela fermentação de aminoácidos, uma propriedade decisiva para a sobrevivência em bolsas periodontais profundas, onde a presença de açúcares é extremamente rara e o sangramento constante favorece a presença de heme disponível. A pigmentação negra das colônias de *P. gingivalis* observada em placas de Agar sangue está associada à agregação de heme na superfície da célula (LIU et al., 2004; SMALLEY et al., 2006). Esta propriedade é de alguma forma ligada à sua capacidade de agir como um patógeno oportunista, já que quando a *P. gingivalis* é cultivada em um meio pobre em heme, ela se torna menos virulenta (MCKEE et al., 1986).

A *P. gingivalis* é capaz de invadir células e tecidos do hospedeiro como parte de sua estratégia de sobrevivência (YILMAZ, 2008), evitando assim a vigilância imunitária. *P. gingivalis* pode invadir células epiteliais (LAMONT et al., 1995), endoteliais (DESHPANDE; KHAN; GENCO, 1998) e fibroblastos de gengiva (AMORNCHAT et al., 2003) onde podem se manter viáveis e até mesmo replicarem.

1.2 Fibroblastos como células-sentinela da gengiva e do ligamento periodontal

Os fibroblastos são o principal tipo celular residente nos tecidos do ligamento periodontal, que compõem o periodonto de sustentação e da gengiva marginal, que

integram o periodonto de proteção, sendo que a reação dessas células a diferentes estímulos microbianos, incluindo bactérias Gram-negativas e seus fatores de virulência, tem sido estudada em diversas situações (WANG et al., 2000; WANG et al., 2001; YAMAJI et al., 1995). O reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos patogênicos (PAMPs) por estas células é possível porque fibroblastos expressam os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs).

Dentre os PRRs, os mais estudados são os receptores Toll-Like (TLRs). Já é sabido que fibroblastos gengivais humanos (HGF) expressam receptores do tipo Toll (TLR) 1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, além de expressarem a proteína de diferenciação mielóide 2 (MD-2), a molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), receptores da família NLR, e também que fibroblastos do ligamento periodontal (HPLF) expressam TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2 (TANG et al., 2011).

TLRs são receptores-sentinela e sua estimulação culmina com a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e fatores reguladores de Interferon (IRF_s), que promovem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outras proteínas que promovem a defesa do hospedeiro (MIGGIN; O'NEILL, 2006).

Nos seres humanos, 11 TLRs diferentes foram identificados que reconhecem diferentes moléculas nativas de bactérias, fungos, protozoários e vírus (KAWAI; AKIRA, 2006; UEMATSU; AKIRA, 2006). TLR4, o primeiro TLR identificado, reconhece lipídeo A, uma parte da molécula dos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. TLR2 pode reconhecer vários componentes microbianos, incluindo lipoproteínas, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, fímbrias e também alguns LPS.

1.3 LPS de *P. gingivalis*

Como todas as bactérias Gram-negativas, *P. gingivalis* contém LPS, um componente da sua membrana reconhecido pelas células do hospedeiro que pode estimular sinais intracelulares. A afinidade do LPS aos PRRs, tais como TLRs e CD14, permite também o reconhecimento entre bactérias comensais e patogênicas. O LPS de *P. gingivalis* é um estimulador de resposta inflamatória e também um

estimulador de reabsorção óssea como demonstrado na literatura (CHIANG et al., 1999; NISHIDA et al., 2001).

Estudos *in vitro* têm demonstrado estimulação de citocinas pró-inflamatórias por LPS em diversos tipos celulares (BOSTANCI et al., 2007; MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011). Porém, o LPS de *P. gingivalis* possui algumas características controversas quando consideramos a indução de uma resposta inflamatória por LPS. Além de ser um estimulador mais fraco que o LPS de outras bactérias Gram-negativas (ex. enteropatogênicas) (LIU et al., 2008), este pode também antagonizar a capacidade de estimular citocinas de outros patógenos (BOSTANCI et al., 2007; BOSTANCI et al., 2007).

Estruturalmente, o LPS de *P. gingivalis* exibe algumas características únicas quando comparados ao LPS de outras espécies (enterobactérias). Diferenças na resposta devem-se ao fato da *P. gingivalis* ter uma mudança na estrutura do antígeno-O, assim como diferentes padrões de acetilação e capacidade de ativação de receptores no componente lipídeo A (PARAMONOV et al., 2001; PARAMONOV et al., 2009). Enquanto o lipídeo A da maioria dos LPS de bactérias Gram-negativas é um potente ativador de resposta por TLR4, o lipídeo A de *P. gingivalis* é predominantemente ativador de uma resposta por TLR2 e pode agir como antagonista de TLR4 (DARVEAU et al., 2004), diminuindo assim a resposta inflamatória (HAJISHENGALLIS, 2009). As preparações de LPS de *P. gingivalis* contêm várias moléculas de LPS com diversos efeitos diferentes sobre TLR2 e TLR4, bem como uma lipoproteína, não presente em LPS, proveniente de outras bactérias Gram-negativas, que ativa especificamente TLR2 (HASHIMOTO; ASAI; OGAWA, 2004).

Estudos mostram que a capacidade da porção lipídeo A da molécula de LPS de *P. gingivalis* funcionar como um agonista ou antagonista para TLRs pode ser modulada não só por fatores ambientais, tais como a concentração de hemina no microambiente bacteriano (COATS et al., 2009), mas também por meio da interação entre TLR2 e o receptor de quimiocina CXCR4, um receptor acoplado à proteína-G (ligante de CXCL12) (HAJISHENGALLIS et al., 2008) nas células do hospedeiro. Coletivamente, essas modificações e heterogeneidade do LPS de *P. gingivalis* podem resultar em ações opostas e desregulação imunológica. Estrategicamente, essas modificações estão em linha com o pensamento de

manipulação da resposta imune do hospedeiro pela *P. gingivalis* para facilitar sua adaptação e sobrevivência no hospedeiro.

1.4 Resposta de Fibroblastos frente ao LPS de *P. gingivalis*

A literatura apresenta vastas evidências de que HGF, bem como HPLF secretam citocinas e quimiocinas (KURU et al., 1998; TAKASHIBA; NARUISHI; MURAYAMA, 2003; VERARDI et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2006). Além disso, fibroblastos não estimulados produzem uma concentração basal de citocinas quimiotáticas tais como CXCL12 e CCL3 (LUKACS et al., 1994) e o padrão de quimiocinas expressas pode variar com o tipo de tecido (BROUTY-BOYE et al., 2000).

Neste contexto, CXCL12 regula tanto a chegada quanto a saída de células-tronco e progenitoras endoteliais na medula óssea e sua migração para os tecidos periféricos, uma característica que fundamenta a contribuição de CXCL12 em importantes processos fisiológicos, tais como angiogênese e reparação tecidual (LAPIDOT; DAR; KOLLET, 2005; LAU; WANG, 2011). Além disso, CXCL12 encontrou-se aumentada em amostras obtidas a partir de indivíduos periodontalmente comprometidos e a migração de neutrófilos foi também aumentada na presença dessa quimiocina (HAVENS et al., 2008). CXCL12 age como um quimioatraente de células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais e é uma quimiocina que sustenta a sobrevivência e proliferação dessas células (KORTESIDIS et al., 2005). Em um estudo recente, CXCL12 foi reconhecida por promover a viabilidade e proliferação celular, afetar a diferenciação, além de exercer um efeito migratório sobre as células-tronco do ligamento periodontal *in vitro* (DU; YANG; GE, 2012).

Por outro lado, a quimiocina IL-8/CXCL8 é um importante mediador pró-inflamatório e entre as citocinas e quimiocinas produzidas por fibroblastos, IL-8, é um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos, que desempenha papel crucial na primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989). IL-8 é primariamente liberada por monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, participando da ativação e

degranulação de neutrófilos. Portanto, essa quimiocina está associada com a severidade da periodontite e com a destruição tecidual periodontal. Nesse contexto, IL-6 é também uma citocina pró-inflamatória reconhecida pelos seus efeitos sobre a maturação e ativação das células B e T, macrófagos, osteoclastos, condrócitos e células endoteliais (KISHIMOTO, 2005). Além disso, a IL-6 é uma citocina pleiotrópica com uma ampla gama de efeitos de resposta imune humoral e celular relacionados com a inflamação, defesa do hospedeiro e lesão tecidual (PAPANICOLAOU et al., 1998), estando associada com a formação de osteoclastos e reabsorção óssea. Em estudo anterior do nosso grupo, um padrão diferencial de produção de IL-6 entre HGF e HPLF foi observado *in vitro* (MORANDINI et al., 2010). Além disso, as citocinas da família da IL-6 foram reguladas por TLR2 em HGF quando estimulados por LPS proveniente de *P. gingivalis* (SOUZA et al., 2010).

No entanto, até o momento, nenhum estudo anterior abordou a possível regulação de IL-6 e IL-8 por TLR2 ou TLR4 em HPLF em comparação com HGF, dos mesmos doadores, com a estimulação por LPS de *P. gingivalis*. Além disso, este é o primeiro estudo a investigar se a secreção de CXCL12 é influenciada pelo silenciamento de TLR2 ou TLR4.

1.5 A sinalização via TLRs e sua interação com *P. gingivalis* e seu LPS

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana tipo I, possuem em sua estrutura um domínio TIR (Toll-IL-1 receptor) e tais receptores sinalizam por meio do recrutamento de várias proteínas adaptadoras que contêm esse mesmo domínio TIR (Figura 1) (O'NEILL; BOWIE, 2007). A sinalização de TLRs envolve, então, uma família de quatro proteínas adaptadoras, que se ligam a proteínas quinases para finalmente levar à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e os membros da família do fator regulador de interferon (IRF). Estes adaptadores são: a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), *MyD88-adaptador-like* (MAL, também conhecido como TIRAP) que é um adaptador de ligação para MyD88, contendo domínio TIR. Ainda, a proteína contendo domínio TIR indutora de interferon (TRIF; também conhecido como TICAM1) e a molécula

adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM; também conhecido como TICAM2) (O'NEILL; BOWIE, 2007).

Todos os TLRs, exceto TLR3, precisam de MyD88 para a sinalização (O'NEILL; BOWIE, 2007). Essa proteína adaptadora é crucial porque se adapta diretamente aos dímeros de receptores ativados, exceto no caso de TLR4, que se liga indiretamente à MyD88, por meio de MAL, e TLR3, que sinaliza exclusivamente pela indução da proteína adaptadora que contém domínio TIR e indutora de IFN, o TRIF (GAY; GANGLOFF; O'NEILL, 2011) (Figura 1). As quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK) -1, IRAK-2 e IRAK-4 são quinases-chave que são ativadas por TLRs, via MyD88.

MyD88 é uma proteína modular e, juntamente com um domínio TIR, contém um domínio de morte (DD), pelo qual recruta as IRAKs para o complexo do receptor. O domínio TIR de MyD88 interage com o TIR dos TLRs, e o DD de MyD88 interage com o DD de IRAK4, o que forma um grande complexo protéico chamado de “*Mydososome*” (LIN; LO; WU, 2010). A ativação de IRAKs envolve cascatas de autofosforilação e fosforilação cruzada de várias moléculas *downstream* que culminam com a ativação de NF- κ B (BUTLER; HANLY; MOYNAGH, 2007). Este é o fator de transcrição, envolvido na inflamação, mais estudado porque regula um grande número de genes envolvidos neste processo, bem como na resposta imune (BARTON; KAGAN, 2009).

O adaptador TRIF é utilizado por TLR3 para sinalizar para o fator de transcrição IRF 3, o que leva à indução de genes tais como IFN- β . O adaptador de ligação para TRIF, ou seja, TRAM é usado apenas pelo TLR4 e é necessário para recrutar TRIF. No caso de TLR4, esse mecanismo proporciona controles adicionais sobre sinalização por esse receptor, porque TRAM é uma proteína regulada pela fosforilação de proteínas quinase (MCGETTRICK et al., 2006). Existe ainda um quinto adaptador chamado de SARM (proteína contendo domínios TIR e SAM), que tem mostrado capacidade de inibir a sinalização por TRIF e, assim, limitar a via de IRF3, que é ativado por TLR3 e TLR4 (CARTY et al., 2006).

Em relação à interação da via de TLRs com *P. gingivalis*, há resultados que demonstram que o lipídeo A do LPS da mesma induz a ativação celular por meio de uma via TLR4/MyD88-dependente, e sugerem a possibilidade de que componentes bacterianos desconhecidos, presentes no LPS de *P. gingivalis* e na sua porção

lipídica, pudessem induzir a ativação das células através de TLR2 (OGAWA et al., 2002). Já no modelo de infecção por essa bactéria *in vivo*, foi demonstrado que a produção de citocinas inflamatórias era dependente de TLR2, mas independente de MyD88, porém este foi indispensável para a eliminação do patógeno (BURNS et al., 2010). Um estudo mais recente mostrou que a *P. gingivalis* modula a diferenciação de osteoclastos via TLR2/ MyD88 (ZHANG et al., 2011).

Abordando a participação de fibroblastos nesse contexto, um estudo anterior a este mostrou que HGF pré-tratados com interferon gama tiveram aumento de IL-8 induzido por LPS de *P. gingivalis* por meio da expressão aumentada de RNAm de MyD88 (TAMAI et al., 2002). Outro trabalho demonstrou que a sinalização por TLR4 via MyD88 e TRIF exerceu regulação diferencial na resposta de células T CD4⁺ ao fator de virulência hemaglutinina B de *P. gingivalis* (GADDIS; MICHALEK; KATZ, 2011). No entanto, até o presente estudo, nenhuma comunicação anterior abordou a possível contribuição desses dois adaptadores importantes da sinalização via TLRs na expressão de RNAm de IL-6 e IL-8 não somente por HGF, mas também por HPLF dos mesmos doadores, sob estimulação pelo LPS de *P. gingivalis*. Além disso, este é o primeiro estudo a investigar se o silenciamento de MyD88 ou TRAM influencia a expressão de RNAm para CXCL12 pelas células mais numerosas e não-imunoprofissionais provenientes de gengiva e ligamento periodontal, os fibroblastos.

Figura 1 - A sinalização via TLRs. Adaptado de Kawai e Akira (2011).

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar o papel dos receptores TLR2 e TLR4 quanto à expressão e produção de citocinas por fibroblastos humanos de gengiva e ligamento periodontal frente ao estímulo do fator de virulência LPS do periodontopatógeno *P. gingivalis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de receptores TLR2 e TLR4 por fibroblastos humanos provenientes de gengiva e de ligamento periodontal dos mesmos doadores estimulados por LPS de *P. gingivalis*.
- Avaliar o efeito do silenciamento, por meio de RNA de interferência, dos receptores TLR2 e TLR4 na expressão gênica e produção da citocina IL-6 e quimiocinas IL-8/CXCL8 e CXCL12 por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, estimulados por LPS de *P. gingivalis*.
- Avaliar o efeito do silenciamento, por meio de RNA de interferência, das moléculas adaptadoras participantes da via de TLRs, MyD88 e TRAM, na expressão gênica da citocina IL-6 e quimiocinas IL-8/CXCL8 e CXCL12 por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, estimulados por LPS de *P. gingivalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura primária de fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal

Os fibroblastos foram isolados e cultivados a partir de tecido gengival e de ligamento periodontal provenientes de três doadores voluntários sistemicamente saudáveis e ausentes de doença periodontal (faixa etária de 16 a 26 anos), como descrito anteriormente (MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011; SIPERT et al., 2010). Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com os regulamentos do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (PROCESSO 108/2009; Anexo A). Resumidamente, fibroblastos de ligamento periodontal foram coletados a partir do tecido do terço médio radicular de terceiros molares extraídos, com auxílio de curetas periodontais. Ao mesmo tempo, as biópsias de tecido gengival foram recuperadas a partir da margem gengival dos mesmos doadores. As células foram obtidas pelo método de explantes do ligamento periodontal e tecido gengival, sendo os tecidos picotados com auxílio de tesoura para tecido e lâmina de bisturi (número 15c) e cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) e antibióticos (100 UI/mL penicilina/estreptomicina) e foram utilizados entre a 4ª e 10ª passagens para todas as análises comparativas.

3.2 Imunofluorescência

HGF e HPLF provenientes dos mesmos doadores foram cultivados em lâminas com câmara de oito poços, a uma densidade de 10^4 células / poço. Após semeadas, as células foram estimuladas por LPS de *P. gingivalis* (InvivoGen, San Diego, CA), na concentração de 1 µg/mL, durante 24 h. O meio de cultura de células DMEM foi utilizado como um controle negativo do estímulo. Após fixação com paraformaldeído 4% durante 15 minutos, as células foram incubadas com PBS 3%

de albumina de soro bovino durante 30 minutos em temperatura ambiente, seguida da incubação com anticorpo monoclonal primário feito em camundongo (1:100), concentração final 2 µg/mL, anti-proteína humana de superfície de fibroblastos (FSP; *ab 11333*, Abcam, Cambridge, UK) ou com uma imunoglobulina (IgG1), como controle negativo da marcação, durante a noite a 4°C, e finalmente com anticorpo secundário anti-camundongo, feito em coelho, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:400; *ab 8517*, Abcam, Cambridge, UK), concentração final 3 µg/mL, a 37°C ao abrigo da luz, durante 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram montadas com um meio de montagem contendo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e depois analisadas por microscopia confocal a laser (Leica TCS SPE, Mannheim, Germany).

3.3 Transfecção com siRNA e estímulo dos fibroblastos

Para o silenciamento mediado por siRNA de TLR2 e TLR4, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $8,5 \times 10^3$ células por poço em DMEM suplementado com SFB 10%. Após semeados, os fibroblastos foram transfectados com siRNA *scrambled* (SCR) (controle negativo), TLR2 ou TLR4 siRNA diluídos em meio reduzido de soro (OptiMEM; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) na concentração de 30 nM com um reagente de transfecção à base de lipossoma (Lipofectamina 2000; Invitrogen Corp., Life Technologies, Carlsbad, CA). No dia seguinte, o procedimento de silenciamento dos genes foi repetido. Quatro horas após a segunda transfecção, os meios foram trocados por DMEM com SFB 10%, sem antibióticos até o dia seguinte. Quarenta e oito horas após a primeira transfecção, os meios foram trocados por DMEM com SFB 1% sem antibióticos, com ou sem a adição de LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (agonista de TLR2/6, 50 ng/mL), ou Pam3CSK4 (agonista de TLR2/1, 500 ng/mL). Seis horas após o desafio, o RNA total foi extraído para a transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) e o sobrenadante foi recolhido para ensaio imunoenzimático (ELISA). Para siMyD88 e siTRAM, o mesmo procedimento foi realizado, sendo o RNA total extraído para a RT-qPCR. Os seguintes siRNAs (Ambion Inc., Life Technologies, Austin, TX) foram utilizados:

TLR2 (ID # 111285), TLR4 (ID # 112337), MyD88 (IDs#s9136, s9137 e s9138), TRAM (ID#s51476, s51477 e s51478) e Controle *Silencer* negativo (SCR) # 1 (AM4635). A fim de controlar a viabilidade de fibroblastos, as culturas foram analisadas quanto a alterações morfológicas, sob microscopia, no início e no final do período de incubação. Além disso, ensaios de viabilidade com brometo de 3-(4,5)-Dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR) foram realizados para cada siRNA para verificar que o número de células era equivalente entre eles.

3.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT

As células foram semeadas em placas de 96 poços e armazenadas em incubadora por 18 horas, a 37°C e 5 % de CO₂. Decorrido este tempo, foi feito silenciamento gênico das células, conforme descrito acima. Após o tempo de transfecção, em cada poço, foram adicionados 200 µL da solução de MTT 5 mg/mL em cada poço e as placas foram incubadas por 4h a 37°C e 5 % de CO₂, ao abrigo da luz. Após a remoção e descarte da solução, foi adicionado o mesmo volume de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em cada poço para dissolução dos cristais azuis que coraram as mitocôndrias das células viáveis, ou seja, que foram capazes de reduzir o MTT. Em seguida, a absorbância foi medida por espectrofotometria no aparelho leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany), em comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância média foram corrigidos pelo branco (somente meio) e os resultados foram mostrados como densidade óptica.

3.5 RT-qPCR

O RNA total e o cDNA foram obtidos diretamente a partir das células usando-se o Kit Cells-to-Ct (AM 1729, Ambion Inc., Life Technologies, Austin, TX), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e incubadas durante 5 minutos com solução de lise

e DNase fornecidas com o kit. Após esta incubação, uma solução de parada da reação foi adicionada durante 2 minutos e a transcrição reversa (RT) foi realizada adicionando-se o tampão para RT misturado à enzima fornecida com o Kit ao lisado de células. Em seguida, foi realizada uma incubação a 37°C durante 60 minutos e um passo subsequente de 95°C durante 5 minutos para parar a reação. A qPCR foi realizada utilizando o TaqMan Gene Expression PCR master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, U.K) e primers e sondas pré-desenhadas para TLR2 (Hs00152932_m1), TLR4 (Hs00152939_m1), IL-6 (Hs00985639_m1), IL-8 (Hs00174103_m1) e CXCL12 (Hs00171022_m1). Todos os experimentos foram realizados em um equipamento do modelo ViiA 7 (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, U.K) usando o método do limiar do ciclo comparativo (Ct) ($\Delta\Delta Ct$). Para confirmação do silenciamento de MyD88 e TRAM, o sistema SyBr Green (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, U.K) foi utilizado. O gene humano da proteína ribossomal L13a (RPL13A) foi adotado como o gene de referência para todas as reações porque foi o gene de referência mais estável nas nossas experiências, em comparação com 18S e GAPDH (dados não mostrados). Todas as reações foram realizadas compreendendo 40 ciclos, com etapa de desnaturação à 95°C, anelamento e extensão à 60°C, utilizando-se os primers a uma concentração final de 0,4µM e sonda 0,2µM em um volume final de 5 µL por reação, em placas de 384 poços. Para as reações de confirmação do silenciamento de MyD88 e TRAM, no sistema SyBr Green, foi incluída a etapa de curva de desnaturação. A seguir estão as sequências dos primers e sonda RPL13A: senso CCG CTC ACC TGG GTC TCA A; anti-senso CCT GGT ACT TCC AGC CAA CCT; sonda VIC-TGA CGG CCC CAT ACC GCC CT-TAMRA. Primers de MyD88 (senso TCC TGC TGC TGC TTC AAG AT; anti-senso GAC TGC TCG AGC TGC TTA CC) e TRAM (senso TCC AAG GCA GAA GAG GAA AA ; anti-senso TTA AGA GAA GCT CAA GGC CG).

3.6 ELISA

Para quantificar as proteínas, a reação de ELISA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se kits de ELISA comercialmente

disponíveis para a IL-6 e IL-8 (88-7066/87-88, Read-set-go!, eBiosciences, San Diego, CA) e para CXCL12 (DSA00, Quantikine, R&D Systems, Abingdon, UK). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais humanos (anticorpos de captura) para cada alvo. Após o bloqueio durante 2 horas, a fim de evitar a ligação não específica, IL-6 recombinante humana, IL-8 ou CXCL12 ou sobrenadantes de cultura foram adicionados. As citocinas foram detectadas após a ligação dos anticorpos de detecção (biotinilados) depois da ligação da enzima estreptavidina em cada poço. A microplaca foi lavada para remover anticorpos não ligados com a enzima. A reação colorimétrica resultante da adição do substrato foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1 M, e as placas foram lidas a 450 nm por um leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os limites de detecção dos três ensaios de ELISA foram respectivamente: IL-6 (sensibilidade > 1,5 pg/mL), IL-8 (sensibilidade > 3,9 pg/mL) e CXCL12 (sensibilidade > 156 pg/mL). As concentrações de citocinas foram determinadas por interpolação de uma curva padrão e foram apresentadas como pg/mL ($\pm$ erro padrão da média) para amostras em duplicata de cada uma das condições testadas.

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os dados foram comparados usando-se o teste one-way ANOVA entre os grupos e as diferenças foram identificadas pelo método de Bonferroni, adotando-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica de HGF e HPLF

Para confirmar o fenótipo das células humanas e por serem as células do ligamento periodontal consideradas uma população muito heterogênea, HGF e HPLF foram imunomarcadas com um marcador de fibroblastos conhecido como proteína de superfície de fibroblastos (FSP). Ambos, HGF e HPLF exibiram marcação positiva para o FSP (Figura 2), confirmando o fenótipo fibroblástico das células. Além disso, o sinal positivo foi mantido em ambas as células sob a estimulação com o LPS de *P. gingivalis* e observou-se um ligeiro aumento na intensidade de coloração para HPLF desafiados, em comparação com HPLF não estimulados (Medium).

Figura 2 - Caracterização fenotípica de HGF e HPLF pela imunomarcagem da proteína FSP. Depois de plaqueadas a uma densidade de 10^4 células / poço, em lâminas de câmara de oito poços, as células foram estimuladas por LPS de *P. gingivalis* (1 μ g/mL) ou com meio apenas (Medium), durante 24 h. HGF e HPLF apresentaram uma coloração positiva para a proteína FSP (verde) e os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). Barra de escala = 10 μ m.

4.2 Silenciamento de TLR2 e TLR4 foi de aproximadamente 90% e silenciamento de MyD88 e TRAM foi entre 82% e 96%

Silenciamento satisfatório para TLRs e seus adaptadores foi alcançado. O silenciamento de TLR2 (Figuras 3A e 3B) e TLR4 (Figuras 3C e 3D) foi de aproximadamente 90%, em HGF e em HPLF. O silenciamento das moléculas adaptadoras MyD88 (Figura 4A) e TRAM (Figura 4B) foi entre 82% e 96%, considerando ambos HGF e HPLF. É importante salientar que isso não foi devido à morte de células, já que a viabilidade celular foi verificada pelo método de MTT e não houve diferença significativa entre as células silenciadas com siSCR, siTLR2, siTLR4, siMyD88 ou siTRAM em HPLF e para HGF, o grupo siTRAM apresentou maior viabilidade celular (Figura 5).

Figura 3 - Confirmação do silenciamento de TLR2 (A e B) e TLR4 (C e D) pela expressão do mRNA em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando-se os ensaios TaqMan de expressão gênica e, em seguida, foram normalizados utilizando o gene de referência RPL13A. Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos (p<0,01).

Figura 4 - Confirmação do silenciamento de MyD88 (A) e TRAM (B) pela expressão do mRNA em fibroblastos estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 μ g/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando-se SyBr Green e foram normalizados utilizando o gene de referência RPL13A. Os valores estão representados como médias $\pm$ EPM de 3 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 5 - Viabilidade celular de HGF e HPLF frente ao silenciamento de TLRs e suas moléculas adaptadoras. A viabilidade celular foi testada pelo ensaio de MTT em HGF e HPLF silenciados para TLR2, TLR4, MyD88 ou TRAM em comparação com o controlo negativo (siSCR). As células não-silenciadas foram definidas como 100% de viabilidade e os valores de densidade óptica foram normalizados pelo controle não-silenciado (meio). Os valores são representados como médias $\pm$ EPM de 3 poços por grupo. * Indica diferença estatística em relação ao grupo Meio ($p < 0,05$).

4.3 RNAm de TLR2 foi mais expresso em HGF quando comparado com HPLF

Para investigar se a expressão de TLR2 e TLR4 foi diferente entre HGF e HPLF, investigamos os níveis de RNAm desses receptores por RT-qPCR. Verificou-se uma expressão do RNAm de TLR2 significativamente maior em HGF em comparação com HPLF ($p < 0,01$; Figura 6A) sob estimulação com LPS de *P.gingivalis* e um nível semelhante de expressão do RNAm de TLR4 entre as duas subpopulações de células ($p > 0,05$; Figura 6B).

Figura 6 - Regulação da expressão do mRNA de TLR2 (A) e TLR4 (B) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por RPL13A (gene de referência). Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística entre HGF e HPLF no mesmo grupo ($p < 0,01$).

4.4 O aumento de IL-6 foi parcialmente impedido pelo silenciamento de TLR2 e foi maior em HPLF estimulado por agonistas sintéticos de TLR2

O aumento de IL-6 foi parcialmente prejudicado por siTLR2 de uma maneira semelhante comparando HGF e HPLF sob estimulação por LPS de *P. gingivalis* ($p < 0,01$; Figuras 7A e 7B). Curiosamente, HGF expressou e produziu menos IL-6 do que HPLF quando estimulados por agonistas sintéticos de TLR2 (Pam2CSK4 e Pam3CSK4) como mostrado nas Figuras 7C a 7F, e esta produção foi significativamente diminuída por ambos siTLR2 e siTLR4 ($p < 0,01$; Figuras 7D e 7F).

Figura 7 - Efeito do silenciamento de TLR2 e TLR4 sobre a regulação da expressão de mRNA de IL-6 (A, C, E) e produção de proteína (B, D, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram quantificados por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e normalizados com RPL13A (gene de referência). Os níveis de proteína nos sobrenadantes de células foram avaliadas por ELISA. Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$). # Indica diferença estatística no siSCR entre HGF e HPLF ($p < 0,05$).

4.5 Aumento de IL-8 em fibroblastos estimulados foi diminuído com o silenciamento de TLR2

O passo seguinte foi investigar se o aumento de IL-8 era devido à estimulação de TLR2 e se esta ativação seria similar entre HGF e HPLF. Semelhante ao que ocorreu com IL-6, a expressão e produção de IL-8 foi também diminuída pelo silenciamento de TLR2, mas não por siTLR4, para todos os desafios aplicados (Figura 8). HGF produziram mais IL-8 em comparação com HPLF quando estimulados por LPS de *P. gingivalis* ($p < 0,05$; Figura 8B). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre HGF e HPLF na produção de IL-8, quando estimulados por Pam2CSK4 e Pam3CSK4, agonistas sintéticos de TLR2/6 e TLR2/1, respectivamente (Figuras 8D e 8F), embora o nível do RNAm de IL-8 tenha sido significativamente aumentado para HPLF quando estimuladas por Pam2CSK4 e Pam3CSK4 ($p < 0,05$; Figuras 8C e 8E).

Figura 8 - Efeito do silenciamento de TLR2 e TLR4 sobre a regulação da expressão de mRNA de IL-8 (A, C, E) e produção de proteína (B, D, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram quantificados por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e normalizados com RPL13A (gene de referência). Os níveis de proteína nos sobrenadantes de células foram avaliadas por ELISA. Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$). # Indica diferença estatística no siSCR entre HGF e HPLF ($p < 0,05$).

4.6 A produção proteica de CXCL12 não é influenciada pelo silenciamento de TLR2 nem por TLR4

Ao investigar o possível papel de TLR2 ou TLR4 na secreção de CXCL12, uma menor expressão de CXCL12 foi encontrada quando utilizamos TLR2 siRNA em HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* ($p < 0,05$; Figura 9A) e Pam2CSK4 ($p < 0,05$; Figura 9C), bem como em HGF sob estimulação de Pam3CSK4 ($p < 0,05$; Figura 9E), mas apenas ao nível do RNAm. Para todas as situações, em ambas as subpopulações de fibroblastos, a produção da proteína CXCL12 permaneceu inalterada (Figuras 9B, 9D e 9F).

Figura 9 - Efeito do silenciamento de TLR2 e TLR4 sobre a regulação da expressão de mRNA de CXCL12 (A, C, E) e produção de proteína (B, D, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. Os níveis de RNAm foram quantificados por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e normalizados com RPL13A (gene de referência). Os níveis de proteína nos sobrenadantes de células foram avaliadas por ELISA. Os valores estão representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$). # Indica diferença estatística no siSCR entre HGF e HPLF ($p < 0,05$).

4.7 Aumento da expressão de RNAm de IL-8 foi parcialmente impedido por siMyD88 ou siTRAM em HGF e HPLF. O RNAm de IL-6 foi regulado por MyD88 ou TRAM, dependendo do estímulo

O aumento de RNAm de IL-8 induzido nas células estimuladas foi parcialmente impedido por siMyD88 ou siTRAM em ambas as subpopulações de fibroblastos para todos os desafios testados ($p < 0,01$; Figuras 10A, 10B e 10C). De modo semelhante, o aumento do RNAm de IL-6 foi parcialmente impedido por siMyD88 ou siTRAM, dependendo do estímulo aplicado (Figuras 10D, 10E e 10F). A expressão de RNAm de IL-6 foi diminuída em HGF, mas não em HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* ($p < 0,01$; Figura 10D) e também em HGF e HPLF estimulados com Pam2CSK4 ($p < 0,01$; Figura 10E).

Figura 10 - Efeito do silenciamento de MyD88 ou TRAM sobre a regulação da expressão de mRNA de IL-8 (A, B, C) e IL-6 (D, E, F) em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados utilizando RPL13A (gene de referência). Os valores são representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$).

4.8 A expressão constitutiva do RNAm de CXCL12 foi influenciada por siMyD88 ou siTRAM

A expressão constitutiva de RNAm de CXCL12 foi regulada pelo silenciamento de MyD88 ou TRAM em fibroblastos não estimulados (somente em meio de cultura). No entanto, para HGF e HPLF estimulados, o RNAm de CXCL12 permaneceu inalterado pelo silenciamento de ambas as moléculas adaptadoras de TLRs (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do silenciamento de MyD88 ou TRAM sobre a regulação da expressão de mRNA de CXCL12 em HGF e HPLF estimulados por LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) ou Pam3CSK4 (500 ng/mL), durante 6 h. A expressão de mRNA foi quantificada por RT-qPCR utilizando os ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados utilizando RPL13A (gene de referência). Os valores são representados como médias ± EPM de 4 poços por grupo. * Indica diferença estatística em relação ao siSCR no mesmo grupo de fibroblastos ($p < 0,01$).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrada pela primeira vez a resposta de HGF e HPLF em relação ao importante papel de TLR2 na secreção de IL-6 e IL-8, bem como a independência de TLR2 ou TLR4 para secreção de CXCL12 nestas subpopulações, sob desafio com LPS de *P. gingivalis*. Ainda, este é o primeiro relato acerca da regulação de IL-6, IL-8 e CXCL12 por MyD88 e TRAM nesses subtipos de fibroblastos.

O silenciamento mediado por siRNA nos permitiu investigar interferências e comparar estes receptores e adaptadores em ambos os subtipos de fibroblastos, a fim de mostrar as eventuais diferenças entre eles. É importante salientar que a diminuição observada na secreção de IL-6 e IL-8 em HGF e HPLF sob o silenciamento de TLR2 não foi devido à morte celular, já que verificamos a viabilidade celular pelo ensaio de MTT, para cada um dos RNAs de interferência (Figura 5).

É verdade que o silenciamento pode não eliminar completamente uma possível contribuição de taxas pequenas de expressão do receptor, mas claramente este não é o caso neste estudo, uma vez que a secreção de citocinas foi significativamente afetada pelo silenciamento de TLR2, se levarmos em consideração que foram utilizados dois agonistas sintéticos específicos como controle positivo ao estímulo com LPS. Na verdade, TLR2 e TLR4 foram silenciados em aproximadamente 90%. Paralelamente, o silenciamento de MyD88 e TRAM teve eficiência de 82 a 96%.

É importante ressaltar que TLR2 foi regulado em HGF, mas não em HPLF, por LPS de *P. gingivalis* e também com Pam2CSK4 ou Pam3CSK4, agonistas de TLR2/6 e TLR2/1, respectivamente, mas o mesmo não aconteceu com TLR4. Deve-se considerar que o tempo de 6 horas foi escolhido para avaliar esta resposta, uma vez que a expressão constitutiva do RNAm de TLR2 e TLR4 mostrou-se aumentada após este tempo em um experimento de tempo-resposta para ambos os subtipos de fibroblastos (dados não mostrados). Deve-se notar que, mesmo HGF expressando mais RNAm de TLR2 que HPLF, a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-

6 e IL-8, foi regulada apenas por meio de siTLR2 em ambas as subpopulações celulares e não só em HGF, quando estimulados por LPS de *P. gingivalis*.

Por outro lado, quando foram utilizados Pam2CSK4, um agonista do heterodímero TLR2/6, e Pam3CSK4, um agonista de heterodímero TLR2/1, HPLF tiveram aumento dos níveis de IL-6 em comparação com HGF, mesmo expressando menos TLR2. Essa forte indução de TLR2 em HGF também foi anteriormente demonstrada com o uso de *P. gingivalis* viável (SCHERES et al., 2011). Ainda existe controvérsia sobre os perfis de expressão de TLR2 e TLR4 em ambos HGF e HPLF. Outro estudo demonstrou que TLR2 foi mais expresso em HPLF do que em HGF (HATAKEYAMA et al., 2003). Um outro trabalho demonstrou que HGF consistem em populações heterogêneas no que diz respeito à expressão de TLR4 (WANG et al., 2001). Também foi relatado que a produção da citocina IL-6 foi diminuída via sinalização por TLR4 em HPLF estimulados por LPS (SUN et al., 2008).

Em essência, a capacidade de silenciamento em HGF e HPLF foi muito semelhante e, conseqüentemente, o nível de expressão gênica inicial de cada receptor não teve um impacto direto no silenciamento que poderia ser alcançado para um determinado alvo, como demonstrado em um estudo anterior (KRUEGER et al., 2007), nem sobre a magnitude de secreção de citocinas por HGF ou HPLF. Outro trabalho (SOUZA et al., 2010) mostrou que a magnitude das respostas de HGF ao LPS de *P. gingivalis* variou significativamente entre os indivíduos, e em particular, seria possível que a heterogeneidade nessas respostas tenha sido causada pela variabilidade genética dos hospedeiros. Assim, HGF e HPLF deste trabalho foram coletados e analisados a partir dos mesmos doadores. No presente estudo, os dados numéricos não foram muito semelhantes entre os três doadores, mas houve um claro padrão de resposta entre eles.

Levando-se o exposto em consideração, a ativação de TLR2 ou TLR4 mostrou capacidade de aumentar a expressão de IL-8 (HATAKEYAMA et al., 2003; MAHANONDA et al., 2007) e IL-6 (UEHARA; TAKADA, 2007). Souza et al. também demonstraram que as citocinas da família da IL-6 são reguladas por TLR2 em HGF quando estimulados por LPS de *P. gingivalis* e agonistas de TLR2 (SOUZA et al., 2010), mas o presente estudo foi o primeiro a demonstrar que isso também é verdade para HPLF. Em relação aos níveis proteicos, tanto HGF quanto HPLF tiveram a secreção de IL-6 diminuída com o silenciamento de TLR2 e curiosamente

também por TLR4, quando estimulados pelos agonistas sintéticos de TLR2. Supõe-se que, embora a expressão de RNAm de TLR2, tanto em HGF como em HPLF, permanecesse inalterada por TLR4 siRNA, a presença de TLR4 poderia ser importante para a sinalização por TLR2, pelo menos no caso da produção de IL-6. Na verdade, um estudo recente demonstrou que existe uma interação física entre TLR2 e TLR4, confirmando essa hipótese (GOOD; GEORGE; WATTS, 2012). No entanto, o mecanismo dessa interação e quando ela acontece permanece pouco claro na literatura e mais estudos são necessários para melhor compreender a regulação molecular entre estes dois receptores na fisiologia de cada tipo celular.

No que diz respeito ao estímulo com LPS de *P. gingivalis*, foi relatado anteriormente que este LPS contém uma heterogeneidade atípica no lipídeo A, mostrando tanto estruturas de lipídeo tetra como penta-acetilados (REIFE et al., 2006). Estruturas de lipídeo tetra-acetilado são antagonistas de TLR4 (COATS et al., 2005) enquanto os penta-acetilados são agonistas de TLR4 (REIFE et al., 2006). De fato, esta heterogeneidade na estrutura da porção lipídica depende das concentrações de hemina no meio de crescimento das bactérias, que por sua vez, em última análise, determinam a capacidade do LPS de *P. gingivalis* em funcionar como um agonista ou um antagonista para TLR4 (AL-QUTUB et al., 2006; COATS et al., 2009). Essa alta concentração de hemina no ambiente seria então correlacionada com o microambiente do sulco gengival sangrante, frequentemente encontrado na situação de doença periodontal. Aqui, nós mostramos claramente que o LPS de *P. gingivalis* estimula a produção de IL-6 e IL-8 via sinalização por TLR2, tanto em HGF como em HPLF, porém em níveis inferiores aos agonistas sintéticos de TLR2, o que poderia ser um mecanismo importante utilizado pela *P. gingivalis* para evasão do sistema imune. Curiosamente, um estudo recente demonstrou que o LPS de *P. gingivalis* em uma concentração de 10 µg/mL pode ativar tanto TLR2 quanto TLR4, enquanto que 1 µg/mL de LPS de *P. gingivalis* ativaria somente TLR2 (SUN et al., 2010). Além disso, este mesmo estudo mostrou que tanto TLR2 como TLR4 foram capazes de controlar a secreção de citocinas, incluindo IL-6 e IL-8, induzida por bactérias Gram-negativas periodontais ou por seus LPS em concentrações suficientemente elevadas.

Neste estudo, foi também demonstrado que, inversamente à IL-6 e à IL-8, a expressão constitutiva da quimiocina CXCL12 permaneceu inalterada pelo

silenciamento de TLR2 ou TLR4 em ambos os subtipos de fibroblastos, quando estimulados por todos os desafios. Um estudo anterior mostrou que, em fibroblastos humanos, o gene CXCL12, assim como alguns elementos específicos da célula que regulam a sua expressão constitutiva, teve a expressão ao nível transcricional regulada por hipóxia ou pelas condições de crescimento, mas não por estímulos tipicamente pró-inflamatórios, tais como as citocinas (SANTIAGO et al., 2011). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram a redução da produção de CXCL12 por LPS de *P. gingivalis* (HOSOKAWA et al., 2005; MORANDINI et al., 2010). Por outro lado, estudos *in vivo* demonstraram que a migração de neutrófilos foi aumentada na presença de CXCL12 (DELANO et al., 2011; HAVENS et al., 2008), confirmando a importância desta quimiocina no microambiente inflamatório.

Recentemente, demonstrou-se que o LPS promove a atividade de pré-osteoclastos por regular positivamente CXCR4, o receptor de CXCL12, via TLR4 (XING et al., 2011). No entanto, em relação à participação de HGF e HPLF na secreção de CXCL12, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que a secreção da quimiocina CXCL12 é independente de TLR2 ou TLR4, pelo menos com o estímulo por LPS de *P. gingivalis* e por agonistas sintéticos de TLR2. Considerando que CXCL12 é um quimioatraente importante para as células-tronco hematopoéticas e mesenquimais, suportando a sua sobrevivência e proliferação (KORTESIDIS et al., 2005), e que este mediador mostrou a capacidade de exercer um efeito migratório sobre células-tronco do ligamento periodontal *in vitro* (DU; YANG; GE, 2012), parece importante saber que, ao diminuir a expressão de TLR2 seria possível também diminuir cruciais mediadores pró-inflamatórios, como IL-6 e IL-8, sem afetar uma quimiocina envolvida no processo de reparação, como CXCL12.

Em relação à participação dos adaptadores de TLRs, MyD88 e TRAM na expressão das citocinas acima mencionadas por HGF e HPLF, um estudo anterior demonstrou que HGF CD14⁺ pré-tratados com interferon gama tiveram um aumento de IL-8, em resposta ao LPS, por meio de uma regulação positiva de CD14 e expressão do RNAm de MyD88 (TAMAI et al., 2002). Além disso, um estudo recente mostrou que a expressão de IL-23, em cultura primária de HPLF, foi abolida pelo inibidor de MyD88, em células estimuladas com IL-1 β (ZHU et al., 2012). No nosso estudo, foi demonstrado, pela primeira vez, o importante papel de MyD88 e TRAM

na regulação da expressão do RNAm de IL-6 e IL-8 em HGF e HPLF, assim como para CXCL12 sob o desafio com LPS de *P. gingivalis*.

Considerando que MyD88 é uma molécula adaptadora recrutada por todos os TLRs com a exceção de TLR3 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006), nosso próximo passo foi investigar a contribuição desse importante mediador, assim como a possível contribuição de TRAM, descrito como um adaptador da via independente de MyD88, na regulação da mensagem para as citocinas alvo deste estudo. TRAM é conhecido por ser a molécula que liga TLR4 a TRIF, na via de sinalização independente de MyD88, e portanto seria utilizado por TLR4, mas não por TLR2 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Curiosamente, neste estudo, encontramos que a expressão do RNAm de IL-6 e IL-8 foi diminuída não apenas por siMyD88 mas também por siTRAM, incluindo o grupo de células estimuladas com Pam2CSK4 e Pam3CSK4, que são agonistas sintéticos do receptor TLR2. Seria razoável esperar que somente MyD88 fosse capaz de interferir no RNAm dessas citocinas pró-inflamatórias, se considerarmos que, convencionalmente, TLR2 sinalizaria exclusivamente via MyD88-dependente e que somente TLR4 recrutaria TRAM para a sinalização MyD88-independente (BROWN et al., 2011). Por outro lado, estudos recentes sugeriram que TRAM estaria associado não somente ao TLR4, mas também às vias de sinalização por TLR2 e TLR5 (CHOI et al., 2010; SACRE et al., 2007). Tudo indica, então, que para esses dois subtipos de fibroblastos, as duas moléculas adaptadoras estariam envolvidas na via de TLR2.

Na verdade, um estudo muito recente demonstrou que existe uma interação tempo-dependente entre MyD88 e TRAM e que TRAM poderia funcionar como um adaptador de ligação não somente para TRIF, mas também para MyD88 (OHNISHI et al., 2012). Isso, de certa forma, explicaria o porquê pudemos observar, neste trabalho, a diminuição do RNAm de IL-6 e IL-8 via MyD88 e também via TRAM. Nós hipotetizamos que essa diminuição do RNAm de IL-6 e IL-8 silenciados para TRAM tenha ocorrido pelo possível decréscimo no recrutamento de MAL, utilizando então TRAM como “ponte” para a sinalização via MyD88. Entretanto, a razão por isso não ter acontecido para o RNAm de IL-6 em HPLF estimulados por LPS é desconhecida. É importante ressaltar que a detecção do RNAm é uma informação precoce sob o ponto de vista da secreção da proteína propriamente dita, já que a mensagem é

mandada, mas existe uma série de eventos pós-transcricionais que podem regular a expressão gênica final desses mediadores inflamatórios.

Vários estudos foram feitos em camundongos deficientes de MyD88, em modelos de periodontite. Esses animais são resistentes ao efeito tóxico do LPS, e são também imunocomprometidos, em termos de habilidade para lutar contra os patógenos (BIN; XU; SHU, 2003; CHOI et al., 2010; DUNNE et al., 2003; OSHIUMI et al., 2003; SACRE et al., 2007; SHEEDY; O'NEILL, 2007). Em células deficientes de MyD88, o tempo de ativação do fator de transcrição NF- κ B é atrasado, no caso da sinalização por TLR4 (O'NEILL; BOWIE, 2007). Por outro lado, TRAM é considerado o mais restrito dos adaptadores de TLRs. Embora TRAM interaja com TRIF, o seu papel parece ser mais importante do que o de TRIF para a sinalização via TLR4, já que a ativação de sinais e indução de citocinas por LPS é mais prejudicada em células deficientes em TRAM do que em células deficientes em TRIF (O'NEILL; BOWIE, 2007).

Em relação à quimiocina CXCL12, observamos que a sua expressão constitutiva de RNAm foi aumentada pelo silenciamento de MyD88 ou TRAM em fibroblastos não estimulados (meio de cultura somente) e curiosamente, para HGF e HPLF estimulados, o RNAm de CXCL12 permaneceu inalterado com o silenciamento de ambos os adaptadores. Este trabalho mostrou que a secreção de CXCL12 não é influenciada por TLR2 ou TLR4 tanto em HGF como em HPLF estimulados com LPS. A literatura mostra que a mobilização de neutrófilos da medula óssea durante a sepse polimicrobiana é dependente da sinalização por CXCL12, mas independente de TLR4, MyD88 e TRIF (DELANO et al., 2011). Parece-nos razoável que a sinalização via TLRs seja mais importante para a expressão do receptor de CXCL12 (que é o CXCR4), uma vez que é sabido que LPS promove a atividade pré-osteoclástica pelo aumento de CXCR4, via TLR4 (XING et al., 2011). É importante esclarecer que a caracterização das vias de sinalização intracelulares que podem regular a via de TLRs está começando a ser elucidada.

A quantidade de vias de sinalização afetadas em células imunes não profissionais, tais como fibroblastos, pelo sistema imune inato tem claramente deslocado o ponto de vista da resposta inata a partir de uma forma unidimensional para uma resposta imune multifuncional, que exhibe uma capacidade de sintonizar a

resposta imune inata e adaptativa, no contexto de doenças infecciosas e inflamatórias. Mais estudos destas vias são necessários para uma melhor compreensão de como a resposta inflamatória do hospedeiro é regulada, bem como para a identificação dos mecanismos celulares por meio dos quais periodontopatógenos levam vantagens sobre o hospedeiro para mediar as doenças periodontais. Uma comparação detalhada dos mecanismos moleculares que regulam o ajuste fino da expressão das citocinas e quimiocinas, nestes dois subtipos de fibroblastos, em conjunto com outras células que participam ativamente desta resposta, contribuiria para uma compreensão mais clara das diferenças e particularidades de cada um nos processos patogênicos que afetam os componentes do periodonto de proteção e sustentação, como a gengiva e o ligamento periodontal, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

"Nem sou maior quando me elogiam, nem sou menor quando me criticam."

Santo Agostinho

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que a sinalização, por meio do sistema imune inato, mediada por fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal, as células periodontais residentes mais numerosas e imunológicas não-profissionais, controla a secreção de importantes citocinas que modulam o microambiente inflamatório. Futuramente, esses achados podem contribuir para estratégias terapêuticas que envolvam a modulação da resposta imune-inflamatória do hospedeiro no intuito de controlar positivamente as consequências sofridas pelo organismo na tentativa de eliminação de periodontopatógenos.

Conclui-se especificamente que:

- A expressão de TLR2 foi maior em fibroblastos de gengiva do que em fibroblastos de ligamento periodontal e a expressão de TLR4 não foi regulada pelo LPS de *P. gingivalis*.
- O aumento da secreção de IL-6 e IL-8, induzido por LPS de *P. gingivalis*, foi diminuído pelo silenciamento de TLR2 e a quimiocina CXCL12 permaneceu inalterada pelo silenciamento de TLR2 ou TLR4, em ambos os subtipos de fibroblastos.
- O aumento da expressão gênica de IL-6 e IL-8, provocado por LPS de *P. gingivalis*, foi diminuído com o silenciamento de MyD88 ou TRAM, em fibroblastos de gengiva e ligamento periodontal. Em contrapartida, a expressão gênica constitutiva de CXCL12 foi aumentada por siMyD88 ou siTRAM.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2006 Aug;74(8):4474-85.

Amornchat C, Rassameemasmaung S, Sripairojthikoon W, Swasdison S. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into human gingival fibroblasts in vitro. *J Int Acad Periodontol*. 2003 Oct;5(4):98-105.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 1989 Oct;84(4):1045-9.

Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8):535-42.

Bin LH, Xu LG, Shu HB. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):24526-32.

Bostanci N, Allaker R, Johansson U, Rangarajan M, Curtis MA, Hughes FJ, et al. Interleukin-1alpha stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):52-60.

Bostanci N, Allaker RP, Belibasakis GN, Rangarajan M, Curtis MA, Hughes FJ, et al. *Porphyromonas gingivalis* antagonises *Campylobacter rectus* induced cytokine production by human monocytes. *Cytokine*. 2007 Aug;39(2):147-56.

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.

Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):417-27.

Burns E, Eliyahu T, Uematsu S, Akira S, Nussbaum G. TLR2-dependent inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* is MyD88 independent, whereas MyD88 is required to clear infection. J Immunol. 2010 Feb 1;184(3):1455-62.

Butler MP, Hanly JA, Moynagh PN. Kinase-active interleukin-1 receptor-associated kinases promote polyubiquitination and degradation of the Pellino family: direct evidence for PELLINO proteins being ubiquitin-protein isopeptide ligases. J Biol Chem. 2007 Oct 12;282(41):29729-37.

Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. Nat Immunol. 2006 Oct;7(10):1074-81.

Chiang CY, Kyritsis G, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. Infect Immun. 1999 Aug;67(8):4231-6.

Choi YJ, Im E, Chung HK, Pothoulakis C, Rhee SH. TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 2010 Nov 26;285(48):37570-8.

Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, et al. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. Cell Microbiol. 2009 Nov;11(11):1587-99.

Coats SR, Pham TT, Bainbridge BW, Reife RA, Darveau RP. MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. J Immunol. 2005 Oct 1;175(7):4490-8.

Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5041-51.

Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Thayer TC, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, et al. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. J Immunol. 2011 Jul 15;187(2):911-8.

Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5337-43.

Du L, Yang P, Ge S. Stromal cell-derived factor-1 significantly induces proliferation, migration, and collagen type I expression in a human periodontal ligament stem cell subpopulation. *J Periodontol*. 2012 Mar;83(3):379-88.

Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LA, Gay NJ. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41443-51.

Gaddis DE, Michalek SM, Katz J. TLR4 signaling via MyD88 and TRIF differentially shape the CD4+ T cell response to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5772-83.

Gay NJ, Gangloff M, O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol*. 2011 Mar;32(3):104-9.

Good DW, George T, Watts BA, 3rd. Toll-like receptor 2 is required for LPS-induced Toll-like receptor 4 signaling and inhibition of ion transport in renal thick ascending limb. *J Biol Chem*. 2012 Jun 8;287(24):20208-20.

Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? *Microbes Infect*. 2009 May-Jun;11(6-7):637-45.

Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Triantafilou M, Triantafilou K. Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13532-7.

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.

Havens AM, Chiu E, Taba M, Wang J, Shiozawa Y, Jung Y, et al. Stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):845-53.

Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):982-90.

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.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. Cell Death Differ. 2006 May;13(5):816-25.

Kinane DF, Attstrom R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. J Clin Periodontol. 2005;32 Suppl 6:130-1.

Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. Periodontol 2000. 2007;45:14-34.

Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. Acta Odontol Scand. 2001 Jun;59(3):154-60.

Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. Annu Rev Immunol. 2005;23:1-21.

Kortesidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. Blood. 2005 May 15;105(10):3793-801.

Krueger U, Bergauer T, Kaufmann B, Wolter I, Pilk S, Heider-Fabian M, et al. Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. Oligonucleotides. 2007 Summer;17(2):237-50.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3944-55.

Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. J Dent Res. 1998 Apr;77(4):555-64.

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect Immun. 1995 Oct;63(10):3878-85.

Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? Blood. 2005 Sep 15;106(6):1901-10.

Lau TT, Wang DA. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Feb;11(2):189-97.

Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):885-90.

Liu R, Desta T, Raptis M, Darveau RP, Graves DT. *P. gingivalis* and *E. coli* lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol*. 2008 Jul;79(7):1241-7.

Liu X, Sroka A, Potempa J, Genco CA. Coordinate expression of the *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain proteinase, Kgp, arginine-specific gingipain proteinase, RgpA, and the heme/hemoglobin receptor, HmuR. *Biol Chem*. 2004 Nov;385(11):1049-57.

Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis*. 1993 Jun;16 Suppl 4:S203-10.

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.

McGettrick AF, Brint EK, Palsson-McDermott EM, Rowe DC, Golenbock DT, Gay NJ, et al. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9196-201.

McKee AS, McDermid AS, Baskerville A, Dowsett AB, Ellwood DC, Marsh PD. Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infect Immun*. 1986 May;52(2):349-55.

Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol*. 2006 Aug;80(2):220-6.

Morandini ACF, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SLA, Passanezi E, Rezende MLR, et al. Differential Production of Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Stromal-Derived Factor-1, and IL-6 by Human Cultured Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts Challenged With Lipopolysaccharide From *P. gingivalis*. *Journal of Periodontology*. 2010;81(2):310-7.

- Morandini ACF, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Brazilian Oral Research*. 2011;25(2):157-62.
- Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res*. 2001 Feb;36(1):1-8.
- 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.
- Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, et al. Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int Immunol*. 2002 Nov;14(11):1325-32.
- Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, et al. TRAM Is Involved in IL-18 Signaling and Functions as a Sorting Adaptor for MyD88. *PLoS One*. 2012;7(6):e38423.
- Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):49751-62.
- Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*. 1998 Jan 15;128(2):127-37.
- Paramonov N, Bailey D, Rangarajan M, Hashim A, Kelly G, Curtis MA, et al. Structural analysis of the polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* strain W50. *Eur J Biochem*. 2001 Sep;268(17):4698-707.
- Paramonov NA, Aduse-Opoku J, Hashim A, Rangarajan M, Curtis MA. Structural analysis of the core region of O-lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* from mutants defective in O-antigen ligase and O-antigen polymerase. *J Bacteriol*. 2009 Aug;191(16):5272-82.
- Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol*. 2006 May;8(5):857-68.

Sacre SM, Lundberg AM, Andreaskos E, Taylor C, Feldmann M, Foxwell BM. Selective use of TRAM in lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) induced NF-kappaB activation and cytokine production in primary human cells: TRAM is an adaptor for LPS and LTA signaling. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2148-54.

Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, Gutierrez-Canas I, Izquierdo E, Usategui A, et al. CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine*. 2011 Feb;53(2):184-90.

Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2011 Aug;46(4):407-16.

Sheedy FJ, O'Neill LA. The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *J Leukoc Biol*. 2007 Aug;82(2):196-203.

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. *Journal of Endodontics*. 2010;36(1):91-4.

Smalley JW, Birss AJ, Szmigielski B, Potempa J. The HA2 haemagglutinin domain of the lysine-specific gingipain (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* promotes micro-oxo bishaem formation from monomeric iron(III) protoporphyrin IX. *Microbiology*. 2006 Jun;152(Pt 6):1839-45.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.

Souza PP, Palmqvist P, Lundgren I, Lie A, Costa-Neto CM, Lundberg P, et al. Stimulation of IL-6 cytokines in fibroblasts by toll-like receptors 2. *J Dent Res*. 2010 Aug;89(8):802-7.

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.

Sun Y, Shu R, Zhang MZ, Wu AP. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Apr;52(3):362-9.

Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol*. 2003 Jan;74(1):103-10.

Tamai R, Sakuta T, Matsushita K, Torii M, Takeuchi O, Akira S, et al. Human gingival CD14(+) fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infect Immun*. 2002 Mar;70(3):1272-8.

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 Oct;56(10):1064-72.

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):237-52.

Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2007 Mar;86(3):249-54.

Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Sep;84(9):712-25.

Verardi S, Page RC, Ammons WF, Bordin S. Differential chemokine response of fibroblast subtypes to complement C1q. *J Periodontal Res*. 2007 Feb;42(1):62-8.

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.

Wang PL, Oido-Mori M, Fujii T, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, et al. Heterogeneous expression of Toll-like receptor 4 and downregulation of Toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 9;288(4):863-7.

Xing Q, de Vos P, Faas MM, Ye Q, Ren Y. LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4 via TLR-4. *J Dent Res*. 2011 Feb;90(2):157-62.

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.

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

Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. Histol Histopathol. 2003 Jul;18(3):889-96.

Yilmaz O. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. Microbiology. 2008 Oct;154(Pt 10):2897-903.

Zhang W, Peng G, Lin SY, Zhang P. DNA damage response is suppressed by the high cyclin-dependent kinase 1 activity in mitotic mammalian cells. J Biol Chem. 2011 Oct 14;286(41):35899-905.

Zhu L, Wu Y, Wei H, Yang S, Zhan N, Xing X, et al. Up-regulation of IL-23 p19 expression in human periodontal ligament fibroblasts by IL-1beta via concurrent activation of the NF-kappaB and MAPKs/AP-1 pathways. Cytokine. 2012 Jun 9.

APÉNDICE

APÊNDICE A

Journal of Periodontology; Copyright 2012

DOI: 10.1902/jop.2012.120177

Toll-Like Receptor 2 Knockdown Modulates **Interleukin (IL)-6** and **IL-8** but not **Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12)** in Human **Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts**

Ana Carolina Faria Morandini^{*}, Pedro Paulo Chaves Souza[†], Erivan Schnaider Ramos-Junior[‡], Daniel Thomas Brozoski^{*}, Carla Renata Sipert^{*}, Carlos Alberto Souza Costa[†], Carlos Ferreira Santos^{*}

^{*} Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil.

[†] Department of Physiology and Pathology, Araraquara Dental School, São Paulo State University, Araraquara-SP, Brazil.

[‡] Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Background: Fibroblasts are now seen as active components of the immune response because these cells express Toll-like receptors (TLRs), recognize pathogen associated molecular patterns and mediate the production of cytokines and chemokines during inflammation. The innate host response to lipopolysaccharide (LPS) from *Porphyromonas gingivalis* is unusual since different studies have reported that it can be an agonist for TLR2 and an antagonist or agonist for TLR4. This study investigated and compared whether signaling through TLR2 or TLR4 could affect the **secretion** of **Interleukin (IL)-6**, **IL-8** and **Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12)** in both human gingival fibroblasts (HGF) and human periodontal ligament fibroblasts (HPLF).

Methods: After small interfering RNA-mediated silencing of TLR2 and TLR4, HGF and HPLF from the same donors were stimulated with *Porphyromonas gingivalis* LPS or with two synthetic ligands of TLR2, Pam2CSK4 and Pam3CSK4, for 6 hours. IL-6, IL-8, and CXCL12 mRNA expression and protein **secretion** were evaluated by **quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay**, respectively.

Results: TLR2 mRNA expression was upregulated in HGF but not in HPLF by all the stimuli applied. Knockdown of TLR2 decreased IL-6 and IL-8 in response to *P. gingivalis* LPS, Pam2CSK4 and Pam3CSK4 in a similar manner in both fibroblasts subpopulations. Conversely, CXCL12 remained unchanged by TLR2 or TLR4 silencing.

Conclusion: These results suggest that signaling through TLR2 by gingival and periodontal ligament fibroblasts can control the **secretion** of IL-6 and IL-8, which contribute to periodontal pathogenesis, but do not interfere with CXCL12 levels, an important chemokine in the repair process.

KEY WORDS

Toll-Like Receptor 2; Toll-Like Receptor 4; cytokines; *Porphyromonas gingivalis*; fibroblasts

Fibroblasts are the main resident cell type in gingival and periodontal ligament tissues and their reaction to various microbial stimuli, including Gram-negative bacteria virulence factors, has been studied in diverse situations¹⁻³. The recognition of the pathogen associated molecular patterns (PAMPs) by these cells is possible because they express the so-called pathogen recognition receptors (PRRs). It has been previously shown that human gingival fibroblasts (HGF) express toll-like receptor (TLR)1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, Myeloid differentiation protein 2 (MD-2), Myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD1), and NOD2⁴ and human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) express TLR2, TLR4, NOD1 and NOD2⁵.

TLRs are sentinel receptors and their stimulation culminates with activation of transcription factors such as Nuclear factor kappa B and Interferon regulatory factors (IRFs), which promote the transcription of pro-inflammatory cytokines and other proteins that promote host defenses⁶. In humans, 11 different TLRs have been identified that recognize different molecules native to bacteria, fungi, protozoa, and viruses^{7,8}. TLR4, the first TLR identified, recognizes lipopolysaccharide (LPS) lipid A. TLR2 can recognize several microbial components, including lipoproteins, peptidoglycans, and lipoteichoic acid.

LPS derived from the outer membranes of Gram-negative bacteria is one of the most commonly investigated virulence factor used in the activation of the innate immune system^{9,10}. LPS preparations from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* contain several diverse LPS molecules with different effects on TLR2 and TLR4, as well as a lipoprotein not present in LPS from other Gram-negative bacteria, specifically activating TLR2¹¹. The ability of the lipid A moiety of *P. gingivalis* LPS to function as an agonist or antagonist to TLRs can be modulated not only by environmental factors like hemin¹², but also via crosstalk in host cells between the TLR2 and the chemokine (C-X-C motif) receptor type 4 (CXCR4), a G-protein coupled receptor for the chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12)¹³.

Extensive evidence suggests that HGF as well as HPLF secrete cytokines and chemokines^{14,15,16,17}. Also, unstimulated fibroblasts produce a basal level of chemotactic cytokines such as CXCL12 and the chemokine CC-ligand -3 (CCL3)¹⁸ and the pattern of chemokines expressed varies with tissue type¹⁹. In this context, CXCL12 regulates both the bone-marrow homing and egress of stem and endothelial progenitor cells and their migration into peripheral tissues, a characteristic that underlies the contribution of CXCL12 to important physiological processes such as angiogenesis or tissue repair²⁰ (reviewed by Lau & Wang²¹). Also, CXCL12 has been found to be increased in samples obtained from periodontally compromised individuals and neutrophil migration was also enhanced in the presence of this chemokine²². CXCL12 acts as a chemoattractant for hematopoietic stem cells, and mesenchymal stem cells and supports their survival and proliferation²³. In a recent study, CXCL12 was shown to promote cell viability and proliferation, to affect the differentiation, and to exert a migratory effect on periodontal ligament stem cells in vitro²⁴.

On the other hand, Interleukin (IL)-8 is a very important pro-inflammatory mediator and amongst the cytokines and chemokines produced by fibroblasts, it is a neutrophil chemoattractant and activator, plays the crucial role in the first line of host defense against microorganisms²⁵. IL-6 is recognized for its effects on the maturation and activation of B and T cells, macrophages, osteoclasts, chondrocytes, and endothelial cells (reviewed by Kishimoto²⁶). Moreover, IL-6 is a pleiotropic cytokine with a broad range of humoral and cellular immune effects related to inflammation, host defense, and tissue injury²⁷. A differential pattern of IL-6 secretion between HGF and HPLF was observed in vitro²⁸. In addition, cytokines from IL-6 family were regulated by TLR2 in HGF when stimulated by *P. gingivalis* LPS²⁹.

However, to the best of our knowledge, no previous studies have addressed the possible regulation of IL-6 and IL-8 by TLR2 or TLR4 in HPLF comparing to HGF from the same donors under *P. gingivalis* LPS stimulation. Furthermore, this is the first study to investigate whether TLR2 or TLR4 knockdown influences CXCL12 secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblasts.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Fibroblasts were isolated and cultured from gingival and periodontal ligament of three systemically healthy volunteer donors (2 female and 1 male, age range 16 to 26 years) as previously described^{28, 30, 31}. Donors had given written informed consent according to the regulations from the University of São Paulo, Bauru School of Dentistry Ethics Committee. Briefly, human periodontal ligament fibroblasts were collected from tissue of the middle third of third molar roots extracted. Concurrently, gingival biopsies from clinically non-inflamed tissue were retrieved from the gingival margin of the same donors. Cells were obtained by explants from gingival and periodontal ligament and cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)[§], supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)[§] and antibiotics (100UI/mL penicillin/streptomycin)[§] and were used between the 4th and 8th passages in all the comparative analysis.

Immunofluorescence Staining

HGF and HPLF from the same donors were cultured on eight-well chamber slides at a density of 10⁴ cells/well. After overnight attachment, cells were stimulated by *P. gingivalis* LPS (1 µg/mL) for 24 h. Cell culture medium was used as a negative control of the stimulus. After fixation with 4% paraformaldehyde for 15 minutes, the cells were incubated with 3% bovine serum albumin[¶] for 30 minutes at room temperature, then with diluted primary antibody (1:100) anti-fibroblast surface protein (FSP)[¶] or with a mouse immunoglobulin (IgG1) as a negative control overnight at 4°C, and finally with fluorescein-conjugated secondary antibody (1:400)[¶] at 37°C in the dark for 1 hour. Afterwards, the slides were mounted with a mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)[#] and then analyzed by confocal laser scanning microscopy^{**}.

siRNA Transfection and Fibroblasts Stimulation

For siRNA-mediated knockdown of TLR2 and TLR4, cells were seeded in 96-well plates at a density of 8.5 x 10³ cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS. After overnight attachment, the fibroblasts were transfected with scrambled (SCR) siRNA (negative control), TLR2 or TLR4 siRNA diluted in reduced serum medium^{††} in a concentration of 30 nM with a liposome-based transfection reagent[§]. The following day, the gene silencing procedure was repeated. Four hours after the second transfection, the media were switched to DMEM with 10% FBS without antibiotics until the next day. Forty-eight hours after the first transfection, the media were changed, and DMEM with 1% FBS without antibiotics was added with or without the addition of *P. gingivalis* LPS^{‡‡} (1 µg/mL), Pam2CSK4^{‡‡} (TLR2/6 agonist, 50 ng/mL), or Pam3CSK4^{‡‡} (TLR2/1 agonist, 500 ng/mL). Six hours after being challenged, RNA was extracted for reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis and the supernatant was collected for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments. The following siRNAs^{††} were used: TLR2 (ID#111285), TLR4 (ID#112337) and Scrambled Silencer Negative Control #1 (AM4635).

In order to control fibroblast viability, cultures were checked for morphologic changes under microscopy at the start and the end of the incubation period. In addition, (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) viability assays were performed to verify for each siRNA that the cell number was equivalent between them.

RT-qPCR

Total RNA and cDNA were obtained directly from cells using a Kit^{ss} according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were washed two times with cold phosphate buffered saline (PBS) 1x and incubated for 5 minutes with lysis solution and DNase provided with the kit. Following this incubation, a stop solution was added for 2 minutes, the reverse transcription was performed by adding the 2x RT buffer and the 20x enzyme mix to the lysate followed by an incubation at 37°C for 60 minutes and a subsequent 95°C step for 5 minutes to stop the reaction. The qPCR was performed using the TaqMan Gene Expression PCR Master Mix^{llll} and proprietary primers^{llll} targeting mRNA of TLR2(Hs00152932_m1), TLR4(Hs00152939_m1), IL-6(Hs00985639_m1), IL-8(Hs00174103_m1) and CXCL12(Hs00171022_m1). All experiments were performed in a system^{ll} using the comparative cycle threshold (Ct) method ($\Delta\Delta Ct$). The human ribosomal protein L13a (RPL13A) gene was used as the reference gene for all the reactions because it was the most stable reference gene in our experiments as compared with 18S and GAPDH (data not shown). The following are the RPL13A primers^{llll} and probe^{llll} sequences: forward CCG CTC TGG ACC GTC TCA A; reverse CCT GGT ACT TCC AGC CAA CCT; probe VIC-TGA CGG CAT CCC ACC GCC CT-TAMRA.

ELISA

To quantify proteins, ELISA was performed according to the manufacturer's instructions, using ELISA commercially available kits for IL-6 and IL-8^{***} and for CXCL12^{†††}. Briefly, 96-well plates were coated with anti-human monoclonal antibodies for each target. After blocking for 1 hour to avoid non-specific binding, recombinant human IL-6, IL-8 or CXCL12 and culture supernatants were added. The cytokines were detected using horseradish peroxidase-labeled monoclonal antibodies after binding of the anti-human biotinylated detection antibodies in each well. The microplate was washed to remove unbound enzyme-labeled antibodies. The amount of horseradish peroxidase bound to each well was determined by the addition of a substrate solution. The reaction was stopped by the addition of 1 M sulfuric acid, and plates were read at 450 nm by a microplate reader^{***}. The detection limits of the three ELISA assays were as follows: IL-6 (sensitivity > 1.5 pg/mL), IL-8 (sensitivity 3.9 > pg/mL) and CXCL12 (sensitivity > 156 pg/mL). The cytokine concentrations were determined by interpolation from a standard curve and presented as pg/mL ($\pm$ one standard error of the mean) for duplicate samples of each of the tested conditions.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with a software^{sss}. Data were compared using one-way ANOVA between groups and differences were identified using the Bonferroni method, with significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

Phenotypic Characterization of HGF and HPLF

To confirm the phenotype of cells and because human periodontal ligament cells are considered a very heterogeneous population, HGF and HPLF were stained with a known fibroblast marker (FSP). Both HGF and HPLF exhibited positive staining for FSP (Fig 1), confirming the fibroblast phenotype of the cells. Also, the positive signal was maintained in both cells under *P*.

gingivalis stimulation and it was observed a slightly increase in the staining intensity for challenged HPLF when compared to HPLF non-stimulated (medium only).

TLR2 mRNA was More Highly Expressed in HGF When Compared to HPLF

To investigate whether TLR2 and TLR4 expression was different between HGF and HPLF we determined mRNA levels by qPCR. It was found a significantly higher mRNA expression of TLR2 in HGF compared to HPLF (Fig.2A) and a similar TLR4 level of mRNA expression between the two cell subpopulations (Fig.2B).

IL-6 Upregulation was Partially Prevented by TLR2 Knockdown and was Higher in HPLF Stimulated by TLR2 Synthetic Agonists

To elucidate whether the IL-6 upregulation in stimulated cells was due to TLR2 activation, we next performed siRNA-mediated silencing of TLR2 or TLR4 in both subpopulations of fibroblasts. A satisfactory knockdown for both receptors was reached in HGF and HPLF (Fig. 3). IL-6 increase was partially impaired by siTLR2 in a similar manner comparing HGF and HPLF under *P. gingivalis* LPS stimulation (Figs. 4A and 4B). Curiously, HGF expressed and produced less IL-6 than HPLF when stimulated by TLR2 synthetic agonists (Pam2CSK4 or Pam3CSK4) as shown in Fig 4C to 4F, and this secretion was significantly downregulated by both siTLR2 and siTLR4 (Figs. 4D and 4F).

IL-8 Upregulation in Stimulated Fibroblasts was Decreased by TLR2 Knockdown

The next step was to investigate whether IL-8 stimulation was due to TLR2 activation and if this activation was similar between HGF and HPLF. Similarly to IL-6, IL-8 expression and secretion was also downregulated by TLR2 silencing, but not for siTLR4, for all of the tested challenges (Fig.5). HGF produced more IL-8 compared to HPLF when stimulated by *P. gingivalis* LPS (Fig. 5B). However, no significant differences were found between HGF and HPLF regarding IL-8 secretion when stimulated by Pam2CSK4 or Pam3CSK4, synthetic agonists of TLR2/6 and TLR2/1, respectively (Figs. 5D and 5F), even though at the mRNA level, IL-8 was significantly increased for HPLF when stimulated by Pam2CSK4 or Pam3CSK4 (Figs. 5C and 5E, respectively).

CXCL12 Protein Secretion is Neither Influenced by TLR2 nor TLR4 Knockdown

When we investigated the possible role for TLR2 and TLR4 in CXCL12 release, a lower CXCL12 expression by TLR2 siRNA in HPLF stimulated by *P. gingivalis* LPS (Fig.6A) or Pam2CSK4 (Fig.6C) as well as in HGF under Pam3CSK4 stimulation (Fig.6E) were found, but only at mRNA level. For all the situations in both fibroblast subpopulations CXCL12 protein secretion remained unaffected (Fig.6B, 6D and 6F).

DISCUSSION

In this study, it was demonstrated for the first time the comparison of the important role of TLR2-mediated IL-6 and IL-8 secretion between HGF and HPLF as well as that CXCL12 was unaffected by TLR2 or TLR4 knockdown in any of these fibroblast subpopulations under *P. gingivalis* LPS challenge.

siRNA-mediated silencing allowed us to investigate and compare interference of these receptors on both subtypes of fibroblasts and to show the main differences between them. It is important to highlight that the decrease observed in the secretion of IL-6 and IL-8 in HGF and HPLF under TLR2 knockdown was not due to cell death because we did check the cell viability by MTT assay under each of the small interfering RNA-mediated condition (data not shown). It is true that siRNA-mediated silencing might not completely eliminate a possible contribution of even small rates of receptor expression, yet this is clearly not the case in this study since the cytokines secretion was significantly affected by TLR2 knockdown. In fact, TLR2 and TLR4 were silenced in approximately 90%.

It is important to highlight that TLR2 was upregulated in HGF but not in HPLF under *P. gingivalis* LPS stimulation and also under Pam2CSK4 or Pam3CSK4, TLR2/6 and TLR2/1 agonists, respectively, and the same did not happen to TLR4. It must be considered that we chose the time point of 6h to evaluate this response since the constitutive mRNA expression of TLR2 and TLR4 was shown to be more pronounced after 6 h in a time course study for both fibroblast subtypes (data not shown). One should note that even HGF expressing more TLR2 mRNA than HPLF, the pro-inflammatory cytokine secretion, like IL-6 and IL-8, was regulated only through siTLR2 in both of them and not only in HGF, when stimulated by *P. gingivalis* LPS. On the other hand, when Pam2CSK4, a TLR2/6 heterodimer agonist, and Pam3CSK4, a TLR2/1 heterodimer agonist, were utilized HPLF generated increased levels of IL-6 compared to HGF, even expressing less TLR2 than HGF. This stronger induction of TLR2 in HGF was also previously demonstrated with the use of viable *P. gingivalis*³². Controversy still exists about the TLR2 and TLR4 expression profiles in both HGF and HPLF. In one study, it was demonstrated that TLR2 was expressed more in HPLF than in HGF³³. Another investigation demonstrated that HGF consist of heterogeneous populations with regard to TLR4 expression². It was also reported that IL-6 was downregulated via TLR4 signaling in LPS stimulated HPLF³⁴.

In essence, the silencing capacity between HGF and HPLF was very similar and, consequently, initial gene expression level neither has a direct impact on the knockdown which could be achieved for a given target, as demonstrated in a previous study³⁵, nor on the magnitude of cytokine secretion by HGF or HPLF. Another work²⁹ showed that the magnitude of HGF responses to *P. gingivalis* LPS varied markedly between individuals, and in particular, it was possible that the heterogeneity in these responses was caused by the variability in the host's genetic background of these cells. Thus, HGF and HPLF here were collected and compared from the same donors. In the present study, the numerical data were not very similar between the three donors, but there was a clear pattern of response between them.

Taking this into account, activation of either TLR2 or TLR4 was shown to enhance the expression of IL-8^{33,36} and IL-6⁴. Souza et al. also demonstrated that cytokines from IL-6 family are regulated by TLR2 in HGF when stimulated by *P. gingivalis* LPS and TLR2 agonists²⁹, but the present study was the first to demonstrate that this is also true for HPLF and that at the protein level both HGF and HPLF had decreased IL-6 secretion under TLR2 knockdown and curiously by TLR4 knockdown when stimulated by TLR2 agonists. We hypothesize that even though TLR2 mRNA expression in both HGF and HPLF remained unaffected by TLR4 siRNA, the presence of TLR4 could be important for TLR2 signaling, at least in the case of IL-6 production. However, the mechanism for this crosstalk remains unclear and more studies are necessary to better understand the molecular regulation between these two receptors in cell physiology.

Concerning *P. gingivalis* LPS stimulation, it was reported earlier that it contains an atypical lipid A heterogeneity, showing both tetra- and penta-acylated lipid A structures³⁷. Tetra-acylated lipid A structures are TLR4 antagonists³⁸ whereas penta-acylated structures are TLR4 agonists³⁷. In fact, this heterogeneity in the structure of lipid A depends on the hemin concentrations in growth conditions, which in turn ultimately determine the ability of *P. gingivalis* LPS to function as an agonist or an antagonist for TLR4^{12,39}. Here, we clearly show that *P. gingivalis* LPS stimulates the production of both IL-6 and IL-8 via TLR2 signaling in both HGF and HPLF. Curiously, a recent study demonstrated that 10 µg/mL *P. gingivalis* LPS could activate both TLR2 and TLR4, whereas 1 µg/mL *P. gingivalis* LPS could only activate TLR2⁴⁰. In addition, this same study reported that both TLR2 and TLR4 were found to control cytokine secretion, including IL-6 and IL-8, induced by Gram-negative periodontal bacteria or their LPS at high enough concentrations.

In this study, it was also demonstrated that, conversely to IL-6 and IL-8, the constitutive expression of CXCL12 chemokine remained unaffected by TLR2 or TLR4 knockdown in both subtypes of fibroblasts when stimulated by all challenges. A previous study showed that in human fibroblasts the CXCL12 gene, in addition to cell-specific elements that regulate its constitutive expression, was regulated at the transcriptional level by hypoxia and growth-status, but not by typical pro-inflammatory stimuli such as cytokines⁴¹. Moreover, in vitro studies have demonstrated the reduction of CXCL12 production by *P. gingivalis* LPS^{10,28}. On the other hand, in vivo studies have demonstrated that neutrophil migration was enhanced in the presence of CXCL12^{22,42}, confirming the importance of this chemokine in the inflammatory microenvironment.

Recently, it was shown that LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4, the CXCL12 receptor, via TLR4⁴³. However, as far as HGF and HPLF participation in CXCL12 secretion, the present study is the first report to show that CXCL12 secretion is independent of TLR2 or TLR4, at least under *P. gingivalis* LPS and TLR2 synthetic agonist stimulation. Considering that CXCL12 is an important chemoattractant for hematopoietic and mesenchymal stem cells supporting their survival and proliferation²³, and that this mediator was shown to exert a migratory effect on periodontal ligament stem cells in vitro²⁴, it seems important to know that by knocking down TLR2 it would be possible to decrease crucial pro-inflammatory mediators, like IL-6 and IL-8, without affecting a chemokine involved in the repair process, like CXCL12.

Therefore, future investigations should better explore the participation of downstream molecules of TLR's pathway in HGF and HPLF immune-inflammatory responses regarding the targets investigated in the present study. Also, a detailed comparison of the molecular mechanisms that make the fine adjustment of cytokine expression in these two subtypes of fibroblasts would contribute to clearly understand the differences and particularities of each one in pathogenic processes affecting gingiva and periodontal ligament.

CONCLUSIONS

Taken together, our results demonstrate that in both HGF and HPLF, IL-6 and IL-8 secretion is decreased by TLR2 knockdown, and that CXCL12 remains unaffected by TLR2 or TLR4 silencing. Signaling through the innate immune system by fibroblasts, the most numerous resident non-professional immune cells in periodontium, controls the secretion of important cytokines that modulate the inflammatory microenvironment.

ACKNOWLEDGMENTS

There are no conflicts of interest associated with this study. This study was supported by the **State of São Paulo Research Foundation - FAPESP** (grant 2010/01230-1 to CFS). ACFM was supported by a PhD scholarship from FAPESP (2009/07376-9). The authors are grateful to Thiago José Dionísio, **laboratory specialist**, for technical assistance.

REFERENCES

1. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1995;63:3576-3581.
2. Wang PL, Oido-Mori M, Fujii T, et al. Heterogeneous expression of Toll-like receptor 4 and downregulation of Toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:863-867.
3. 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;273:1161-1167.
4. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2007;86:249-254.
5. Tang L, Zhou XD, Wang Q, 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;56:1064-1072.
6. Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2006;80:220-226.
7. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13:816-825.
8. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:712-725.
9. 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;77:60-73.
10. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 2005;141:467-474.
11. Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol* 2004;16:1431-1437.
12. Coats SR, Jones JW, Do CT, et al. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cell Microbiol* 2009;11:1587-1599.
13. Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Triantafilou M, Triantafilou K. Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13532-13537.
14. Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1998;77:555-564.
15. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003;74:103-110.
16. Verardi S, Page RC, Ammons WF, Bordin S. Differential chemokine response of fibroblast subtypes to complement C1q. *J Periodontol Res* 2007;42:62-68.
17. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 2006;41:554-559.
18. Lukacs NW, Chensue SW, Smith RE, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J Pathol* 1994;144:711-718.
19. Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 2000;30:914-919.

20. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901-1910.
21. Lau TT, Wang DA. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11:189-197.
22. Havens AM, Chiu E, Taba M, et al. Stromal-derived factor-1 alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:845-853.
23. Kortessidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005;105:3793-3801.
24. Du L, Yang P, Ge S. Stromal cell-derived factor-1 significantly induces proliferation, migration, and collagen type I expression in a human periodontal ligament stem cell subpopulation. *J Periodontol* 2012;83:379-388.
25. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84:1045-1049.
26. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1-21.
27. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998;128:127-137.
28. Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, 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;81:310-317.
29. Souza PP, Palmqvist P, Lundgren I, et al. Stimulation of IL-6 cytokines in fibroblasts by toll-like receptors 2. *J Dent Res* 2010;89:802-807.
30. Sipert CR, Moraes IG, Bernardinelli N, 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;36:91-94.
31. 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;25:157-162.
32. Scheres N, Laine ML, Sipos PM, et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 2011;46:407-416.
33. 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;18:14-23.
34. Sun Y, Shu R, Zhang MZ, Wu AP. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:362-369.
35. Krueger U, Bergauer T, Kaufmann B, et al. Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* 2007;17:237-250.
36. Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Montreekachon P, et al. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol* 2007;178:1151-1157.
37. Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol* 2006;8:857-868.
38. Coats SR, Pham TT, Bainbridge BW, Reife RA, Darveau RP. MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. *J Immunol* 2005;175:4490-4498.
39. Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2006;74:4474-4485.

40. 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;81:1488-1496.
41. Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, et al. CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine* 2011;53:184-190.
42. Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Thayer TC, et al. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *J Immunol* 2011;187:911-918.
43. Xing Q, de Vos P, Faas MM, Ye Q, Ren Y. LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4 via TLR-4. *J Dent Res* 2011;90:157-162.

Corresponding author: Carlos F. Santos, PhD, Professor, Bauru School of Dentistry - Department of Biological Sciences, Al. Octávio Pinheiro Brisola, 9-75 – Bauru - SP - 17012-901 Brazil, Phone: +55 14 3235-8282, E-mail: cebola@usp.br

Submitted March 15, 2012; accepted for publication May 3, 2012.

Figure 1

Phenotypic characterization of HGF and HPLF by FSP protein expression. After being plated at a density of 10^4 cells/well on eight-well chamber slides, cells were stimulated by *P. gingivalis* LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) or with medium only for 24h. Cultured HGF and HPLF exhibited positive staining for fibroblast surface protein (green fluorescent signal) and cell nuclei were stained with DAPI (blue fluorescent signal). Scale bar = $10 \mu\text{m}$.

Figure 2

Regulation of TLR2 (A) and TLR4 (B) mRNA expression in HGF and HPLF stimulated by *P. gingivalis* ($1 \mu\text{g/mL}$), Pam2CSK4 (50 ng/mL) or Pam3CSK4 (500 ng/mL) for 6 h. The mRNA levels were assessed by RT-qPCR using TaqMan gene expression assays and normalized against RPL13A (reference gene). The values are represented as means $\pm$ one SEM from 4 wells per group and the results shown are representative of three separate experiments (derived from one donor). The numerical data were not very similar between donors, but there was a clear pattern of response between the three donors. * indicates statistical difference comparing HGF and HPLF in the same group ($p < 0.01$).

Figure 3

TLR2 (A and B) and TLR4 (C and D) knockdown confirmation showed by mRNA expression in HGF and HPLF stimulated by *P. gingivalis* LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), Pam2CSK4 (50 ng/mL) or Pam3CSK4 (500 ng/mL) for 6 h. The expression of mRNA was quantified by RT-qPCR using the TaqMan gene expression assays and were then normalized using RPL13A (reference gene). The values are represented as means $\pm$ one SEM from 4 wells per group and the results shown are representative of three separate experiments (derived from one donor). The numerical data were not very similar between donors, but there was a clear pattern of response between the three donors. * indicates statistical difference related to the siSCR in the same group of fibroblasts ($p < 0.01$).

Figure 4

TLR2 and TLR4 silencing effect on the regulation of IL-6 mRNA expression (A, C, E) and protein production (B, D, F) in HGF and HPLF stimulated by *P. gingivalis* LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), Pam2CSK4 (50 ng/mL) or Pam3CSK4 (500 ng/mL) for 6 h. The mRNA levels were quantified by RT-qPCR using the TaqMan gene expression assays and normalized with RPL13A. Protein levels in the culture media were assessed by ELISA. The values are represented as means $\pm$ one SEM from 4 wells per group and the results shown are representative of three separate experiments (derived from one donor). The numerical data were not very similar between donors, but there was a clear pattern of response between the three donors. * indicates statistical difference related to the siSCR in the same group of fibroblasts ($p < 0.01$). [#] indicates statistical difference on the siSCR between HGF and HPLF ($p < 0.05$).

Figure 5

*TLR2 and TLR4 silencing effect on the regulation of IL-8 mRNA expression (A, C, E) and protein (B, D, F) in HGF and HPLF stimulated by P. gingivalis LPS (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) and Pam3CSK4 (500 ng/mL) for 6 h. The mRNA levels were quantified by RT-qPCR using the TaqMan gene expression assays and normalized with RPL13A. Protein levels in the culture media were assessed by ELISA. The values are represented as means ± one SEM from 4 wells per group and the results shown are representative of three separate experiments (derived from one donor). The numerical data were not very similar between donors, but there was a clear pattern of response between the three donors. * indicates statistical difference related to the siSCR in the same group of fibroblasts ($p < 0.01$). # indicates statistical difference on the siSCR between HGF and HPLF ($p < 0.05$).*

Figure 6

*TLR2 and TLR4 silencing effect on the regulation of CXCL12 mRNA expression (A, C, E) and protein (B, D, F) in HGF and HPLF stimulated by P. gingivalis LPS (1 µg/mL), Pam2CSK4 (50 ng/mL) and Pam3CSK4 (500 ng/mL) for 6 h. The mRNA levels were quantified by RT-qPCR using the TaqMan gene expression assays and normalized using RPL13A. Protein levels in the culture media were assessed by ELISA. The values are represented as means ± SEM from 4 wells per group and the results shown are representative of three separate experiments (derived from one donor). The numerical data were not very similar between donors, but there was a clear pattern of response between the three donors. * indicates statistical difference related to the siSCR in the same group of fibroblasts ($p < 0.05$). # indicates statistical difference on the siSCR between HGF and HPLF ($p < 0.05$).*

§ Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.

|| Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

¶ Abcam, Cambridge, UK.

Vector Laboratories, Burlingame, CA

** Leica TCS SPE, Mannheim, Germany.

†† Ambion Inc., Austin, TX.

‡‡ InvivoGen, San Diego, CA.

§§ Cells to Ct, Ambion Inc., Austin, TX.

||| Applied Biosystems, Warrington, U.K.

¶¶ ViiA 7 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, U.K

*** Read-set-go!, eBiosciences, San Diego, CA.

††† Quantikine, R&D Systems, Abingdon, UK.

‡‡‡ Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.

§§§ GraphPad prism 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA.

Morandini *et al.* Figure 1

Figure 2. Morandini *et al*

Figure 3. Morandini *et al*

Figure 4. Morandini *et al*

Figure 5. Morandini et al

Figure 6. Morandini *et al*

ANEXOS

ANEXO A - Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB/USP

**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 108/2009

Bauru, 27 de agosto de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Avaliação do papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas por fibroblastos humanos periodontais deficientes desses receptores"**, de autoria de Ana Carolina de Faria Morandini, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 26 de agosto de 2009 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Atta

Coordenadora

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B

<p style="text-align: center;">Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Comitê de Ética em Pesquisa</p>
<hr/>		
Proc. Nº 108/2009		
Título do Projeto:	<i>Avaliação do papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas por fibroblastos humanos periodontais deficientes desses receptores</i>	
Autor(es):	Ana Carolina de Faria Morandini	
Orientador(a):	Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos	
Co-orientador(a)		
Data de entrega do Relatório Final: 29 de agosto de 2012		
Data da reunião do CEP em que o 26 de setembro de 2012		
Parecer Final será analisado:		
<hr/>
Maristela Petenuci Ferrari Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa		