BRUNO NUNES DE FRANÇA

Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal

São Paulo

2019

BRUNO NUNES DE FRANÇA

Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Renata Sipert

São Paulo

2019

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

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

França, Bruno Nunes.
Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal / Bruno Nunes de França; orientador Marinella Holzhausen Caldeira; coorientador Carla Renata Sipert -- São Paulo, 2019.
95 p. : fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão Corrigida

1. Protease. 2. Célula Mesenquimal. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Sipert , Carla Renata. III. Título.

Franca BN. Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) sobre a atividade Osteogênica de células do ligamento periodontal. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:05/12/2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).Luciana Saraiva

Instituição: FOUSP Julgamento: APROVADO

Prof(a). Dr(a).Veronica Franco de Carvalho

Instituição: UNINOVE Julgamento: APROVADO

Prof(a). Dr(a). Vanessa Tubero Euzebio Alves

Instituição: UK Julgamento: APROVADO

Dedico este trabalho aos meus amados pais, **Sidnei** e **Silvia**, serei eternamente grato a todos os esforços e sacrifícios que me deram a oportunidade de construir os meus sonhos. Palavras não bastam para agradecer.

Ao meu irmão **Lucas**, que luta uma batalha diária e me estimula a ser alguém melhor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Á Professora Doutora **Marinella Holzhausen Caldeira,**

Agradeço todos os dias a oportunidade de ter sido seu orientado. Com você aprendi tudo sobre a carreira acadêmica, sobre a Periodontia e principalmente sobre a vida. Sou grato a todos os momentos que vivemos, orgulhoso do trabalho que desenvolvemos e principalmente realizado com o profissional e a pessoa que você me ensinou a ser, sempre me apoiando em minhas escolhas e me dando suporte nos momentos mais difíceis.

Obrigado por ser minha “mãe academica”.

Obrigado por acreditar em mim quando eu mesmo duvidava.

Cada tijolo da minha vida profissional leva sua assinatura.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os pacientes que participaram desse estudo. Sem a colaboração de vocês essa pesquisa não se realizaria.

À minha Co-orientadora, professora Carla Renata Sipert, cuja sabedoria foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Impossível medir o quanto aprendi com a senhora. Meu muito obrigado

À minha querida amiga Letícia Miquelitto Gasparoni, você foi um grande presente que esse doutorado me deu. Por todo percurso seu companheirismo foi fundamental para vencer os obstáculos e comemorar as conquistas. Muito obrigado por tudo.

À minha grande amiga Vanessa Costa Maruí por todo apoio, amizade e carinho durante nossa jornada. .

Às amigas Estela Sanches Rebeis e Marília Cabral Cavalcanti pelo companheirismo e união.

Ao Professor Titular Giuseppe Alexandre Romito por todo suporte e apoio. Ser seu aluno foi uma lição acadêmica e de vida. Muito obrigado.

Aos Professores de Periodontia da FOUSP, aprendi grandes lições com cada um. A determinação da Professora Luciana Saraiva, a garra da Professora Cristina Villar, a liderança do Professor Claudio Pannuti, a buscar o lado positivo das coisas com o Professor João Batista, a pensar além do que vemos com a Professora Marina Conde, o cuidado com o ser humano com Professor Marco Georgetti, os detalhes observados pelo Professor Luiz Lima e atenção dedicada aos alunos do Professor Giorgio de Micheli. Admiro muito todos vocês e tenho orgulho de ter sido aluno de grandes mestres.

Às minhas colegas de laboratório, Claudia Menezes e Laís Pizzatto pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus colegas de Pós Graduação, Emanuel Rovai, Lucas Ambrosio, Emmanuel Albuquerque, Marcella Moro, Marcelo Sirolli, Vítor Sapata, Alexandre Llanos, Marcela Giudicissi, Maria Luiza Souto, Laís Nakao, Tomaz Alves, Bruna Di Profio e todos os colegas da área de Periodontia, minha gratidão pelos momentos que vivemos.

À Universidade de São Paulo que é como uma casa em meu coração e que me deu inúmeras oportunidades.

À Sra. Maria Cecília Forte Muniz, secretária do Departamento de Estomatologia, amiga que me orienta pela questões administrativas da FOUSP.

À Sra. Marília Camargo Gomes, secretária da Disciplina de Periodontia, você foi como um anjo para mim. Obrigado por tudo.

“A conquista só é plena quando temos a certeza que fizemos tudo com a entrega máxima, comprometimento, amor e em união com nossos amigos, pois pessoas são para somar”.

Silvia A. Nunes de França

RESUMO

França BN. Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

O receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) está associado à patogênese de doenças inflamatórias crônicas, incluindo periodontite, e a ativação do PAR-2 desempenha papel relevante no processo inflamatório. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da ativação do PAR-2 na atividade osteogênica de células-tronco do ligamento periodontal humano (PDLSCs). PDLSCs obtidos de 3 sujeitos foram cultivados em meio controle ou em meio osteogênico por 2, 7, 14 e 21 dias. Proliferação celular, atividade da fosfatase alcalina (ALP), expressão gênica (qPCR) e expressão proteica (ensaio ELISA) de fatores osteogênicos e depósitos de cálcio, concentração de cálcio (sobrenadante) foram avaliados na presença de tripsina (0,1 U/ml), peptídeo agonista de PAR-2 (100nM), peptídeo antagonista de PAR-2 (100 nM) e peptídeo controle de PAR-2. A ativação do PAR-2 levou à alteração na proliferação celular, diminuição na formação de depósitos de cálcio ($p < 0,05$), na concentração de cálcio ($p < 0,05$) e atividade da ALP ($p < 0,05$). Além disso, os ensaios de qPCR e ELISA mostraram que a ativação de PAR-2 pode aumentar a expressão gênica e protéica de RANKL ($p < 0,05$) e diminuir a expressão gênica e proteica de OPG ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo demonstram que a ativação do PAR-2 aumenta a proliferação e diminuem a atividade osteogênica dos PDLSCs, indicando que o PAR-2 pode ser um alvo importante a ser considerado no uso de células mesenquimais do ligamento periodontal em procedimentos regenerativos em periodontia.

Palavras-chave: Receptor ativado por protease do tipo 2 Células mesenquimais.

ABSTRACT

França BN. Effect of type 2 protease activated receptor (PAR-2) activation in the osteogenic activity of the periodontal ligament stem cells [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is associated with the pathogenesis of chronic inflammatory diseases including periodontitis and PAR-2 activation plays a relevant role in the inflammatory process. The aim of the present study was to evaluate the effect of PAR-2 activation on the osteogenic activity of human periodontal ligament stem cells (PDLSCs). PDLSCs obtained from 3 subjects were treated with a control medium or with an osteogenic medium for 2, 7, 14, and 21 days. Cell proliferation, alkaline phosphatase activity (ALP), gene (qPCR), and protein expression (ELISA assay) of osteogenic factors and Calcium deposits, calcium concentration (supernatant) were assessed in the presence of trypsin (0,1U/ml), PAR-2 specific agonist peptide (100nM), PAR-2 antagonist peptide (100nM), and PAR-2 control peptide. The activation of PAR-2 led to alteration on the cell proliferation, a decrease in the formation of calcium deposits ($p<0.05$), in calcium concentration ($p<0.05$) and ALP activity ($p<0.05$). Further, qPCR and ELISA assay showed that activation of PAR-2 may increase gene and protein expression of RANKL ($p<0.05$), and decrease the gene and protein expression of OPG ($p<0.05$). The results of the present study demonstrate that PAR-2 activation increases proliferation decrease the osteogenic activity of PDLSCs, indicating that PAR-2 may be an important target to be considered in the use of periodontal ligament mesenchymal cells in regenerative procedures in periodontology.

Keywords: Protease activated receptor2, Stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Migração celular a partir de um fragmento tecidual do ligamento periodontal. – Magnificação x100 36

Figura 4.2 - Grupos de tratamento 38

Figura 4.3 – Sequência dos primers utilizados para amplificação do cDNA.....43

Figura 5.1 - 99.1% de células positivas para CD90 48

Figura 5.2 - 98.9% de células positivas para CD146 49

Figura 5.3 - 99.4% de células positivas para CD44 50

Figura 5.4 - 3.2% de células positivas para CD31 e 0.4% de células positivas para CD34 51

Figura 5.5 - 2.8% de células positivas para Stro-1 52

Figura 5.6 - Ensaio mineralização – 21 dias - Magnificação x100 54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Resultado Ensaio mineralização – 7, 14 e 21 dias 53

Gráfico 5.2 - Resultado ensaio de proliferação – 48 e 96 horas - Meio controle (MC) e Meio Osteogênico (MO)..... 55

Gráfico 5.3 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 57

Gráfico 5.4 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 58

Gráfico 5.5 - Resultado qPCR- Expressão gênica de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Contole (MC)..... 59

Gráfico 5.6 - Resultado qPCR- Expressão gênica de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias Meio Osteogênico (MO) 60

Gráfico 5.7 - Resultado qPCR- Expressão gênica de Runx2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 61

Gráfico 5.8 - Resultado qPCR- Expressão gênica de Runx2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 62

Gráfico 5.9 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)
..... 63

Gráfico 5.10- Resultado qPCR- Expressão gênica de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 64

Gráfico 5.11- Resultado ELISA- Níveis de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)..... 67

Gráfico 5.12- Resultado ELISA- Níveis de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 68

Gráfico 5.13- Resultado ELISA- Níveis de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)..... 69

Gráfico 5.14- Resultado ELISA- Níveis de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO..... 70

Gráfico 5.15- Resultado ELISA- Níveis de Runx2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC..... 71

Gráfico 5.16- Resultado ELISA- Níveis de RUNX2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 72

Gráfico 5.17- Resultado ELISA- Níveis de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 73

Gráfico 5.18- Resultado ELISA- Níveis de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 74

Gráfico 5.19- Resultado ELISA- Níveis de Il-6 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 75

Gráfico 5.20- Resultado ELISA- Níveis de IL-6 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 76

Gráfico 5.21- Resultado ELISA- Níveis de IL-10 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 77

Gráfico 5.22- Resultado ELISA- Níveis de IL-10 – 2, 7, 14 e 21 dias -Meio Osteogênico (MO) 78

Gráfico 5.23- Resultado ELISA- Níveis de CCL2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controole (MC) 79

Gráfico 5.24- Resultado ELISA- Níveis de CCL2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 80

Gráfico 5.25- Resultado ELISA- Níveis de MCSF – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC) 81

Gráfico 5.26- Resultado ELISA- Níveis de MCSF – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO) 82

Gráfico 5.27- Resultado Níveis de Cálcio – 2, 7 e 14 dias 83

Gráfico 5.28- Resultado Níveis de ALP – 2, 7 e 14 dias 84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
2 REVISÃO DE LITERATURA 27
2.1 A DOENÇA PERIODONTAL E SUA RELAÇÃO COM OS RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASE 27
2.2 EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE DO TIPO 2 E SUA AÇÃO SOBRE O PERIODONTO 28
2.3 CELULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL 29
3 PROPOSIÇÃO 33
4 MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E SELEÇÃO DE PACIENTES 35
4.2 CULTURA DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL 35
4.3 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO 37
4.4 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR 37
4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS 37
4.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR 38
4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR-2 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE OPG, RANKL, OC E RUNX2 39
4.8 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEÍCA IL-1, IL-6, OPG, CCL2, MCSF E RANKL E ENSAIO DE ATIVIDADE DE ALP 44
4.9 AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO IN VITRO ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA E ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM SOBRENADANTE 44
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

5 RESULTADOS 47
5.1 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO 47
5.2 MINERALIZAÇÃO 53
5.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR 54
5.4 EXPRESSÃO GÊNICA - qPCR 56
5.5 DETECÇÃO DOS NÍVEIS PROTEÍCOS DE RANKL, OPG, MCSF, IL-6, IL-10 e CCL2 POR ELISA 65
5.6 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CALCIO 83
5.7 DETECÇÂO DOS NÌVEIS DE ALP 84
6 DISCUSSÃO 85
7 CONCLUSÃO 87
REFERÊNCIAS 89
ANEXOS 93

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que resulta na destruição dos tecidos periodontais de sustentação formados pelo cemento, osso alveolar e ligamento periodontal (Hajishengallis et al., 2015). A regeneração dos tecidos periodontais perdidos é um dos objetivos da terapia periodontal (Wu et al., 2017), mas também um grande desafio. As células-tronco parecem ser uma opção interessante na busca da regeneração periodontal devido à sua capacidade de se diferenciar e se expandir em diferentes linhagens celulares, como osteoblastos, osteócitos, adipócitos e condrócitos, mantendo funções específicas (Hu et al., 2018). As células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) podem desempenhar um papel importante na regeneração dos tecidos periodontais devido à sua capacidade de se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos (Sowmya et al., 2015), e já foi demonstrado que PDLSCs desempenham um papel importante na regeneração de tecidos periodontais incluindo ligamento periodontal e osso trabecular (Seo et al., 2004).

PDLSCs durante a inflamação exibiram deterioração da osteogênese em termos de sua capacidade de mineralizar nódulos e diminuir seus níveis de expressão de genes osteogênicos, como osteocalcina (OC), transcrição relacionada ao fator Runt 2 (RUNX-2) e fosfatase alcalina (ALP) (Tang et al., 2016). Li et al. (2014) verificaram que PDLSCs coletados de dentes reabsorvidos tiveram expressão aumentada do ativador Receptor do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL) e diminuição da osteoprotegerina (OPG). Esse desequilíbrio entre RANKL e OPG leva a uma maior diferenciação osteoclástica, possivelmente contribuindo para maior perda óssea periodontal (Boyle at al., 2003; Belibasakis et al., 2011). Além disso, os precursores dos osteoclastos que expressam o RANK, um receptor do RANKL, reconhecem o RANKL por meio da interação célula a célula e se diferenciam em osteoclastos (Katagiri; Takahashi, 2002).

A associação da ativação do receptor ativado por protease tipo 2 (PAR-2) com a doença periodontal foi confirmada por uma série de estudos *in vitro* e *in vivo* em animais e humanos (Holzhausen et al., 2006Holzhausen et al., 2010Euzebio Alves et al., 2013). A ativação do PAR-2 desencadeia uma resposta pró-inflamatória nos

tecidos periodontais devido ao aumento da secreção de prostaglandinas E2 e F2 (PGE2 e PGF2), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e granulócitos fator estimulante de colônias em fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e neutrófilos (Bohm et al., 1996; Abraham; MacKie, 1999; Uehara et al., 2005).

Holzhausen et al. (2010) relataram que pacientes com periodontite crônica tinham níveis mais elevados de expressão de PAR-2 correlacionados com níveis mais altos de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-alfa no fluido gengival. Após o tratamento periodontal, os níveis de expressão de PAR-2 diminuíram significativamente. Esses dados sugerem uma relação bidirecional direta entre a periodontite e a ativação do PAR-2 Fagundes et al. 2011).

Fagundes et al. (2011) demonstraram que pacientes com periodontite crônica apresentam maior expressão de PAR-2 em suas bolsas periodontais e maior concentração de citocinas pró-inflamatórias quando infectadas por *Porphyromonas gingivalis*. Euzebio Alves et al. (2013) mostraram que o PAR-2 está associado ao aumento de importantes mediadores inflamatórios associados à destruição do periodonto, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), necrose tumoral fator alfa (TNF-alfa), metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2), metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8), dentre outros, e o tratamento periodontal não cirúrgico levou à diminuição da expressão do gene e proteína PAR-2, também de mediadores pró-inflamatórios, sugerindo que o PAR-2 tem sua expressão associada à presença de inflamação periodontal.

Os efeitos que a ativação de PAR-2 pode ter sob PDLSCs ainda não são conhecidos na literatura. Considerando o papel do PAR-2 durante o processo da doença periodontal, é essencial entender esses efeitos nos PDLSCs que apresentam grande potencial na terapia de regeneração dos tecidos periodontais. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da ativação do PAR-2 na atividade osteogênica de PDLSC periodontais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DOENÇA PERIODONTAL E SUA RELAÇÃO COM OS RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASE

A periodontite é definida como uma doença crônica inflamatória, de origem infecciosa, que resulta na destruição dos tecidos periodontais de suporte formados pelo cemento, osso alveolar e ligamento periodontal (Hajishengallis, 2015). Tal destruição é em decorrência da presença persistente de microrganismos específicos nos tecidos periodontais, em geral anaeróbios ram negativos, os quais produzem uma série de substâncias tóxicas que podem levar a uma resposta imuno-inflamatória não específica do hospedeiro, do tipo Th1 e Th2 (Schenkein et al., 2006).

Estudos indicam que as proteases (ou proteinases) bacterianas possuem a capacidade de modular a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, uma vez que podem interagir diretamente com os receptores de superfície das células de defesa do hospedeiro (Travis et al., 2002). Recentemente foi demonstrado que as cisteíno-proteases bacterianas (gingipaínas), produzidas por um importante patógeno envolvido no desenvolvimento das doenças periodontais, a *P. gingivalis*, podem atuar como moléculas sinalizadoras ao se ligarem com o receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2). Esse receptor por sua vez, possui 7 domínios transmembrânicos acoplados à proteína G, capaz de gerar uma série de sinais intra-celulares (Lourbakos et al., 2001).

Os receptores ativados por protease (PARs) são caracterizados por um mecanismo único de ativação que permite atuarem como sensores celulares da atividade proteolítica. A ativação dos PARs ocorre através da clivagem do domínio N-terminal extracelular gerando uma nova sequência, constituída de um peptídeo ligante com 5 ou 6 aminoácidos. Em seguida, tal porção terminal ligar-se-á ao quarto looping transmembrânico do próprio receptor, ativando-o e iniciando a sinalização celular (Ossovskaya; Bunnet, 2004).

A ativação dos PARs é feita de maneira irreversível, e de maneira a evitar uma sobre-estimulação do mecanismo, tal receptor sofre rápida internalização para que sejam destruídos dentro dos lisossomos. Há uma constante renovação desses receptores na membrana celular através da síntese realizada no Complexo de Golgi. Novas sensibilizações dos PARs dar-se-ão somente com a re-disponibilização na superfície celular (Bohm et al., 1996).

Foram identificados dentro da família dos PARs, quatro tipos de receptores: PAR-1, PAR-3 e PAR-4, os quais podem ser ativados por trombina; e PAR-2, o qual pode ser ativado por tripsinas pancreáticas, extra-pancreáticas (endoteliais e epiteliais), triptase do mastócito, proteinase do tipo 3 do neutrófilo, fatores de coagulação (VIIa/ Xa), serino-protease do tipo 1 da membrana, granzimas e pela protease bacteriana gingipaína, a qual é produzida pelo periodonto-patógeno *P. gingivalis* (Lourbakos et al., 1998).

Ainda, como mostrado por estudos de nosso grupo (Holzhausen et al., 2010), (Euzebio Alves et al., 2013), a expressão aumentada de PAR-2 no fluído gengival de pacientes com periodontite crônica esta intimamente relacionada com presença de mediadores pró-inflamatórios como TNF-α, IL-1, IL-8, entre outros, estando associado a uma maior atividade proteolítica total (atividade do tipo tripsina).

2.2 EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE DO TIPO 2 E SUA AÇÃO SOBRE O PERIODONTO

A ativação do PAR-2 parece desencadear uma resposta pró-inflamatória nos tecidos periodontais devido ao aumento da secreção de prostaglandinas E2 e F2 (PGE2 e PGF2), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e fator estimulador de colônias de granulócitos em fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e neutrófilos (Bohm et al., 1996; Abraham LA; MacKie, 1999; Lourbakos et al., 2001; Uehara et al., 2005).

Haja visto as células presentes no ligamento periodontal expressem o PAR-2 (Lourbakos et al., 2001; Uehara et al., 2005), foi confirmada a associação da ativação do PAR-2 durante o curso da doença periodontal, o que vem sendo confirmado com

uma série de estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, em animais e seres humanos (Loubakos et al., 1998; Holzhausen et al., 2006; Holzhausen et al., 2010; Fagundes et al., 2011; Euzebio Alves et al., 2013).

2.3 CELULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Durante o curso da periodontite o ligamento periodontal é um dos tecidos alvo de destruição. Ele é formado por tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas, é altamente vascularizado e contém em sua matriz extracelular osteoblastos, fibroblastos, restos epiteliais de Malassez, macrófagos, cementoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (Nanci, 2003; Seo et al., 2004; Bartold et al., 2000-. As células mesenquimais indiferenciadas do ligamento são células progenitoras que têm capacidade de se diferenciar em células especializadas (Han et al., 2014). As células mesequimais são células multipotentes e possuem um grande potencial para proliferar e diferenciar em osteoblastos, osteócitos, adipócitos e condrocitos (Heino et al., 2008). Em 2016, Tang et al., mostraram que a inflamação pode atuar sobre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento e torna-las disfuncionais quanto à sua capacidade de diferenciação osteogênica. Durante a inflamação, essas células, exibiram deterioração da osteogênese em termos de sua capacidade de formação de nódulos mineralizados e diminuição de níveis de expressão de genes osteogênicos, como a osteocalcina (OC), transcrição relacionada ao Runt factor 2 (RUNX-2) e fosfatase alcalina (ALP) (Tang et al, 2016).

Li et al. (2014) apuraram que células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal coletadas de dentes com reabsorção radicular primária, tiveram expressão aumentada nos níveis de ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-ß (RANKL) e diminuição da osteoprotegerina (OPG). Esse desequilíbrio entre RANKL e OPG leva a maior diferenciação osteoclástica, contribuindo possivelmente para maiores perdas ósseas periodontais (Boyle et al., 2003; Belibasakis et al., 2011). Ainda, precursores de osteoclastos que expressam RANK, um receptor para RANKL,

reconhecem o RANKL através da interação célula com célula e se diferenciam em osteoclastos (Katagiri; Takahashi, 2002).

De maneira interessante, Amiable et al. (2009) avaliaram o impacto do PAR-2 em osteoblastos de pacientes com osteoartrite. Foi demonstrado que o PAR-2 tem um papel na reabsorção óssea por estimular a regulação de fatores de remodelação óssea como MMP-1, MMP-9, IL-6 e RANKL. Como mostrado por Amiable et al. em 2009, a ativação do PAR-2 induziu uma maior expressão de RANKL em osteoblastos, o que pode estar associado a maior diferenciação osteoclástica e aumento na reabsorção óssea.

Temos ainda relacionado à remodelação óssea, importantes macromoléculas secretadas por osteoblastos na matriz orgânica óssea como a osteocalcina (OC) e fosfatase alcalina óssea (ALP), presentes durante a fase de formação óssea. (Katchburian et al., 2004). Outras importantes moléculas que podem influenciar o metabolismo ósseo, especificamente durante a reabsorção óssea, incluem o ligante 2 de quimiocínas (CCL2) e o fator estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). O CCL2 pode ser encontrado em sítios de erupção dentária e degradação óssea, é expresso por osteoclastos maduros e osteoblastos, sendo um importante indicativo de presença de osteoclastos. Ainda, o M-CSF liga-se a receptores em osteoclastos induzindo ao aumento dos níveis de calcio no plasma (Meirelles et al., 2009).

Considerando as evidências mostradas na literatura, a hipótese deste estudo é que a ativação do PAR-2 pode afetar negativamente o processo de mineralização induzido em células mesenquimais do ligamento periodontal, diminuindo fatores osteogênicos, podendo ter um importante papel durante o processo de remodelação óssea tendo potêncial em futuros tratamentos de regeneração periodontal.

Observamos que ainda há a necessidade de mais estudos a fim de elucidar os mecanismos associados à ativação do PAR-2 e os efeitos dessa ativação sobre os tecidos periodontais. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da ativação do PAR-2 sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal. Especificamente, serão avaliados os efeitos da ativação do PAR-2 sobre sobre o processo de mineralização in vitro e ainda expressão gênica de Runx2, RANKL, OPG, ALP e OC. Ainda, será avaliado o efeito da ativação do PAR-2 sobre a expressão proteica de IL-1, IL-6, OPG, CCL2, MCSF e RANKL, além da

influência do PAR-2 sobre a proliferação de células mesenquimais do ligamento periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da ativação do PAR-2 sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados 3 pacientes jovens, com idades entre 18 e 27 anos,que passaram por atendimento na clínica da Disciplina de Cirurgia dentro do ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). A doação dos dentes pelos pacientes foi feita mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) devidamente aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FOUSP (Protocolo 803.811) (Anexos A e B). Foram selecionados terceiros molares hígidos com indicação de exodontia para fins ortodônticos.

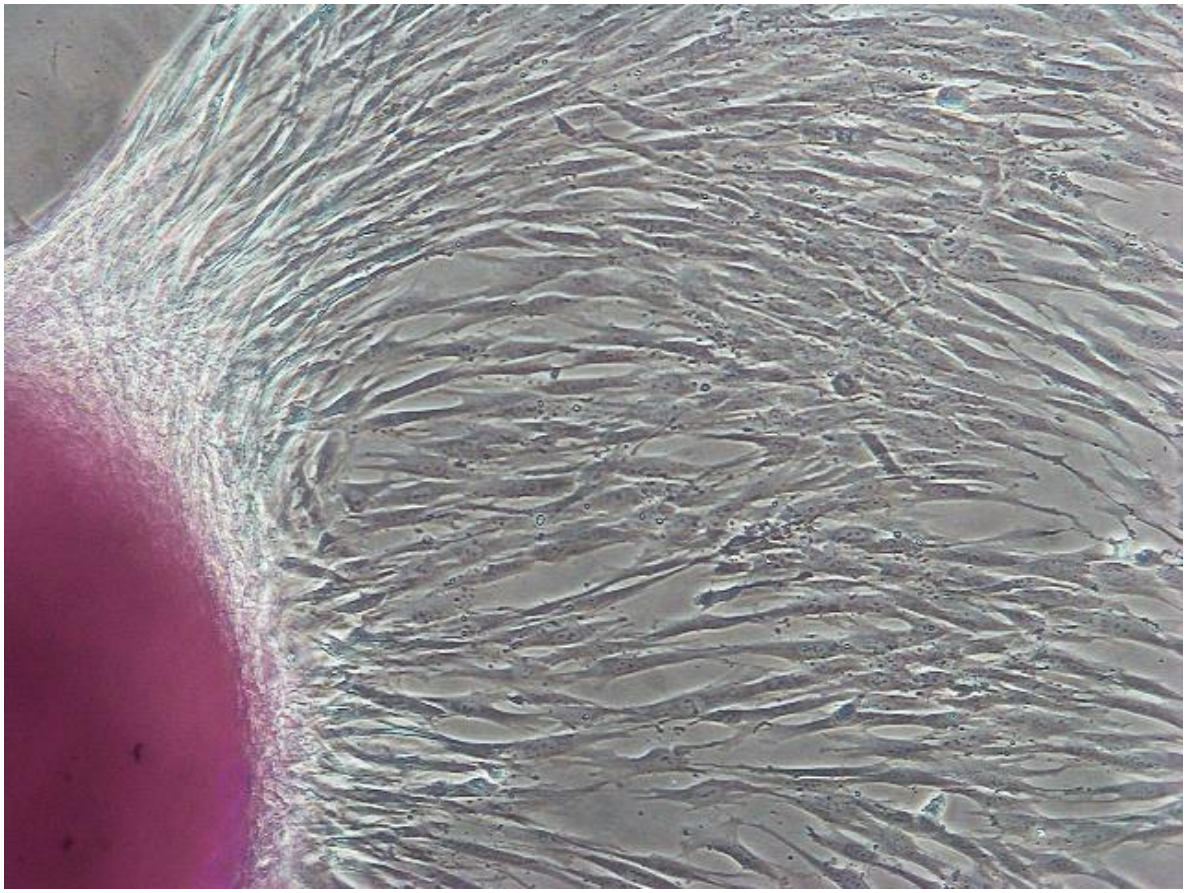
Os dentes tiveram as células do ligamento periodontal coletadas e foram submetidas posteriormente aos tratamentos com agonistas e antagonistas específicos do PAR-2, a fim de avaliar o efeito da ativação do receptor sobre a atividade osteogênica de células do ligamento periodontal.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Após a extração, os espécimes foram transportados em meio apropriado, α-ModifiedEagleMedium(α-MEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) até o laboratório de cultura de células. Sob condições assépticas, os dentes tiveram o tecido gengival que ainda estava aderido removido e devidamente descartado. O tecido do ligamento periodontal foi obtido por meio de raspagem do terço médio da raiz, com curetas periodontais, evitando assim eventual contaminação com o tecido gengival ou pulpar. Os tecidos coletados foram então fragmentados, utilizando lamina de bisturi em uma placa estéril, em espécimes de 1mm de espessura aproximadamente depositados em frascos para cultura de 25 cm^2 imersa em α-MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (todos os reagentes

provenientes de Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e mantidos em incubadora a 37°C, 5% de CO^2 e 100% de umidade. Na figura 4.1 é possível acompanhar o processo de migração celular. Aproximadamente 5-10 dias após as células migrarem dos tecidos e atingirem a confluência adequada, em torno de 80 a 90%, as células foram desaderidas por Accutase® (Sigma-Aldrich, NY, USA) e submetidas à nova cultura em frascos de 150cm2. Células obtidas entre a 3°–9° passagem foram utilizadas nos experimentos. Todos os meios de cultura e suplementos utilizados foram da Gibco (Grand Island, NY, USA).

Figrua 4.1 - Migração celular a partir de um fragmento tecidual do ligamento periodontal. – Magnificação x100



Fonte: O autor

4.3 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A pureza e a homogeneidade das células foram confirmadas por análise de citometria de fluxo.

Para a identificação do fenótipo de células mesenquimais, aproximadamente $5x10^5$ células isoladas do ligamento periodontal foram lavadas em PBS, cetrifugadas e resuspensas em PBS, quanto? e incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: STRO-1, CD14-FITC, CD90-FITC (eBioscience, SanDiego, CA), CD34-FITC (Biolegend, USA), CD31-PE, CD-44- PE, CD45-PE (eBioscience, SanDiego, CA) e CD146-PE (Biolegend, USA) por 30 minutos a 4°C. A suspensão de células foi então lavada duas vezes com PBS e analisada com o citômetro de fluxo FACSort (Becton Dickinson). Um total de 5–10.000 eventos foram examinados usando-se um comprimento de onda de 488 nm. e analisados usando-se o software Cell Quest (Becton Dickinson). Os resultados foram expressos como % de células positivas.

4.4 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

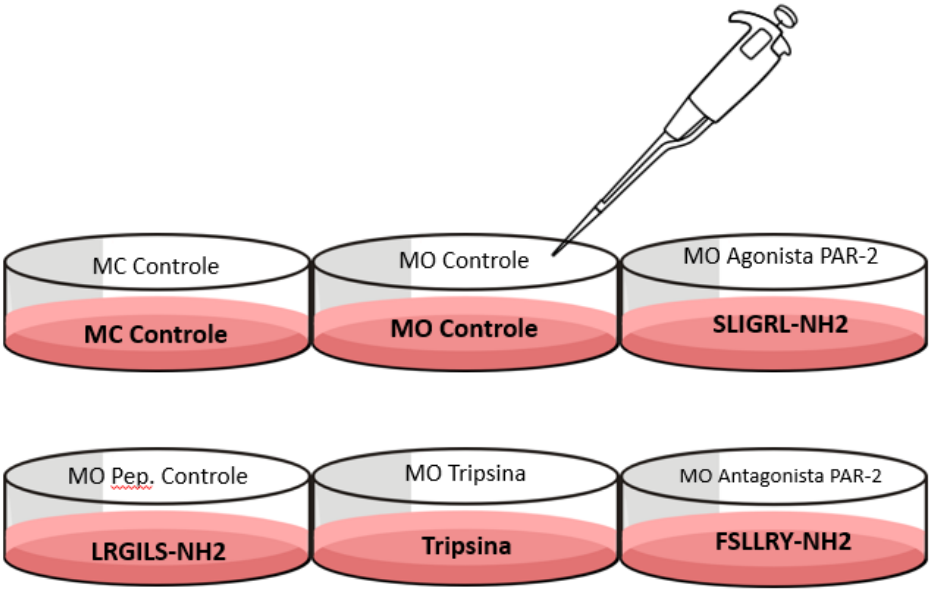
Para a indução da difrenciacao celular, em osteoblastos, as células tiveram seu meio de cultura substituído por meio controle (MC) meio de cultura α-MEM acrescido de 10% SBF ou por meio Osteogênico (MO), constituido do MC e acrescido de 0,1mM de dexametasona (Invitrogen, 2mM deβ-glicerofosfato – Sigma-Aldrich) e 50 µg/ml de ácido ascórbico –(Sigma-Aldrich).

4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

As células do ligamento periodontal diferencias e não diferencidas foram descoladas da superfície, resuspensas, e contadas, depois semeadas em placas de 24 poços como descrito acima a uma densidade de aproximadamente 25.000

células/cm². Células em MC ou MO foram estimuladas com 100µM/L de tripsina do pâncreas humano (Sigma-Aldrich). Adicionalmente, as células foram expostas ao peptídeo sintético agonista do PAR-2, 100µMol/L SLIGRL-NH2 (Tocris) somente. Em outro grupo experimental, as culturas foram pré-tratadas com 100µMol/L peptídeo controle de PAR-2 LRGILS-NH2(Tocris). Ainda, foi utilizado um grupo com 100µMol/L do Antagonista específico do PAR-2 FSLLRY-NH2 (Tocris) no tempo experimental com 21 dias. Como controle da reação, células cultivadas sem a adição de tripsina, sem adição de agonistas de PAR-2 e sem adição de peptídeo controle de PAR-2 também foram utilizadas. Na figura 4.2 temos um esquema dos grupos de tratamento.

Figura 4.2 - Grupos de tratamento



Fonte: O autor

4.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi analisada em 48 e 96 horas de experimento com o uso do kit Quick Cell Proliferation Assay (Abcam Cambridge, Reino Unido). O ensaio é baseado na clivagem do sal tetrazólio WST-1 em formazan pela desidrogenases

mitocondriais. A expansão do número de células viáveis resultou em um aumento na atividade das desidrogenases mitocondriais, o que leva ao aumento da quantidade de corante formazan formado. O corante formazan produzido por células viáveis pode ser quantificado por espectrofotômetro de vários poços (leitor de placas de microtitulação).

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR-2 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE OPG, RANKL, OC E RUNX2

A expressão gênica de OPG, RANKL, OC e Runx2 nas células do ligamento periodontal foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR) nas amostras coletadas aos 2, 7, 14 e 21 dias após cada um dos 5 tratamentos propostos (tripsina, agonista PAR-2, Peptideo. controle PAR-2 + tripsina, controle e antagonista + tripsina).

O RNA total (tRNA) foi obtido pela homogeneização das amostras em Trizol [isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol- Invitrogen Brasil LTDA (1mL/ 100µL de amostra)]. Após a homogeneização as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 rotações por minuto (RPM) por 15 min, 4°C (EppendorfCentrifuge 5417R – Eppendorf, Califórnia, EUA). Posteriormente, 0,8mL do sobrenadante foram transferidos para um novo 1.5mL microtubo (Eppendorf) no qual foram adicionados 0,2mL de clorofórmio. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão, os microtubos foram deixados em repouso por 2-3 min à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugados a 12000G (15 min a 4°C). A fase aquosa sobrenadante (≈ 600 µL) foi, então, separada em um novo microtubo.

O tRNA foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol 100% para cada volume de sobrenadante. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão os tubos foram incubados por 10 min a temperatura ambiente e, então, centrifugados a 12000 G (10 min a 4°C).

Para a lavagem do tRNA, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o RNA precipitado (pellet) foi lavado com etanol 100% (1 mL/mL de Trizol) e posteriormente centrifugado a 7600 G (5 min, 4°C). Após a centrifugação, o

sobrenadante foi descartado (vertido) e o pellet foi lavado com 1mL de etanol 75% [diluído em água tratada com dietil-pirocarborato (DEPC) 0,01% e inativada em autoclave]. Posteriormente, foi feita nova centrifugação a 7600 rotações (5 min, 4°C), sendo o sobrenadante novamente desprezado. Os tubos foram ainda deixados por 10 min a temperatura ambiente para total secagem do pellet, dando-se início à digestão das amostras com DNAse I.

Para a digestão do DNA, os pellets secos foram re-suspendidos em 43,5 µL de água DEPC inativa 0,01%. Posteriormente foram adicionados 6,5 µL do mix para digestão do DNA (5µL do Tampão 10X, 0,5µL de inibidor de RNAse e 1µL de DNAse I – Invitrogen Brasil LTDA) sendo o volume final de 50µL. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 1µL de solução de parada (EDTA 25 mM) e em seguida submetido a re-extração do tRNA.

Para a re-extração do tRNA foram adicionados 50µL de água DEPC inativa 0,01% às amostras previamente submetidas ao ensaio de digestão do DNA. Posteriormente, foram adicionados 200µL da mistura fenol saturado em tampão (Invitrogen Brasil LTDA) / clorofórmio 1:1 e, após agitação por inversão, foram incubados por 2- 3 min a temperatura ambiente; por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000 RPM (15 min a 4°C). A seguir, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e a esta foram adicionados 200µL de isopropanol 100% (para nova precipitação do RNA). Após agitação por 15 segundos e incubação por 10 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 RPM (10 min a 4°C), sendo o sobrenadante, então, descartado (vertido). Posteriormente foram adicionados 500µL de etanol 100% (para lavagem do pellet), as amostras centrifugadas a 7600 RPM, (5min, 4°C) e o sobrenadante foi novamente descartado (vertido). Foi adicionado então, 500µL de etanol 75% (para lavagem do pellet) precedendo nova centrifugação a 7600G, (5 min, 4°C), bem como nova remoção do sobrenadante, adicionando-se por fim 500 µL de etanol 75% e congelando-se as amostras a -20°C.

Para a quantificação do tRNA, as amostras contendo etanol 75% foram centrifugadas e o pellet de tRNA foi seco. Posteriormente, o pellet de tRNA foi ressuspendido em volume adequado (≈ 20-30 µL) de água DEPC inativa 0,01%. As absorbâncias foram então medidas a 260nm em espectrofotômetro (EppendorfBioPhotometer –

Eppendorf, Califórnia, EUA), sendo as concentrações de tRNA calculadas considerando a relação 1 AU = 40 µg/mL, conforme a fórmula:[RNA µg/ mL] = Abs X Fator de diluição X 40

Foram consideradas adequadas as razões 260RNA/280PROT entre 1,8 e 2,0.

A integridade do tRNA isolado foi verificada através da eletroforese em gel de agarose 1% diluído em tampão TRIS acetato EDTA, contendo 2 µL/100 mL de brometo de etídio (0,5µg/mL), Invitrogen Brasil LTDA, aplicando-se em cada poço ("lane"), 5µL de uma solução contendo: 0,5µL de amostra de RNA; 3,5µL de H_2ODEPC 0,01% e 1µL de tampão de amostra (contendo glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25% e 1mM de EDTA pH 8,0), fixando-se uma voltagem de 70Voltz por aproximadamente 1 hora (até correr 2/3 do gel).

Posteriormente, os géis foram revelados sob luz ultravioleta (UV) e as imagens foram capturadas com detector de imagem Chime-Imager 5500- Alpha Innotech Corporation. O tempo de exposição foi ajustado pela autoexposição do aparelho (exposição normal para saturação da imagem em torno de alguns milisegundos). Por fim, foram visualizadas as bandas 28 S e 18 S, indicadoras da integridade do RNA.

Cuidadosamente, 4µg de tRNA (amostra) foram avolumados para 10µL de H_2O DEPC inativa 0,01%. Esta solução foi então aquecida a 65°C por 5 min, seguida por choque térmico em gelo. A esta solução foram adicionados 10µL de um mix contendo 1µL de oligodT (0,5 µg/ µL – Invitrogen Brasil LTDA); 1µL da mistura de trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTPs), a saber – 10 mM de dATP, 10mM de dTTP, 10mM de dCTP e 10mM de dGTP – Invitrogen Brasil LTDA; 4µL de tampão de reação (5 x firststrand buffer), 2µL de DTT (0,1M), 1µL de RNAse OUT (40U/µL) e, por último, 1µL da enzima Superscript II (200 U/µL). A fim de assegurar a ausência de DNA na amostra foram utilizados controles negativo da reação RT, consistindo de "pool" de RNAs contendo todos os reagentes citados anteriormente com omissão da Superscript II.

A mistura foi posteriormente homogeneizada e incubada a 42°C durante 50 min em banho-maria, sendo posteriormente incubada a 70°C durante 15 min em banho-maria para inativação da enzima. As amostras foram, então, mantidas a -20°C até serem submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR).

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (real time PCR) foi realizada em um volume final de 12,5µL contendo 1µL de cDNA (transcrito anteriormente), 0,5 µL do oligonucleotídeosense (10-5 M), 0,µL do oligonuceotídeoantisense (10-5 M); 4,25µL de H_2ODEPC autoclavada e por fim 6,25µL de Platinum® SYBR® Green qPCRSuperMix-UDG (Invitrogen), o qual contém Platinum® Taq DNA polimerase, corante SYBR® green I, TRIS-HCl, KCl, 6 mMMgCl2, 400µMdGTP, 400 µMdATP, 400µMdCTP, 800µMdUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e agentes estabilizadores.

Os oligonucleotídeos para OPG, RANKL, OC e Runx2 foram extraídos do GenBank e foram desenhados com o auxílio do software Primer3. As seqüências geradas no programa Primer3 também foram analisadas no Blast quanto à especificidade e tamanho do fragmento. Os números de acesso ao GeneBank das seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cDNA foram os seguintes: osteoprotegerina, Hs00171068-m1; RANKL, Hs00243519-m1; osteocalcina, Hs00609452_g1; RUNX2, NM-004348, e β-actina, a qual foi utilizada como gene constitutivo, Hs99999903-m1.

As reações de real-time PCR foram realizadas em triplicada em placas de 96-poços utilizando-se um termociclador nas seguintes condições: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 2 minutos. Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o equipamento ABI PRISM 7000 (AppliedBiosystems). Foi determinado para cada amostra, o primeiro ponto abaixo do corte fixo do produto de PCR (termedcyclethreshold, Ct). As alterações na expressão do gene alvo foram calculadas usando 2–ΔΔCt, onde ΔΔC t da amostra experimental (Ctgene alvo/Ctβ-actina) é dividido pelo da amostra controle (Ctgene alvo/Ctβ-actina). Os experimentos de real time PCR foram repetidos três vezes.

4.8 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEÍCA IL-10, IL-6, OPG, CCL2, MCSF E RANKLE DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE ALP

Nas amostras dos meios de cultura, os níveis de IL-1, IL-6, OPG, CCL2, MCSF e RANKL foram avaliados por meio do uso de kits ELISA comercialmente disponíveis (MyBioSource.com). As reações foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos em picogramas/ml.A atividade de ALP foi aferida aos 2, 7 e 14 dias de experimento com o usode kits comercialmente disponíveis pela Abcam (Cambridge, UK, ab83369). As amostras separadas de 3 pacientes diferentes foram lavados duas vezes com PBS e uma solução de p-nitrofenil fosfato foi adicionada (400 mL/poço). Após 10 min de incubação a 37ºC, a conversão de pnitrofenilfosfato em p-nitrofenol pela ALP celular foi interrompida com uso de uma solução de 3N NaOH e então, a absorbância foi medida a 450 nm em espectrofotômetro (Epoch, Bioteck Instruments, Winooski, Vermont, USA). A atividade específica de ALP foi expressa em absorbância de p-nitrofenol (OD; 405nm)/absorbância de WST-1 (OD; 450 nm), considerado como atividade de ALP/ células viáveis.

4.9 AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO IN VITRO ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA E ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM SOBRENADANTE

A mineralização in vitro das células mesenquimais do ligamento periodontal foi analisada aos 7, 14 e 21 dias de experimento por marcação com vermelho de alizarina. Para a coloração com vermelho de alizarina, as células foram fixadas com etanol a 70% por 60 min a -20ºC. Então, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e coradas com solução de vermelho de alizarina 40mM (Sigma) por 10 min a temperatura ambiente. O valor de pH para a solução foi ajustado a 4.2 com 25% de hidróxido de amônia anteriormente à coloração. Após a coloração, o excesso de corante foi lavado com água destilada e as imagens digitais dos depósitos minerais foram obtidas através de fotografias digitais e aumento com microscópio com maguinificação em 100x.

A análise da concentração de cálcio em sobrenadante foi aferida aos 2, 7 e 14 dias de experimento. Ao fim de cada tempo experimental, o sobrenadante coletado foi transferido para tubos do tipo eppendorf e armazenado a -80ºC. A concentração de cálcio no sobrenadante foi estimada pelo Kit de Detecção de Cálcio adquirido da empresa Abcam (Cambridge, UK, ab102505) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras foram lidas em triplicada ao comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Epoch, Bioteck Instruments, Winooski, Vermont, USA).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPadPrism 5.01. (GraphPad Software, San Diego California). Os dados foram expressos em média e desvio padrão da média para todos os experimentos quantitativos. Os dados obtidos foram representativos de três experimentos independentes realizados com células derivadas de três doadores diferentes. Todas as análises foram realizadas com um nível de significância de $p<0.05$. ANOVA com teste pós-hoc de Dunnett foi utilizada para as múltiplas comparações.

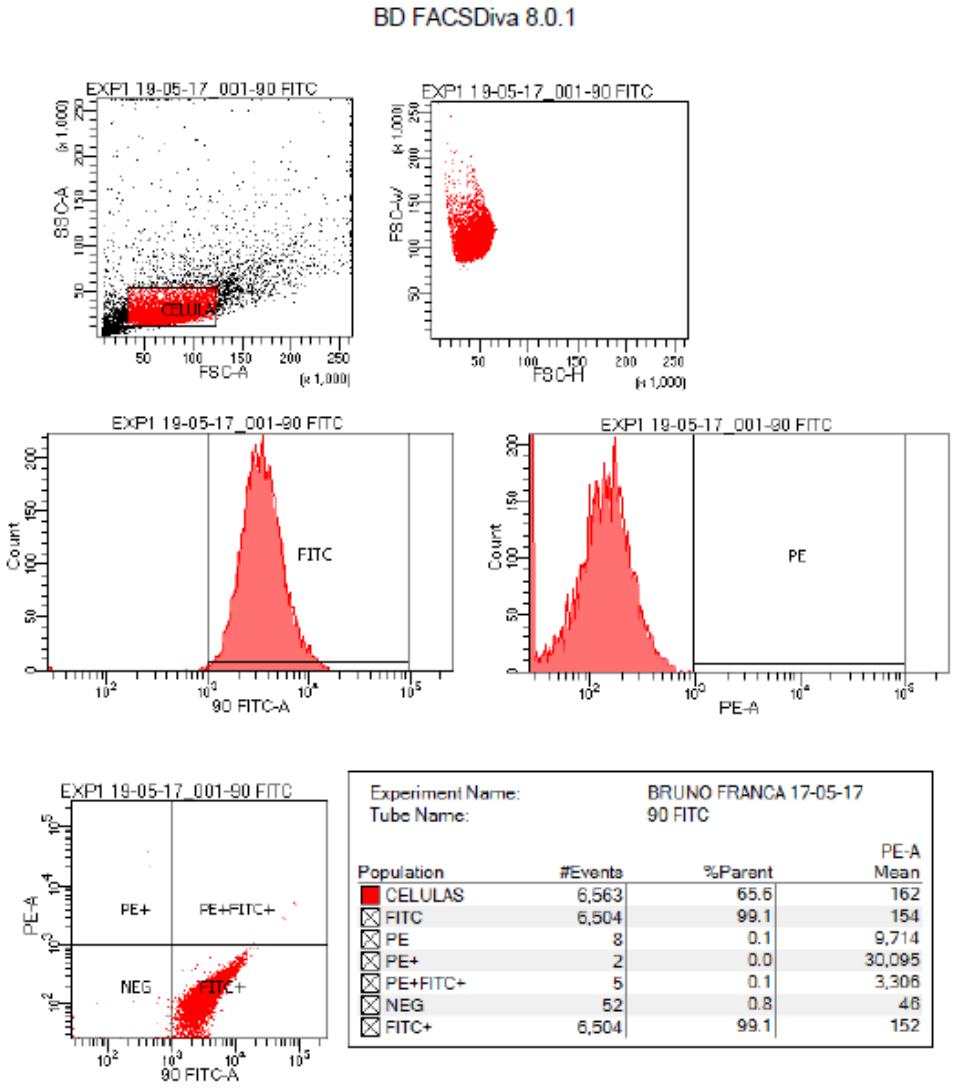
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

Como é possível verificar na (Figura 5.1), 99.1% de células marcaram positivamente para CD 90, marcador importante de células mesenquimais. Além disso, é possível observar na (Figura 5.2) que 98.9% de células marcaram positivamente para CD 146 e na (Figura 5.3), 99.4% de células positivas para CD 44 que também são importantes marcadores para clulas mesenquimais. Pode ser observado na (Figura 5.4) que 3.2% de células marcaram positivas para CD 31 e 0.4% de células positivas para CD 34 que são marcadores de células hematopoiéticas. A (Figura 5.5) mostra que 2.9% marcaram positivo para Stro-1, marcar de células tronco. Esses resultados são condizentes com os mostrados por Choi et al em 2015 onde as células mesenquimais do ligamento periodontal apresentaram uma forte expressão de CD44, CD73, CD90, CD146 e CD166 nas passagens iniciais.

Esses resultados são referentes a um pool feito com cultura de três pacientes.

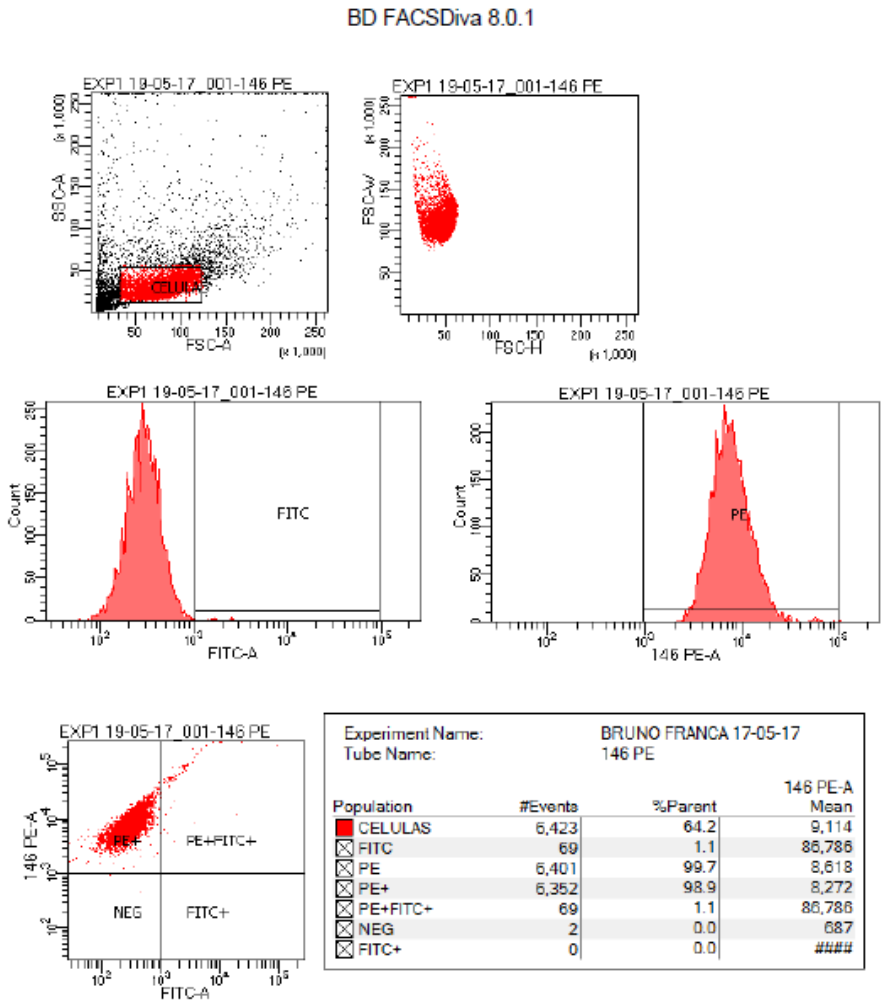
Figura 5.1 - 99.1% de células positivas para CD 90



Fonte: O autor

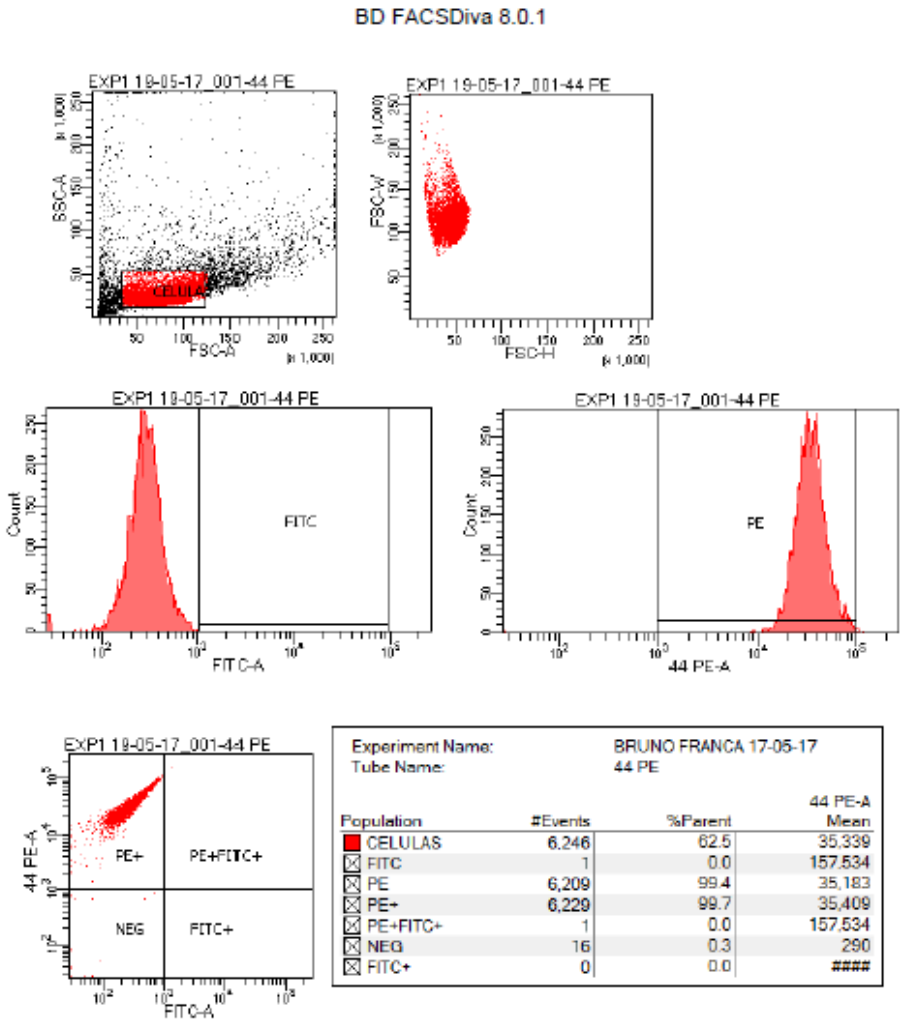
Incluir descrição de todos os plots

Figura 5.2 - 98.9% de células positivas para CD 146



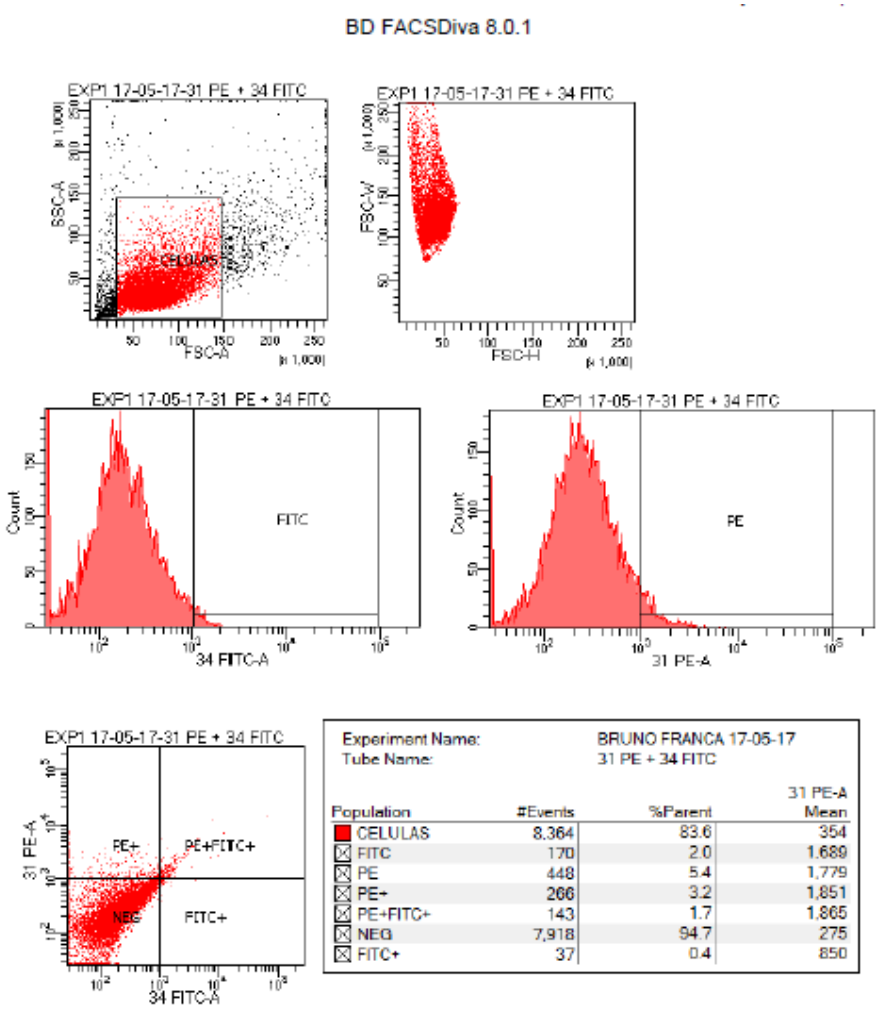
Fonte: O autor

Figura 5.3 - 99.4% de células positivas para CD 44



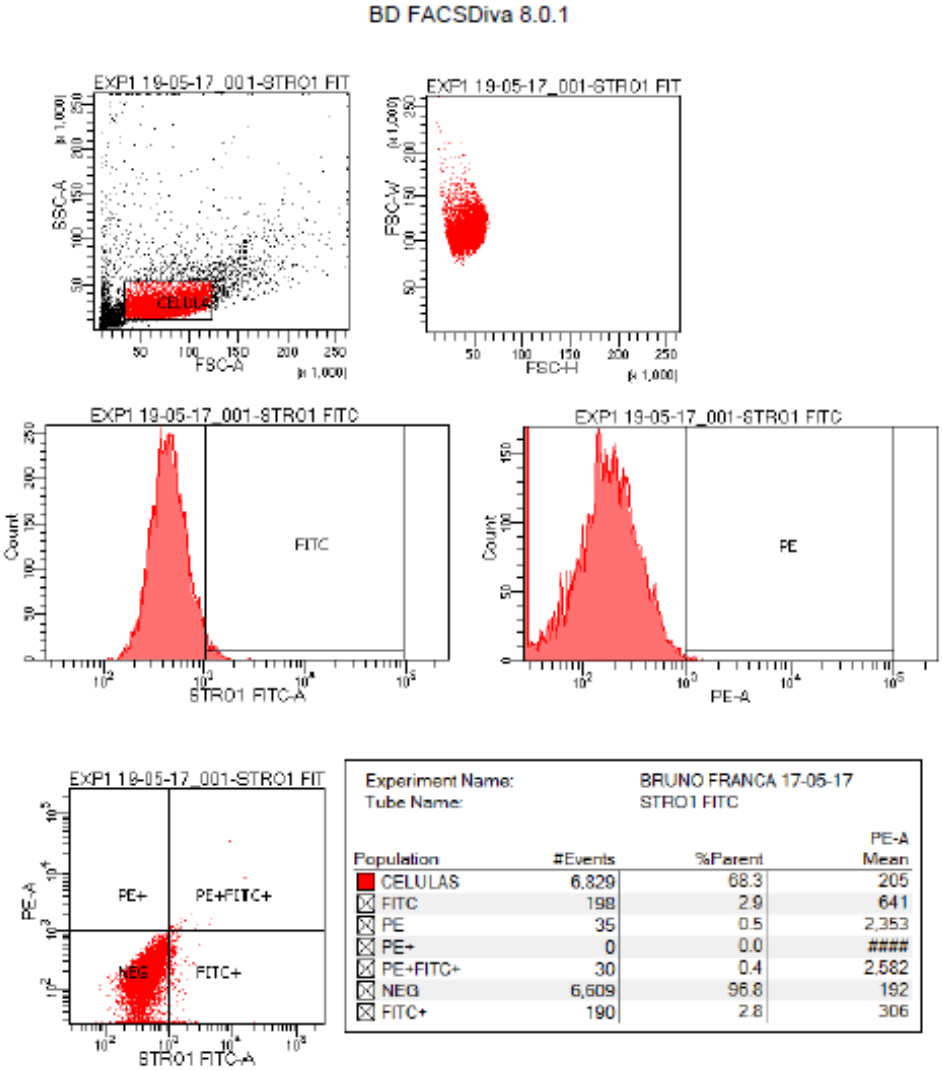
Fonte: O autor

Figura 5.4 - 3.2% de células positivas para CD 31 e 0.4% de células positivas para CD 34



Fonte: O autor

Figura 5.5 - 2.9% de células positivas para Stro-1

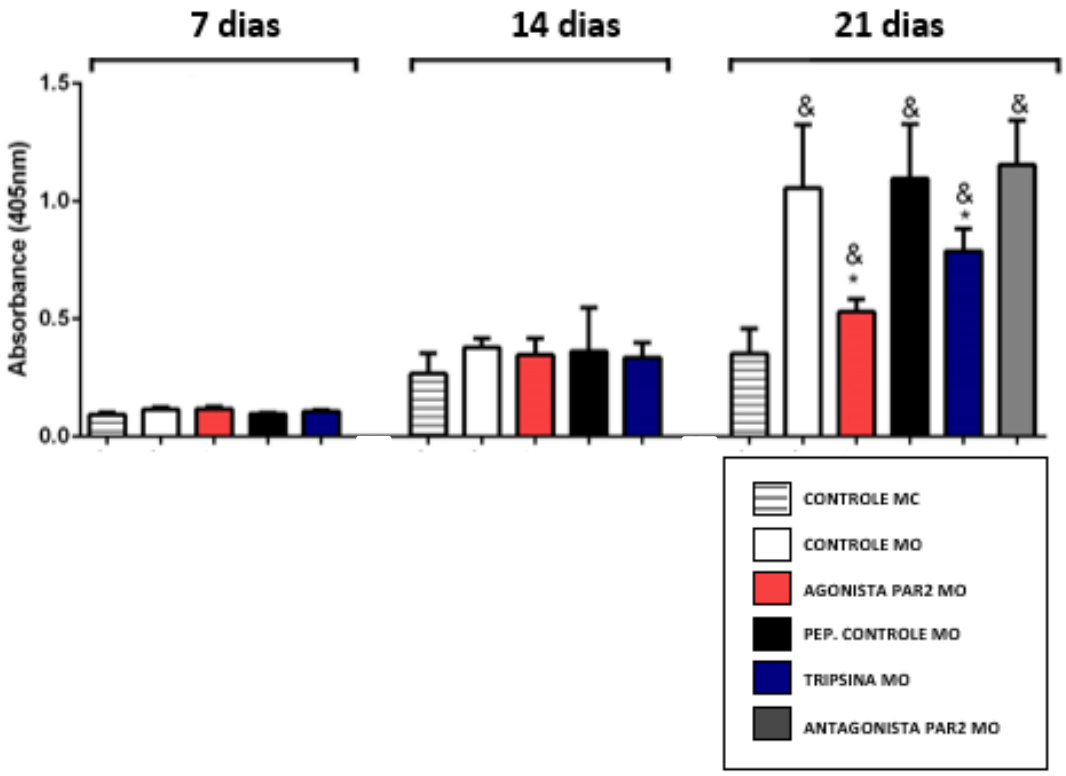


Fonte: O autor

5.2 MINERALIZAÇÃO

No ensaio de mineralização através do vermelho de alizarina, não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos testados aos 7 e 14 dias. Porém aos 21 dias foi possível observar uma diminuição da mineralização nos grupos peptídeo agonista e Tripsina no meio diferenciação em relação ao Controle do meio diferenciação, Gráfico 5.1. Esse resultado ainda pode ser ilustrado através da figura 5.6.

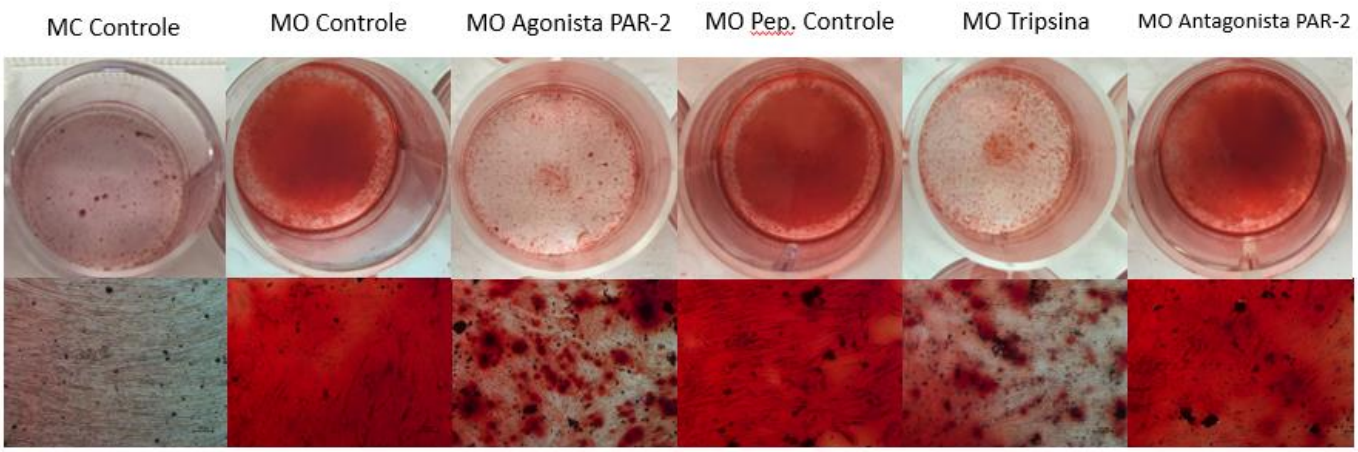
Gráfico 5.1 - Resultado Ensaio mineralização – 7, 14 e 21 dias



* - Diferença em relação ao grupo MO Controle - p<0,05.
& - Diferença em relação ao grupo MC Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

Figura 5.6 - Ensaio mineralização – 21 dias - Magnificação x100



Fonte: O autor

5.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Já em relação aos experimentos de proliferação celular foram encontrados resultados interessantes como podem ser observados nos gráficos a seguir.

No gráfico 5.2 é possível observar que o Agonista específico do PAR-2 (SLIGRL-NH2) levou a uma diminuição ($p<0.05$) na proliferação celular no meio controle, com 48 horas de experimento.

Ainda no meio controle, porém com 96 horas, é possível observar que o Agonista do PAR-2 (SLIGRL-NH2) levou a uma diminuição ($p<0.05$) da proliferação enquanto a tripsina mostrou um estimulo significante a proliferação ($p<0.05$), em relação ao grupo controle.

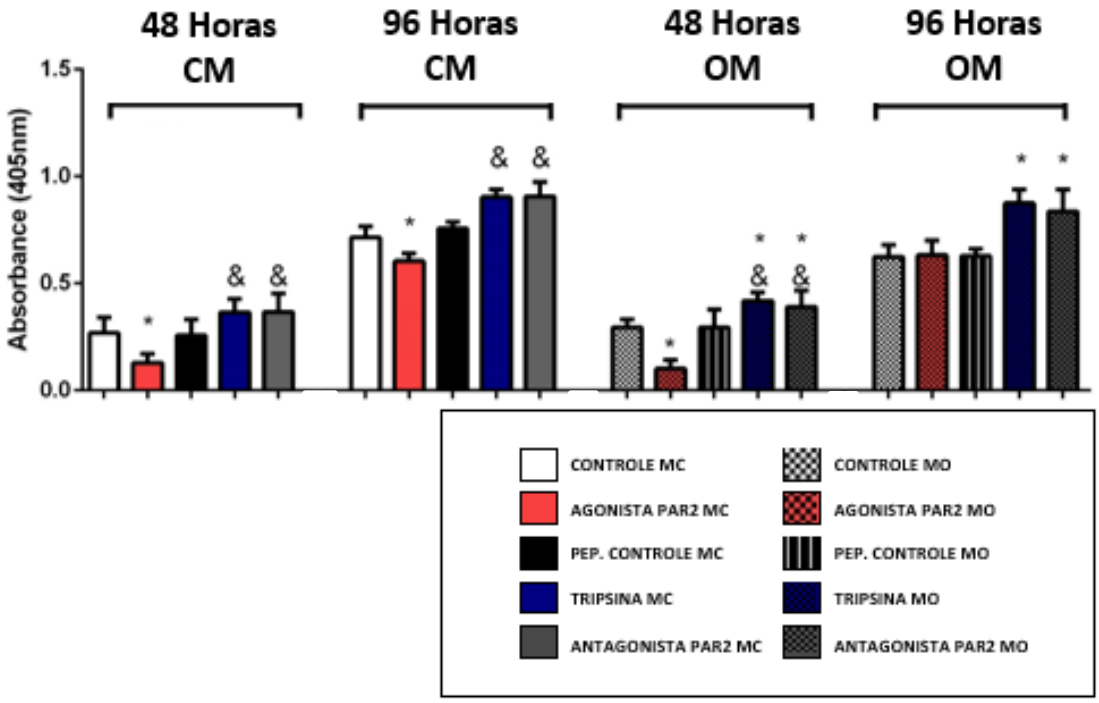
O Agonista do PAR-2 (SLIGRL-NH2) levou a diminuição da proliferação celular em relação ao grupo controle, enquanto a tripsina levou a um aumento ($p<0.05$), no meio osteogênico em 48 horas.

No meio de osteogênico em 96 horas, como pode ser observado no Gráfico 2, vemos que a tripsina levou a um aumento ($p<0.05$) da proliferação celular em relação

ao grupo controle. Podemos observar também que o Grupo ativado com Agonista do PAR-2 (SLIGRL-NH2) não apresentou diferença em relação ao controle (p>0.05).

Os grupos ativados com Peptídeo controle (LRGILS-NH2) e pelo Antagonista, não apresentaram diferença em relação ao controle em nenhum grupo.

Grafico 5.2 - Resultado ensaio de proliferação – 48 e 96 horas - Meio controle(MC) e Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.
& - Diferença em Relação ao grupo Agonista PAR-2 - p<0,05.

Fonte: O autor

5.4 EXPRESSÃO GÊNICA - qPCR

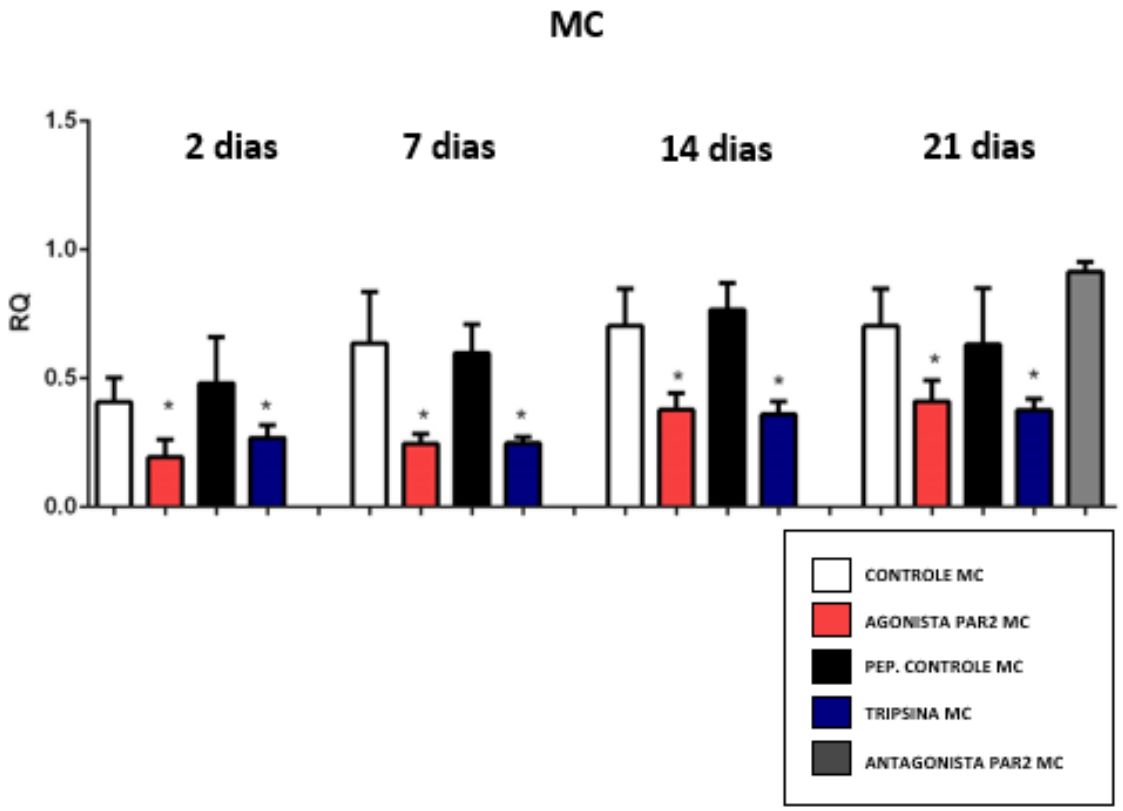
Em relação a expressão gênica foi possível observar que os grupos Tripsina e peptídeo agonista do PAR-2 levaram a uma diminuição ($p<0.05$) da expressão gênica da OPG aos 2, 7, 14 e 21 dias, como pode ser observado nso gráficos 5.3 e 5.4.

Interessantemente o Agonista específico do PAR-2 levou a um aumento estatisticamente significante ($p<0.05$) da expressão gênica do RANKL aos 2, 7, 14 e 21 dias como pode ser observado nos gráficos 5.5 e 5.6. Esse aumento ($p<0.05$) de expressão gênica do RANKL também ocorreu no grupo atratado com Tripsina aos 7,14 e 21 dias.

Ocorreu também a diminuição ($p<0.05$) da expressão de RUNX2 nos grupos peptídeo agonista do PAR-2 e Tripsina como pode ser observado nos gráficos 5.7 e 5.8.

Ainda, não houve diferença estatisticamente significante na expressão gênica de OC entre os grupos analisados em nenhum tempo experimental, gráficos 5.9 e 5.10.

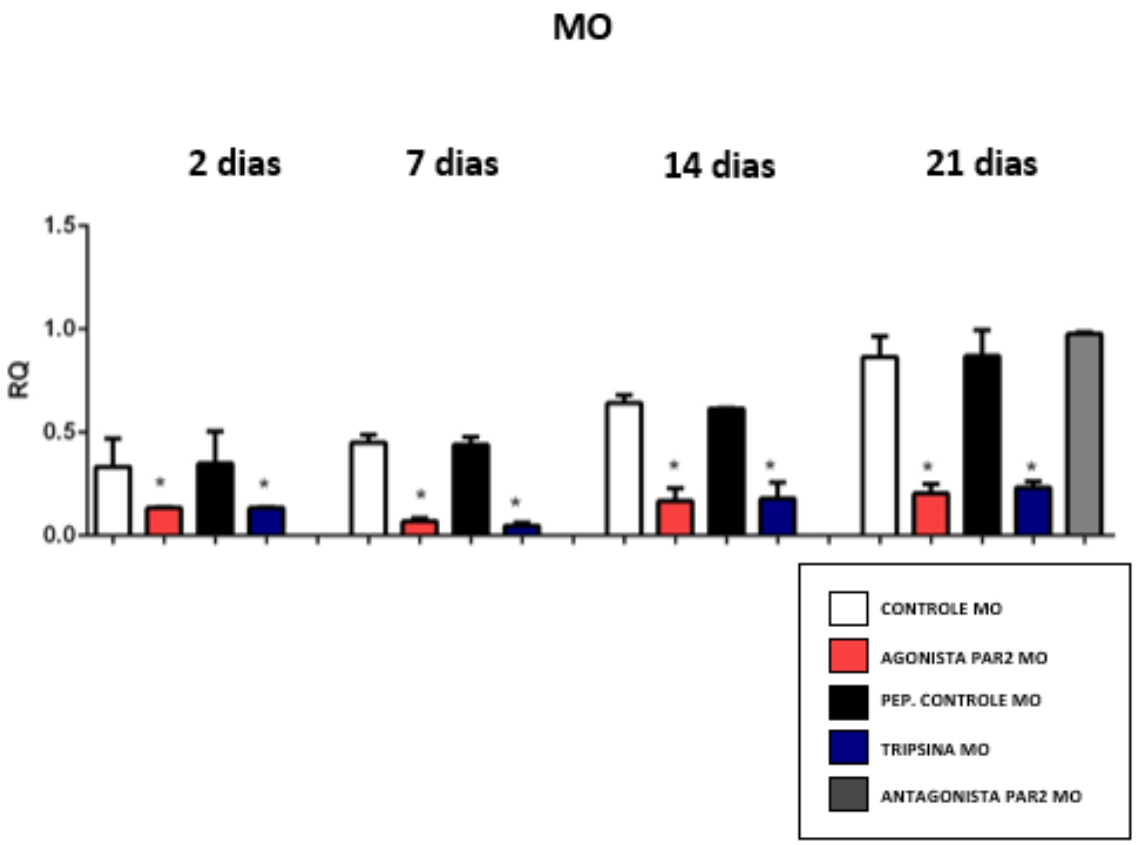
Grafico 5.3 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

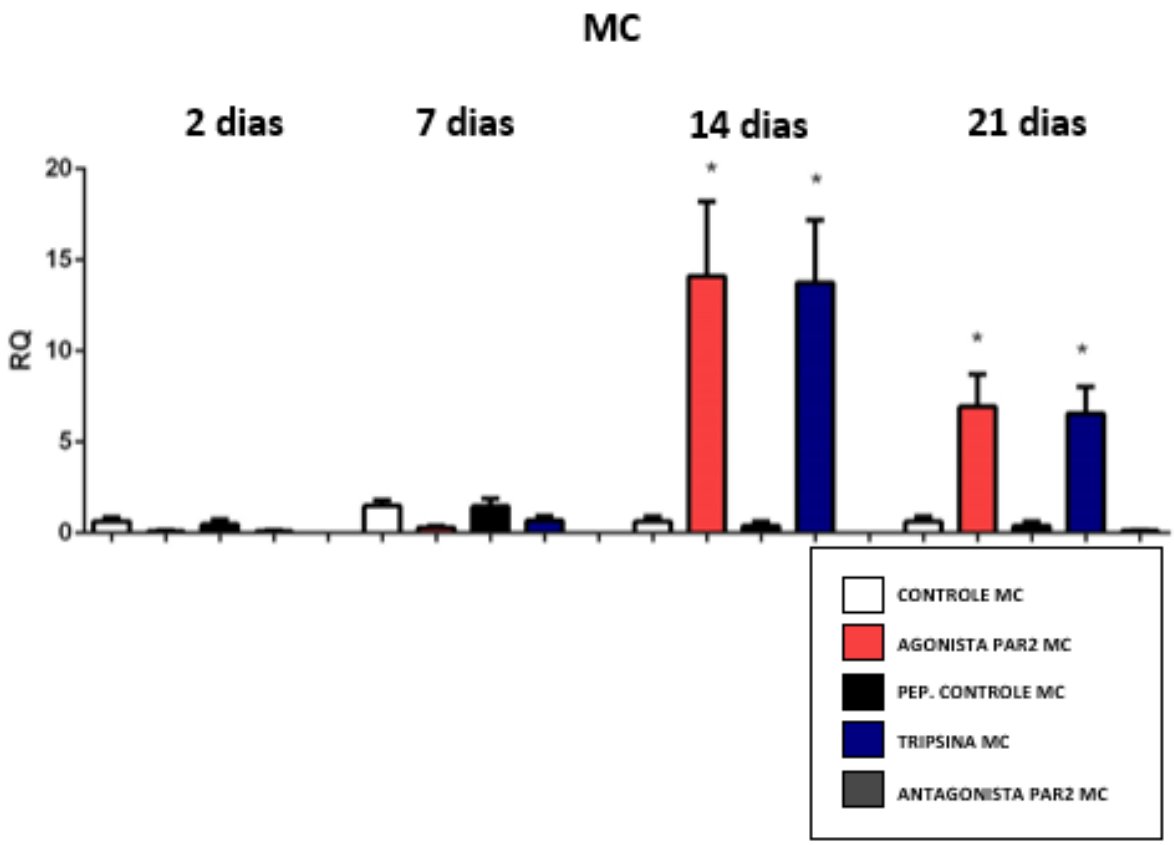
Grafico 5.4 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

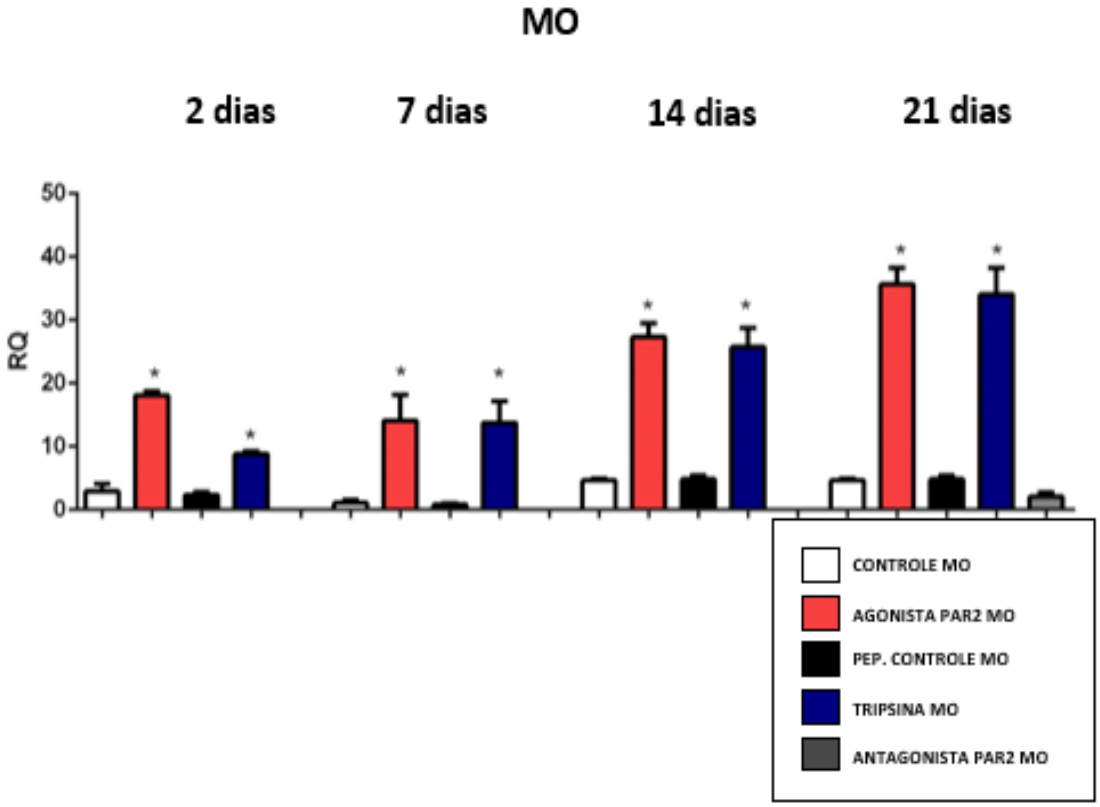
Gráfico 5.5 - Resultado qPCR- Expressão gênica de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Contole (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

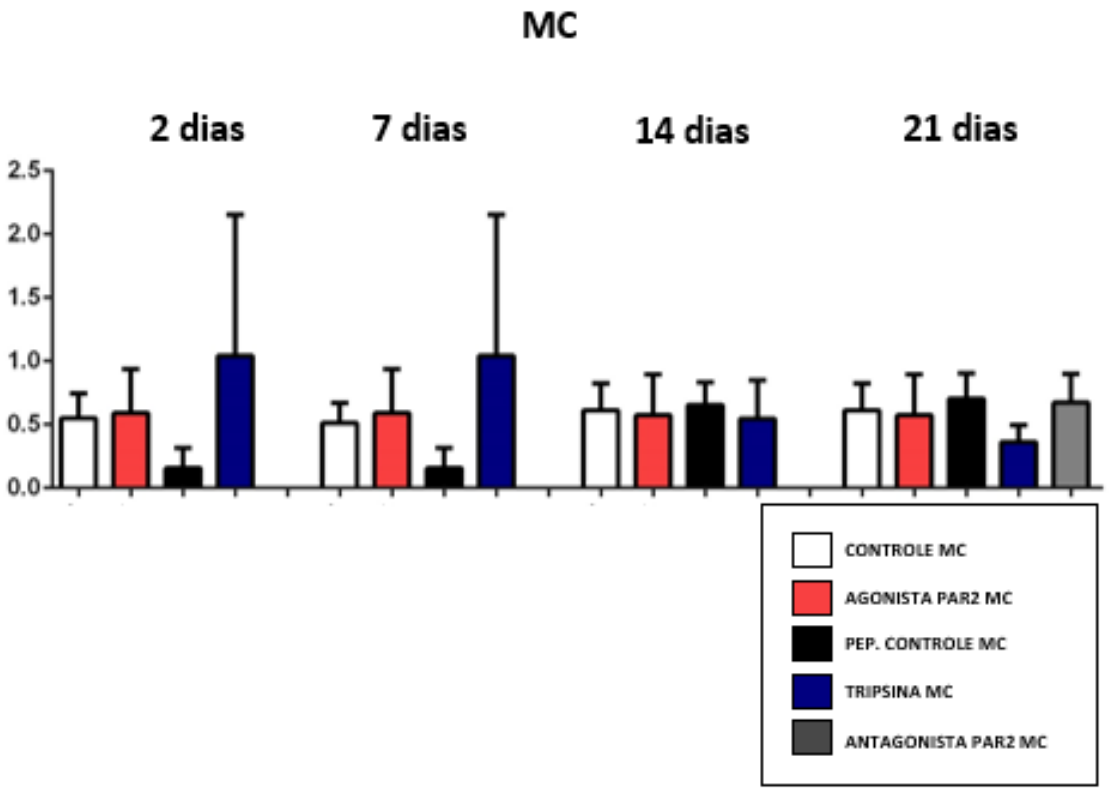
Gráfico 5.6 - Resultado qPCR- Expressão gênica de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

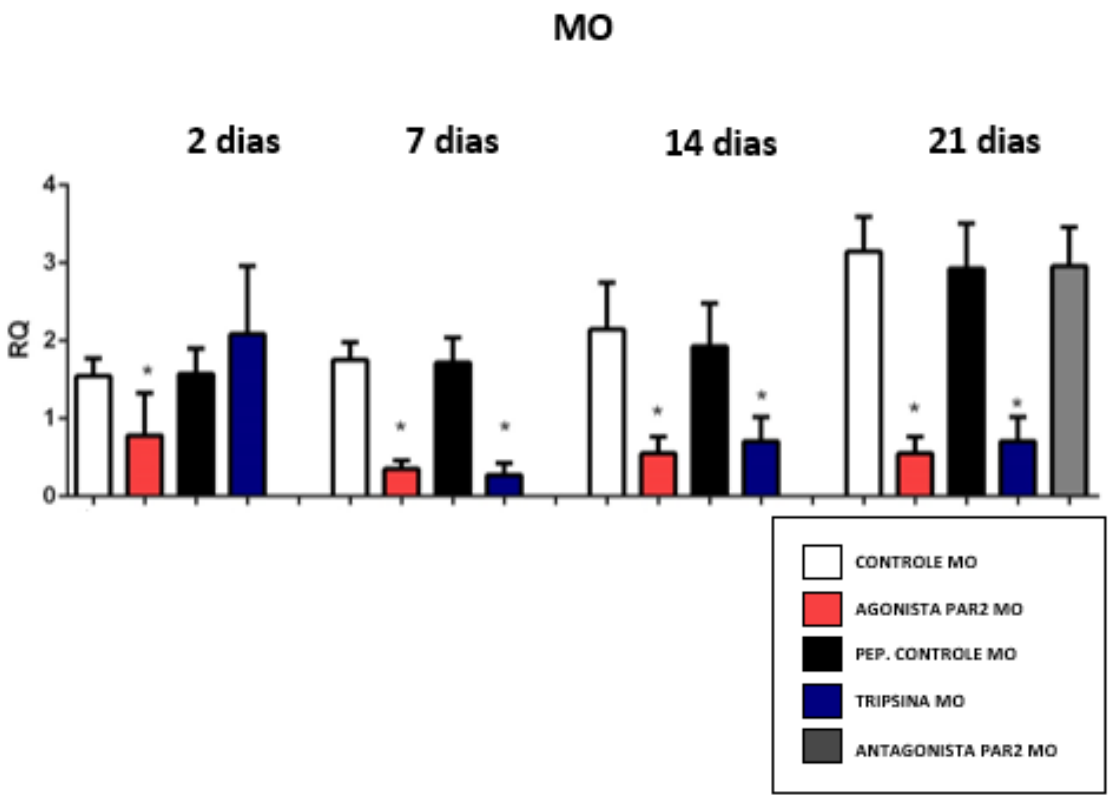
Gráfico 5.7 - Resultado qPCR- Expressão gênica de Runx2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

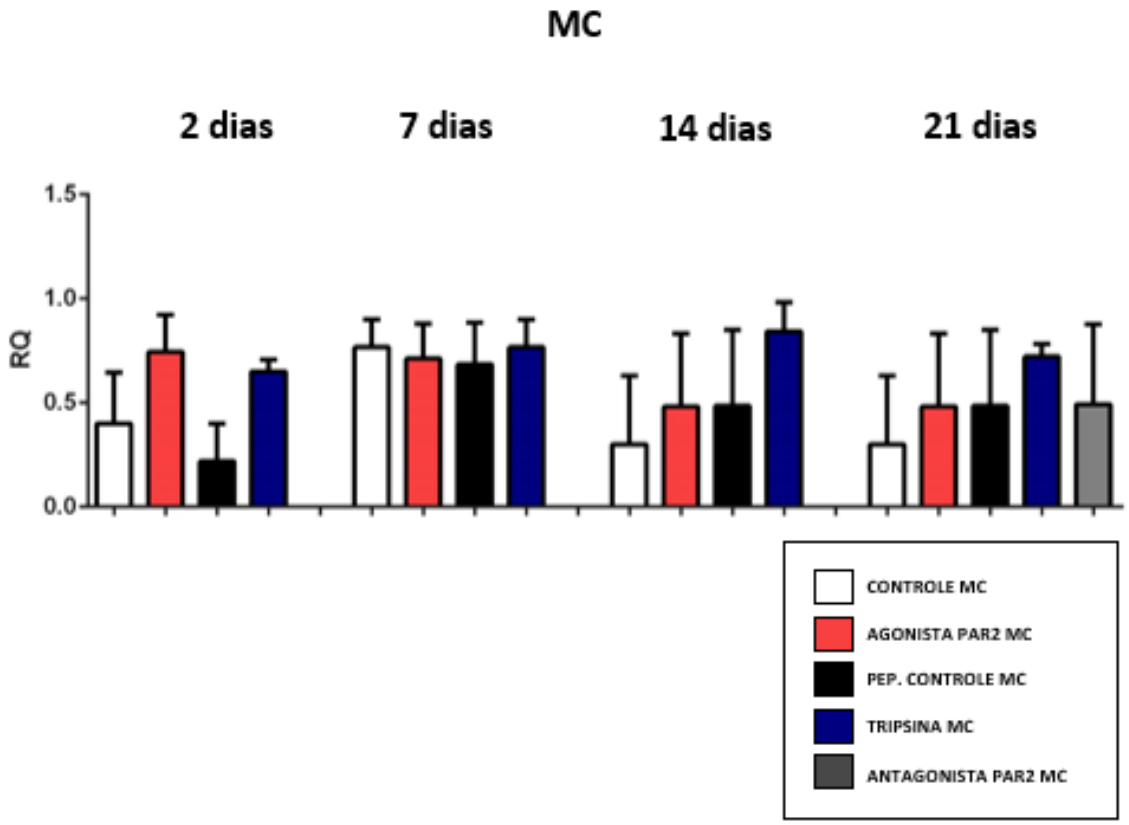
Gráfico 5.8 - Resultado qPCR- Expressão gênica de Runx2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

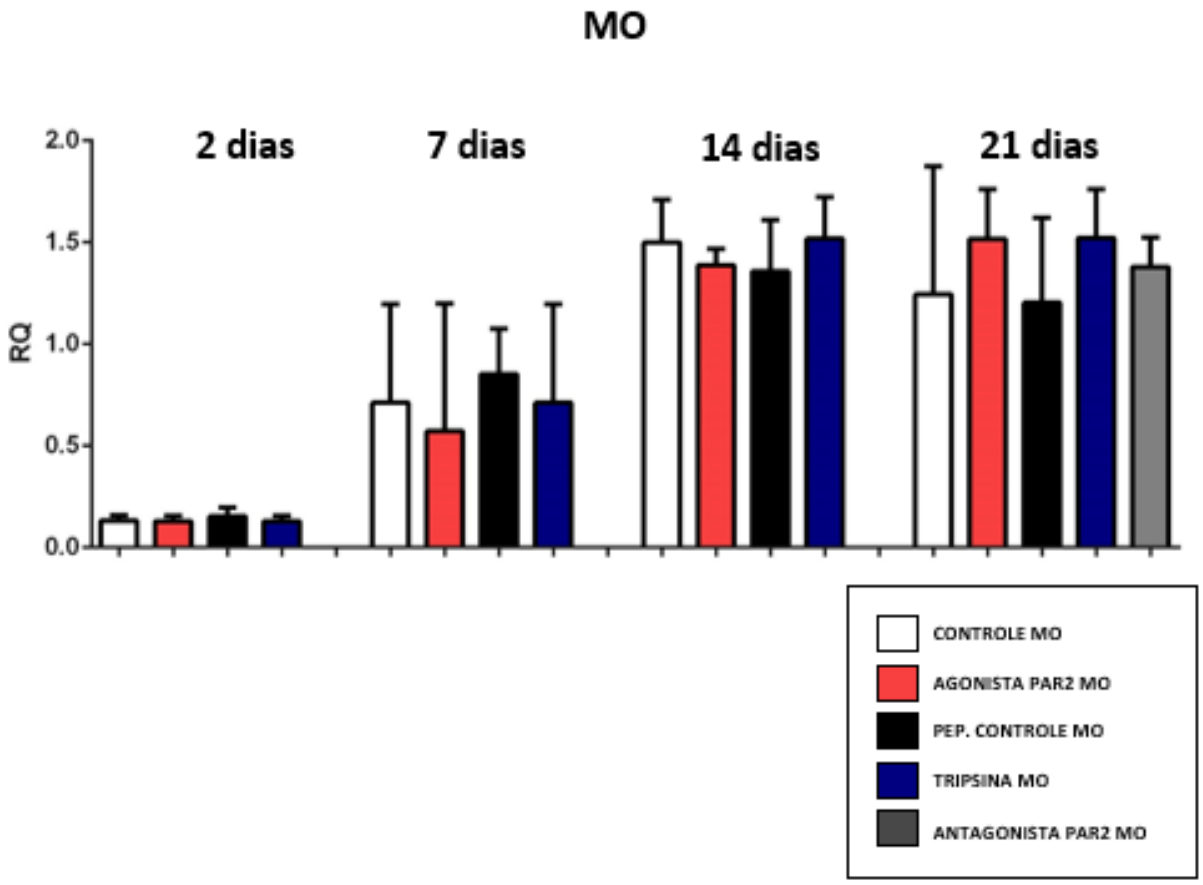
Gráfico 5.9 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

Gráfico 5.10 - Resultado qPCR- Expressão gênica de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

5.5 DETECÇÃO DOS NÍVEIS PROTEÍCOS DE RANKL, OPG, MCSF, IL-6, IL-10 e CCL2 POR ELISA

Foi possível observar a diminuição ($p<0.05$) nos níveis de OPG aos 2,7, 14 e 21 dias nos grupos Tripsina e peptídeo Agonista do PAR-2, gráficos 12. Houve ainda diminuição ($p<0.05$) nos níveis de OPG aos 7, 14 e 21 dias, em Meio osteogênico (MO) nos grupos Tripsina e peptídeo Agonista do PAR-2, gráfico 5.12. No gráfico 5.11 é possível ver os níveis de OPG em Meio Controle (MC).

Ainda, o aumento dos níveis de RANKL nos grupos Tripsina e peptídeo agonista do PAR-2 também foram mostrados através do ELISA aos 2, 7, 14 e 21 dias, em Meio Osteogênico (MO), gráfico 5.14. ($p<0.05$). No gráfico 5.13 é possível ver os níveis de RANKL em Meio Controle (MC).

Ocorreu também a diminuição ($p<0.05$) dos níveis de RUNX2 nos grupos peptídeo agonista do PAR-2 e Tripsina como pode ser observado no gráfico 5. 16 em Meio Osteogênico (MO). No gráfico 5.15 é possível ver os níveis de OPG em Meio Controle (MC).

Os níveis de OC não apresentaram resultado estatisticamente significante, gráficos 5.17 e 5.18.

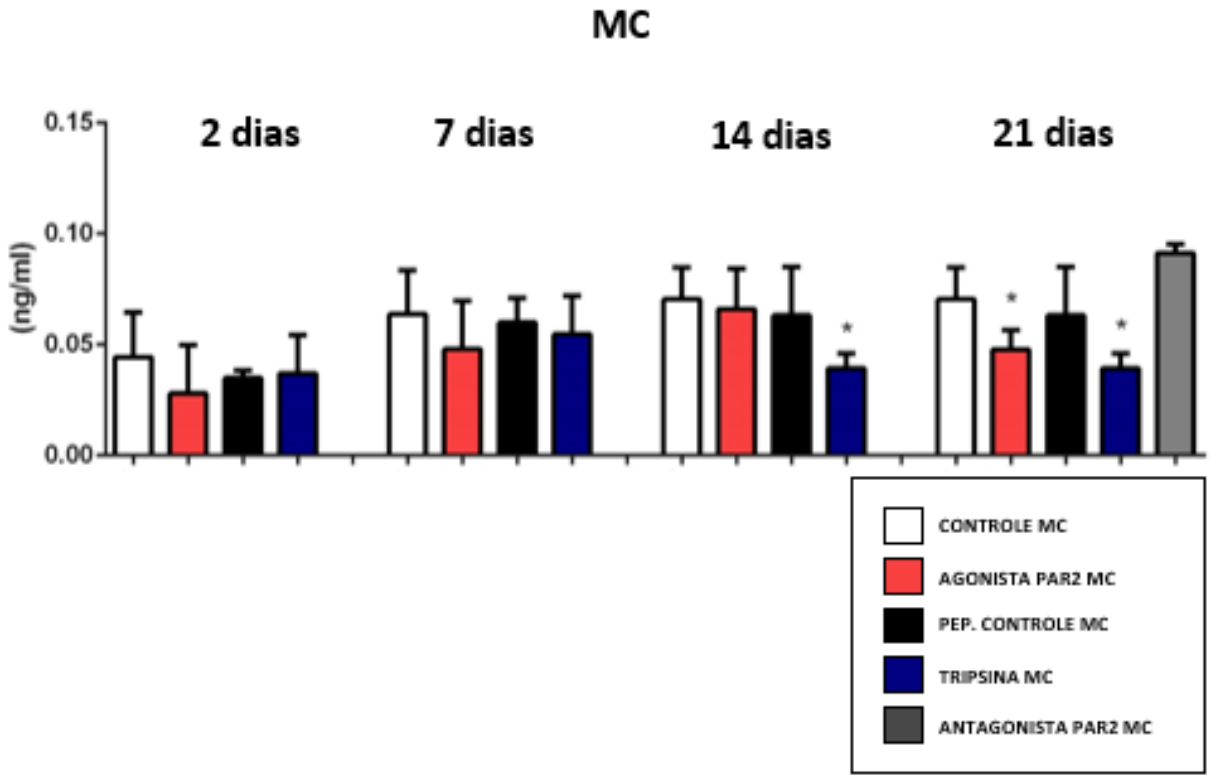
Em relação aos níveis de IL-6 houve uma diminuição ($p<0.05$) nos grupos Tripsina e peptídeo agonista do PAR-2 aos 2 e 7 dias. Contudo, ambos os grupos levaram a um aumento ($p<0.05$) da expressão de IL-6 aos 21 dias, gráfico 5.20, em Meio Osteogênico (MO). No gráfico 5.19 é possível ver os níveis de IL-¨6 em Meio Controle (MC).

Já os níveis de IL-10 apresentaram uma diminuição ($p<0.05$) nos grupos Tripsina e peptídeo agonista do PAR-2 aos 2,7,14 e 21 dias, gráfico 5.22, em Meio osteogênico (MO). No gráfico 5.21 é possível ver os níveis de IL-¨10 em Meio Controle (MC).

Os níveis de CCL2 também se apresentaram aumentados ($p<0.05$) nos grupos Agonista específico do PAR-2 e Tripsina aos 2, 7, 14 e 21 dias, gráfico 5.24 em Meio osteogênico (MO). No gráfico 5.23 é possível ver os níveis de CCL2 em Meio Controle (MC).

Quanto aos níveis de MCSF ocorreu uma diminuição ($p<0.05$) nos grupos tratados com Tripsina e Agonista do PAR-2 aos 2,7,14 e 21 dias, como pode ser observado no gráfico 5.26, em Meio osteogênico (MO). No gráfico 5.25 é possível ver os níveis de MCSF em Meio Controle (MC).

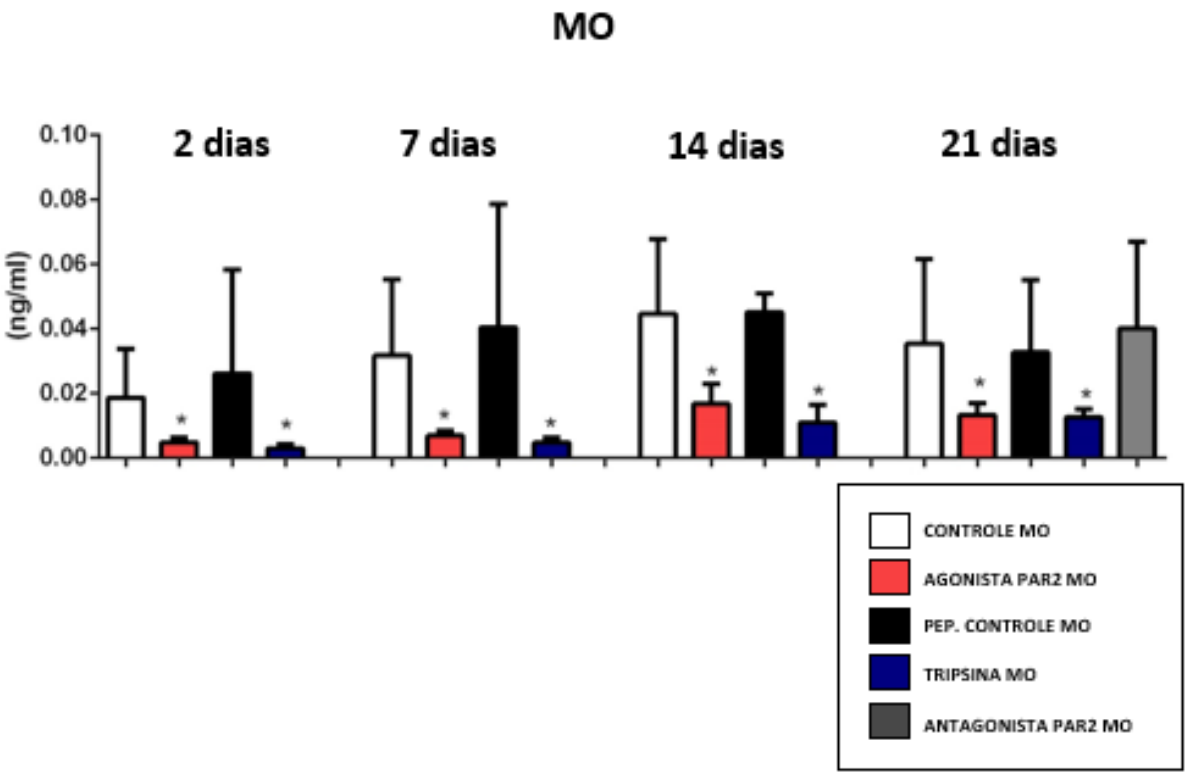
Gráfico 5.11 - Resultado ELISA- Níveis de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

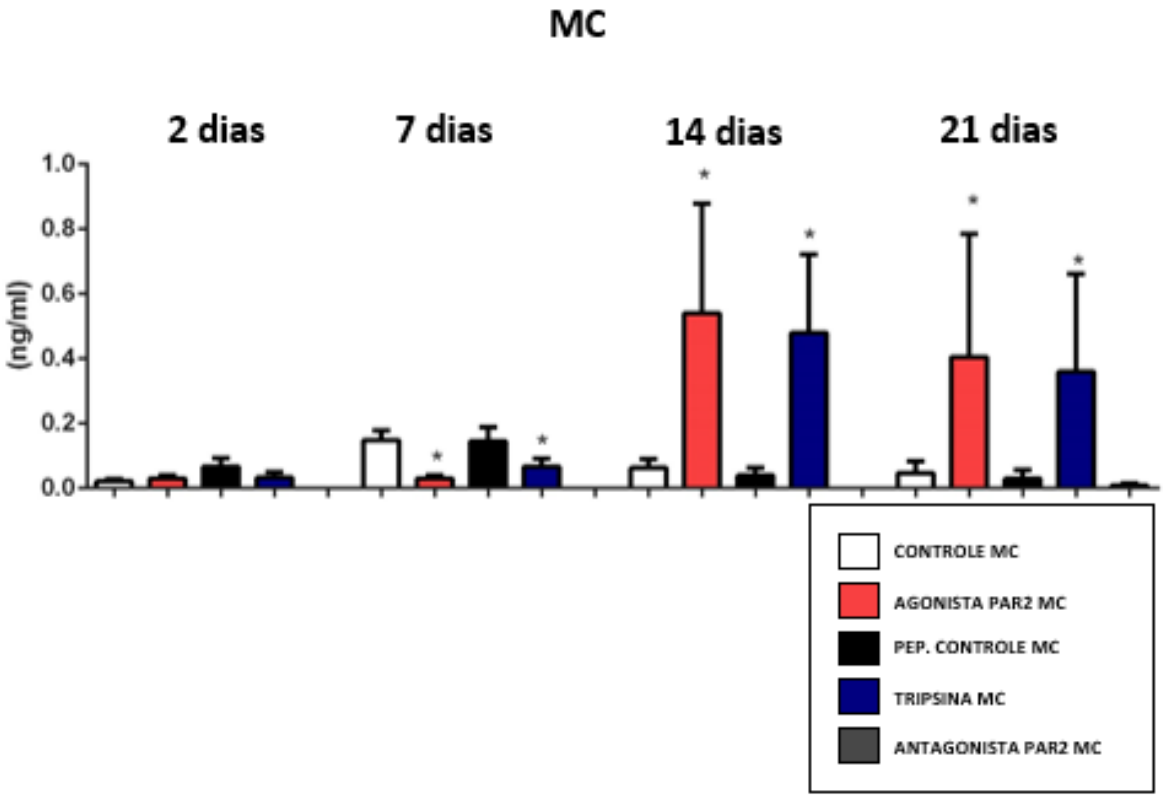
Gráfico 5.12 - Resultado ELISA- Níveis de OPG – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

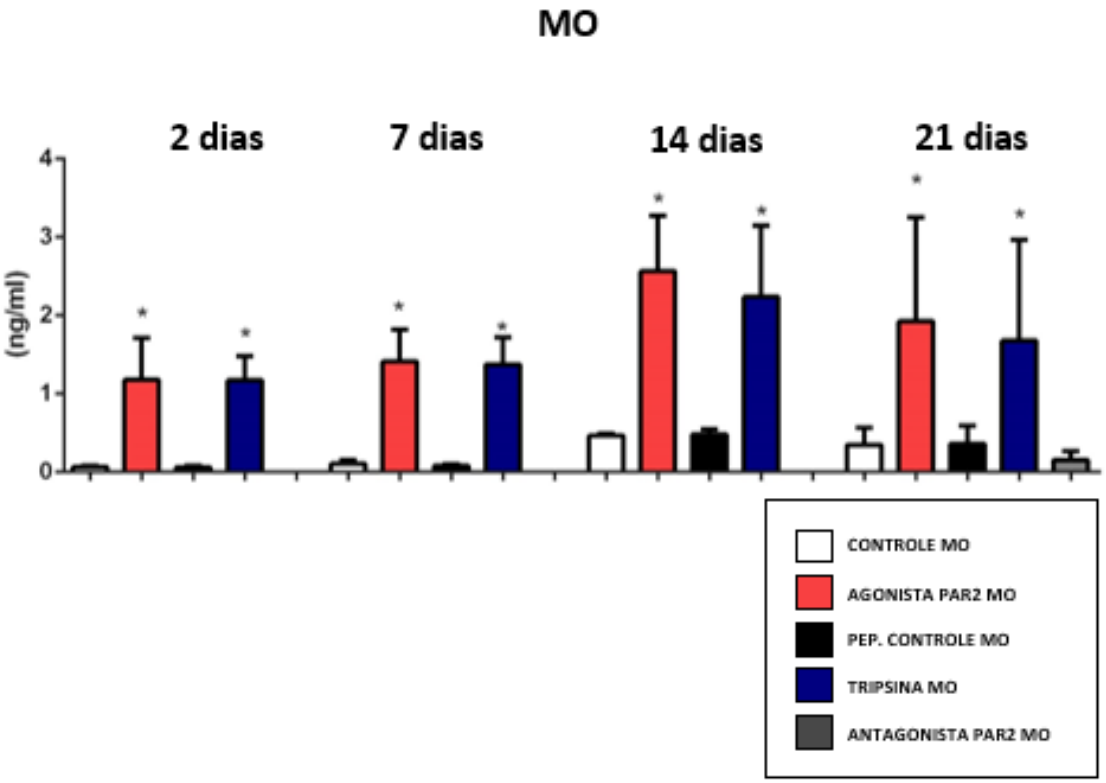
Gráfico 5.13 - Resultado ELISA- Níveis de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

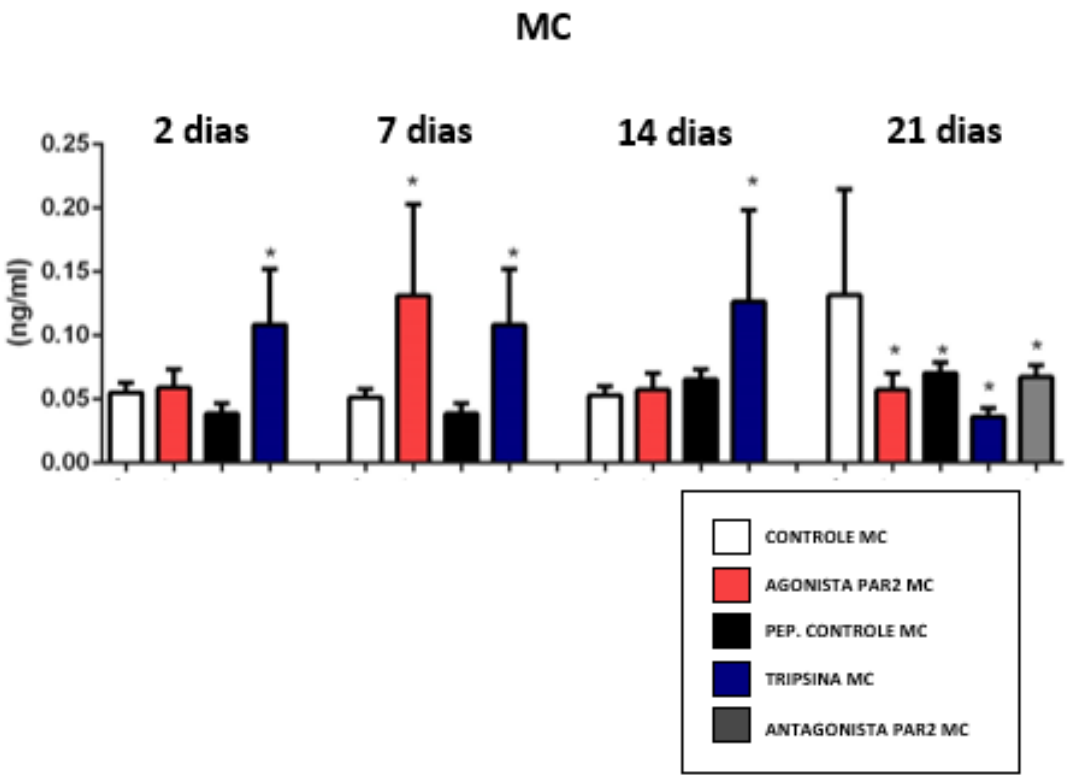
Gráfico 5.14 - Resultado ELISA- Níveis de RANKL – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

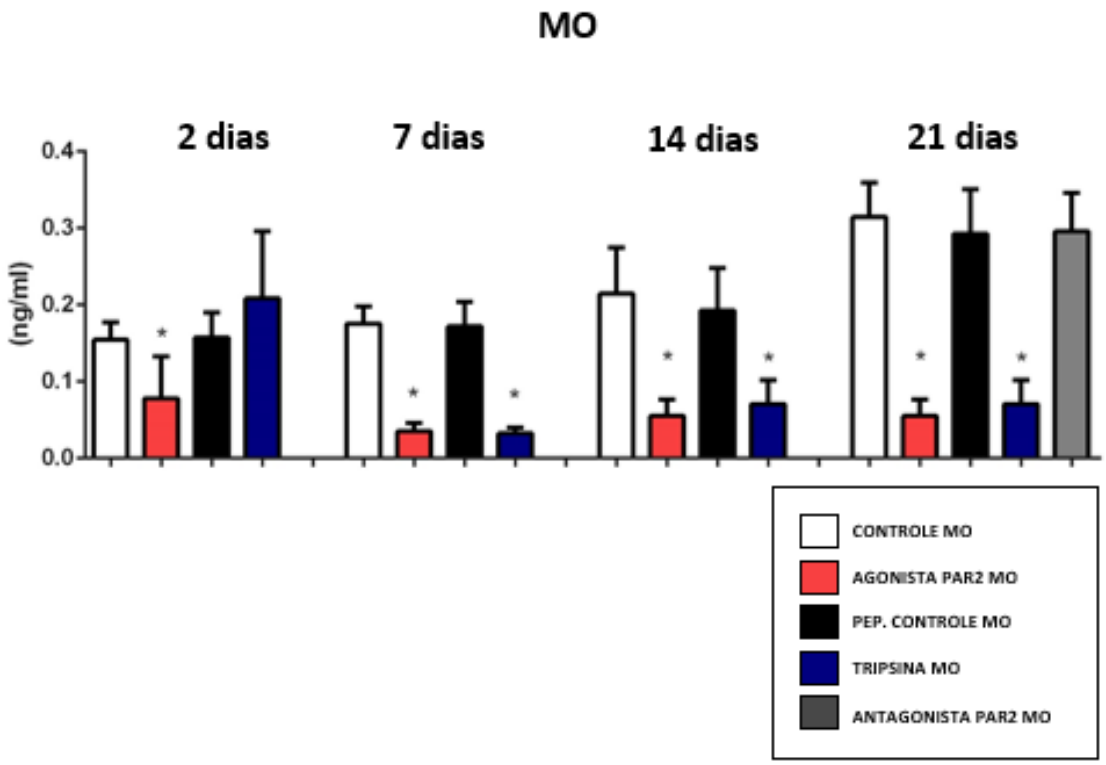
Gráfico 5.15 - Resultado ELISA- Níveis de Runx2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

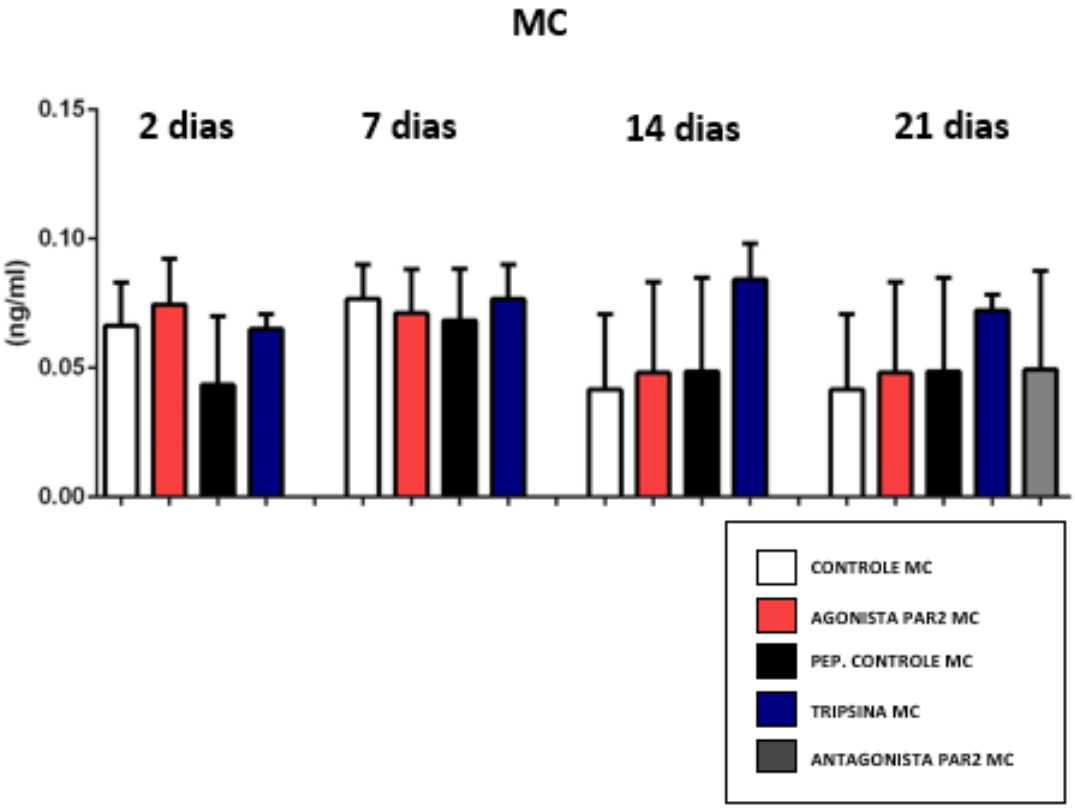
Gráfico 5.16 - Resultado ELISA- Níveis de RUNX2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

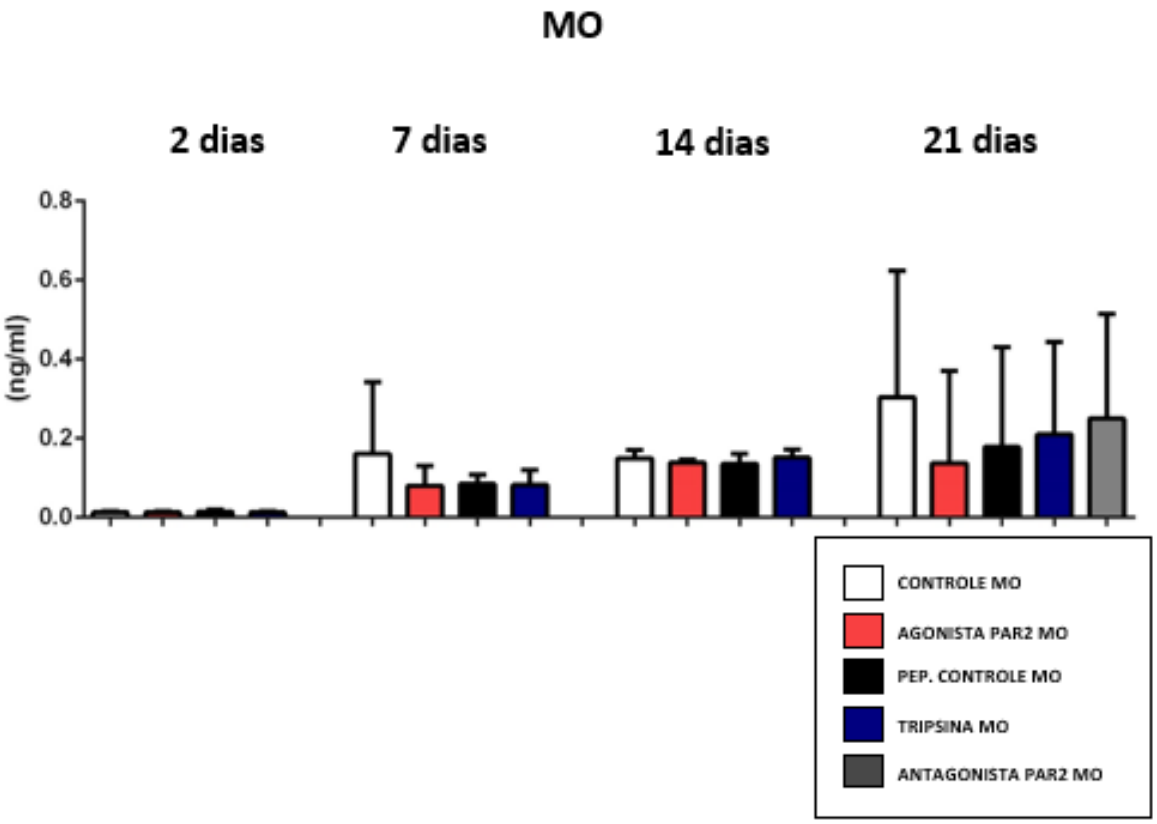
Gráfico 5.17 - Resultado ELISA- Níveis de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

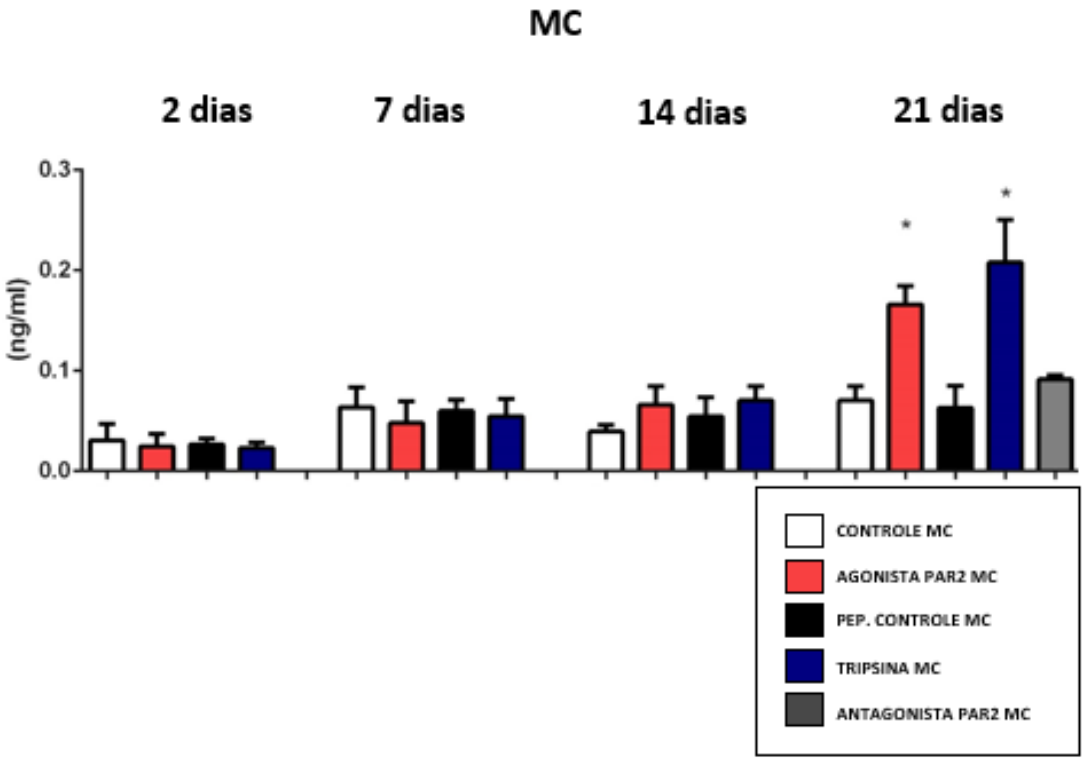
Gráfico 5.18 - Resultado ELISA- Níveis de OC – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

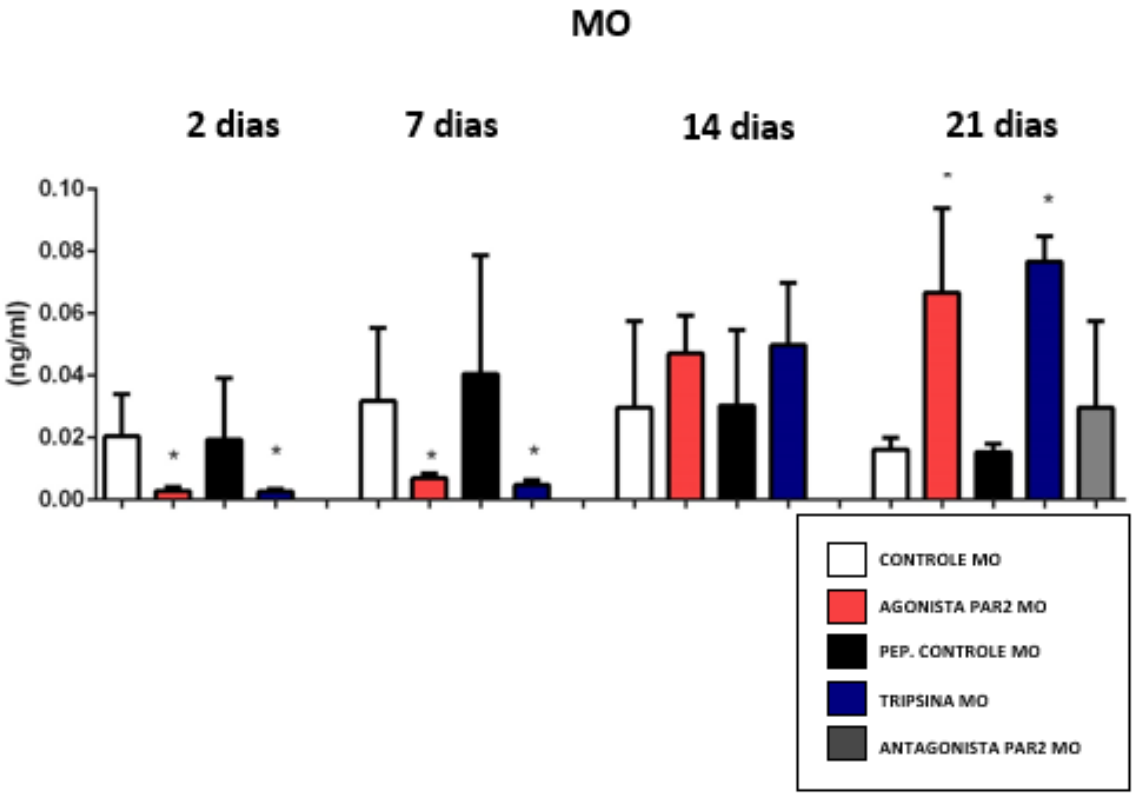
Gráfico 5.19 - Resultado ELISA- Níveis de Il-6 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

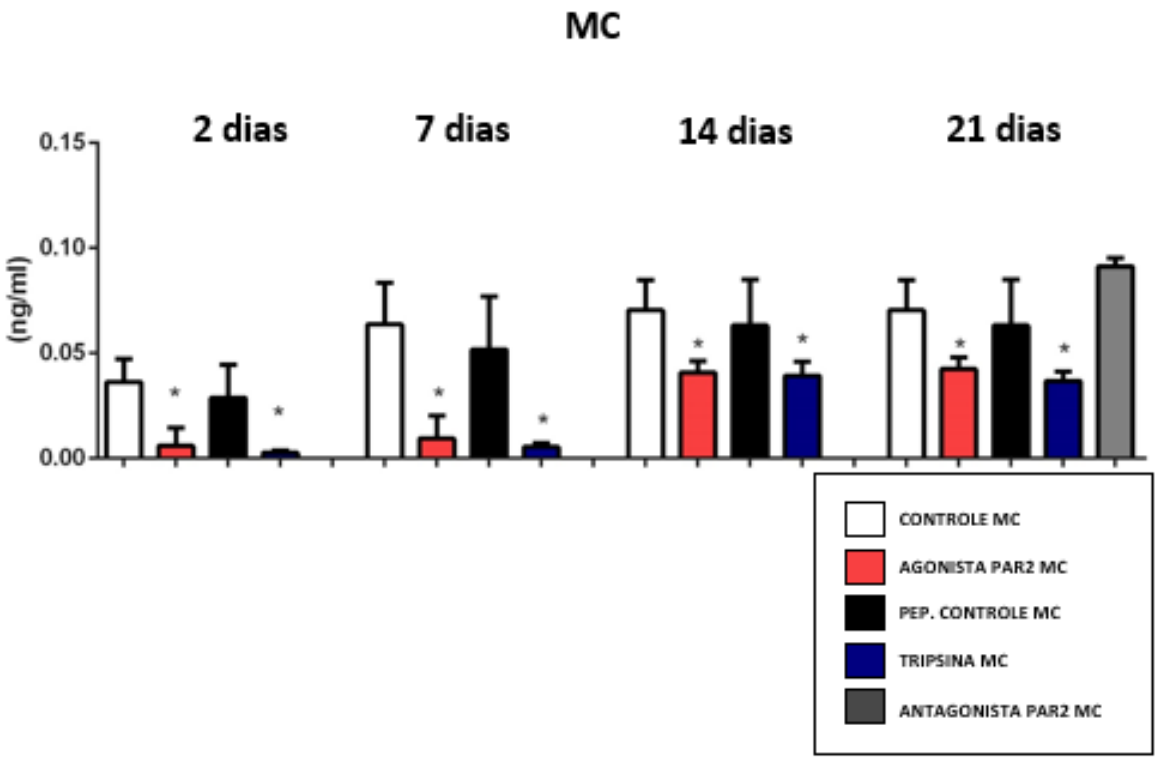
Gráfico 5.20 - Resultado ELISA- Níveis de IL-6 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

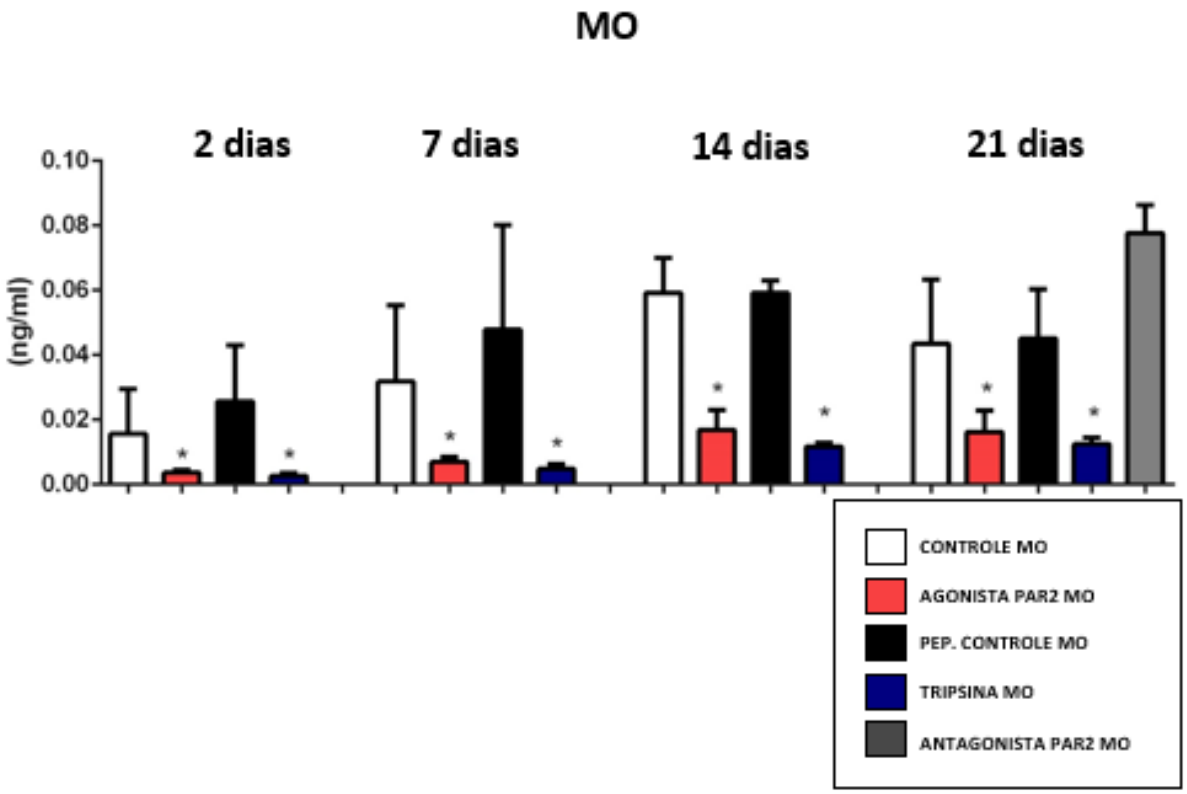
Gráfico 5.21 - Resultado ELISA- Níveis de IL-10 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

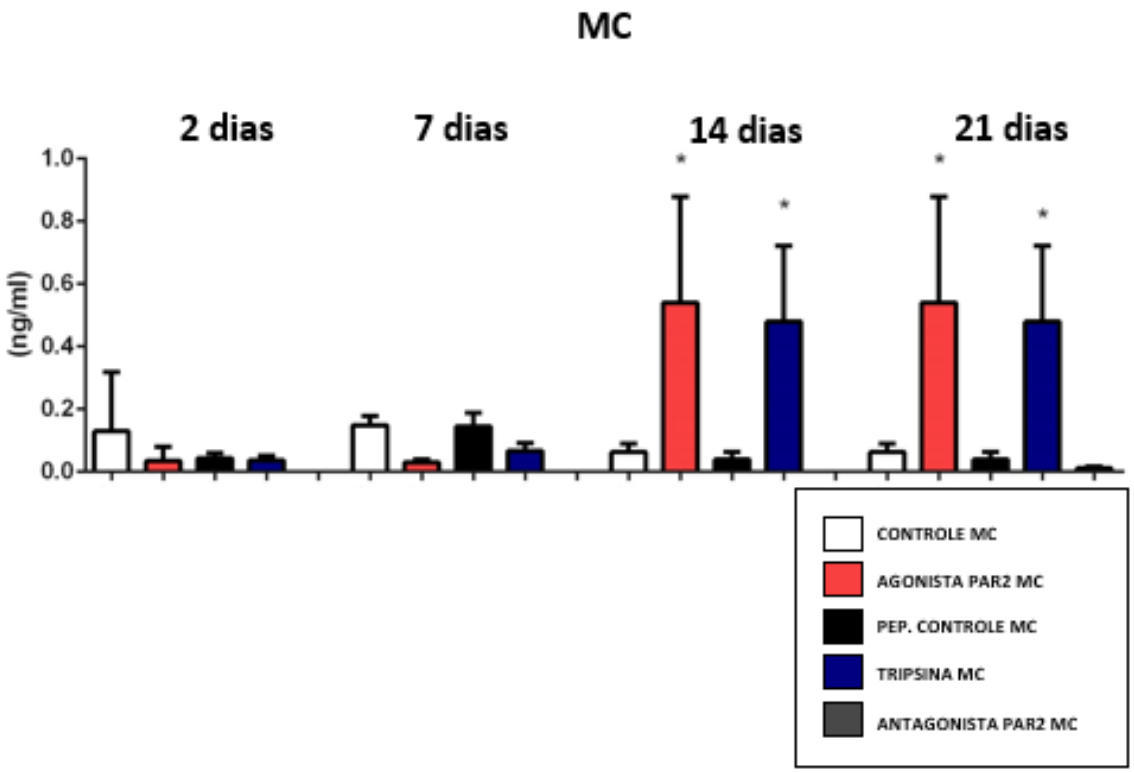
Gráfico 5.22 - Resultado ELISA- Níveis de IL-10 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

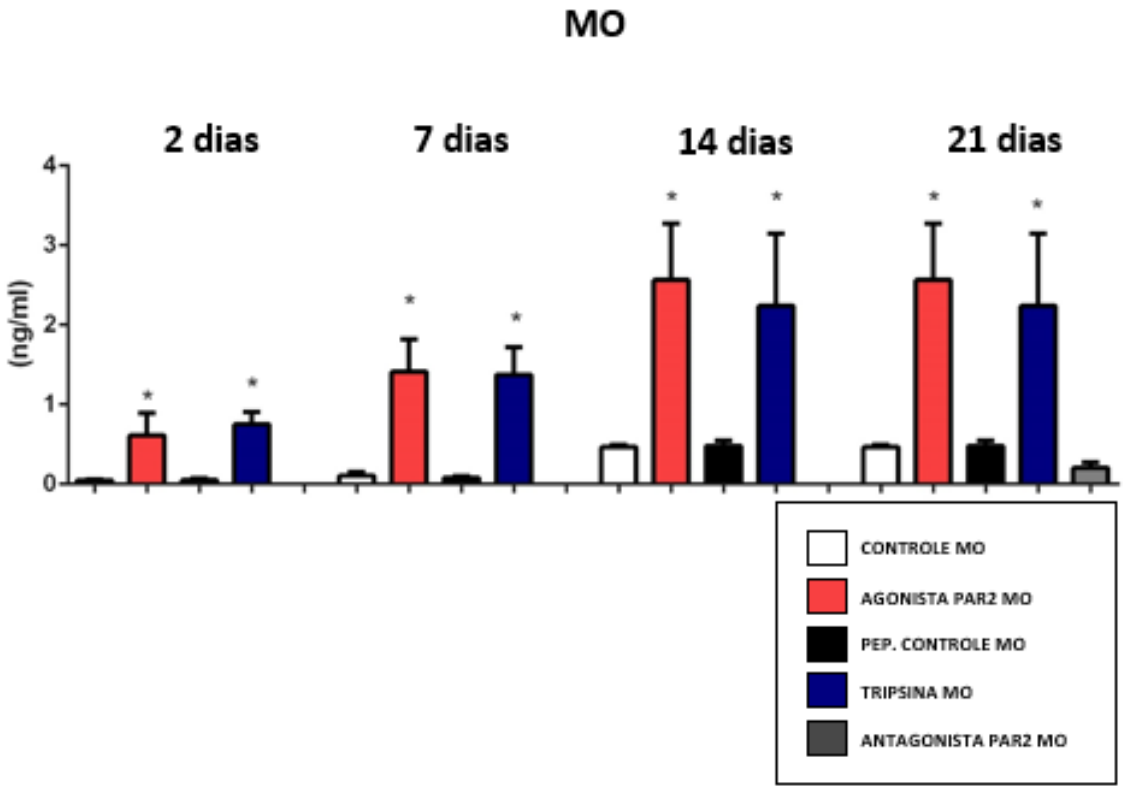
Gráfico 5.23 - Resultado ELISA- Níveis de CCL2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controole (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

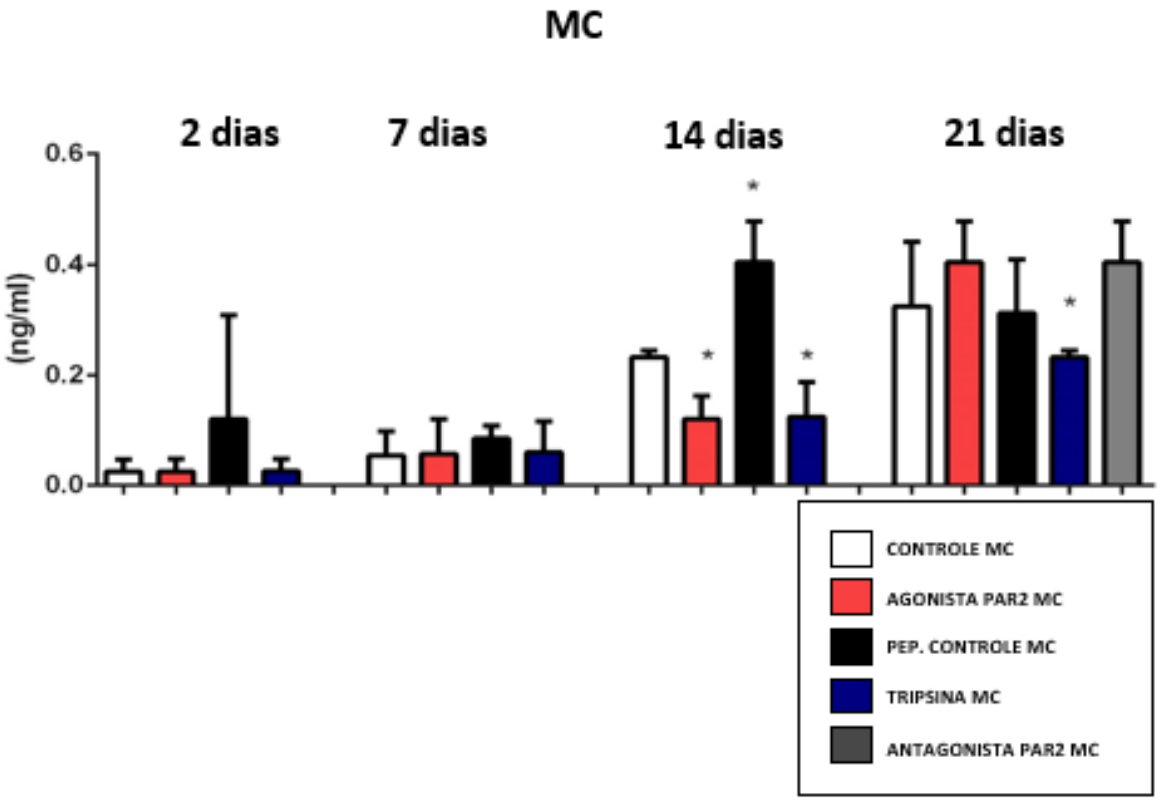
Gráfico 5.24 - Resultado ELISA- Níveis de CCL2 – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

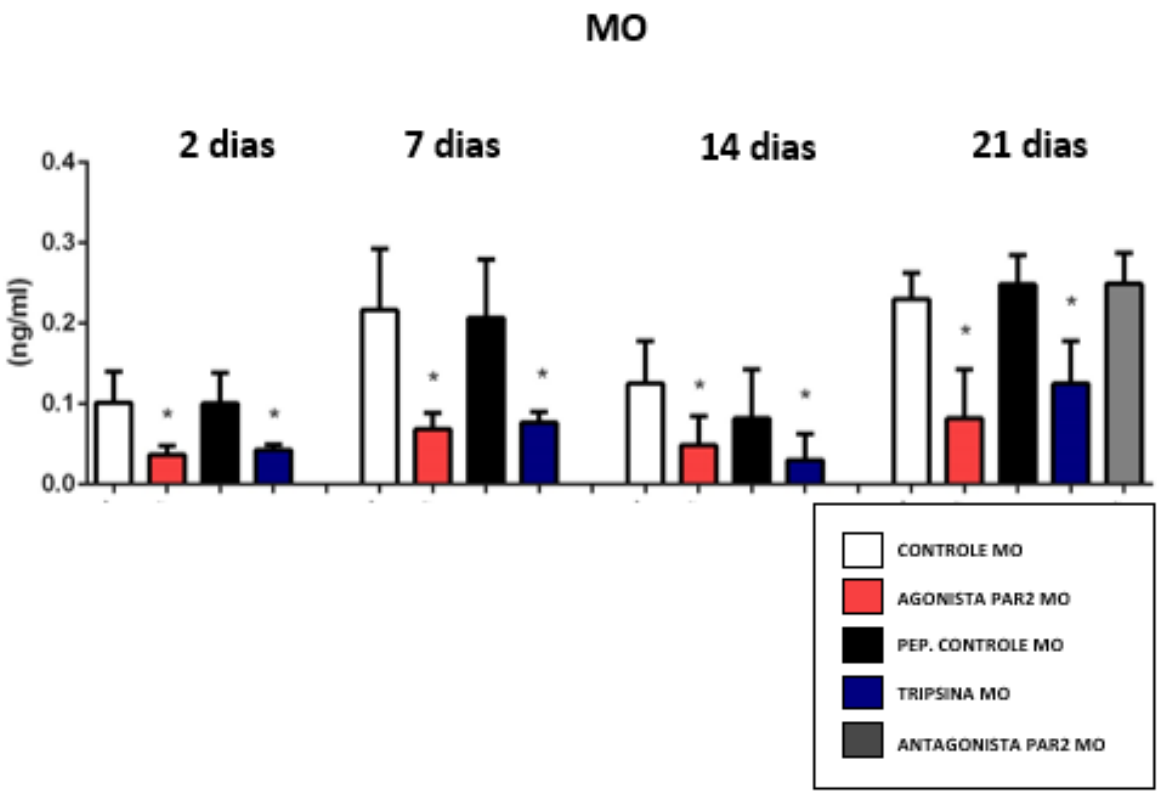
Gráfico 5.25 - Resultado ELISA- Níveis de MCSF – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Controle (MC)



* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

Gráfico 5.26 - Resultado ELISA- Níveis de MCSF – 2, 7, 14 e 21 dias - Meio Osteogênico (MO)



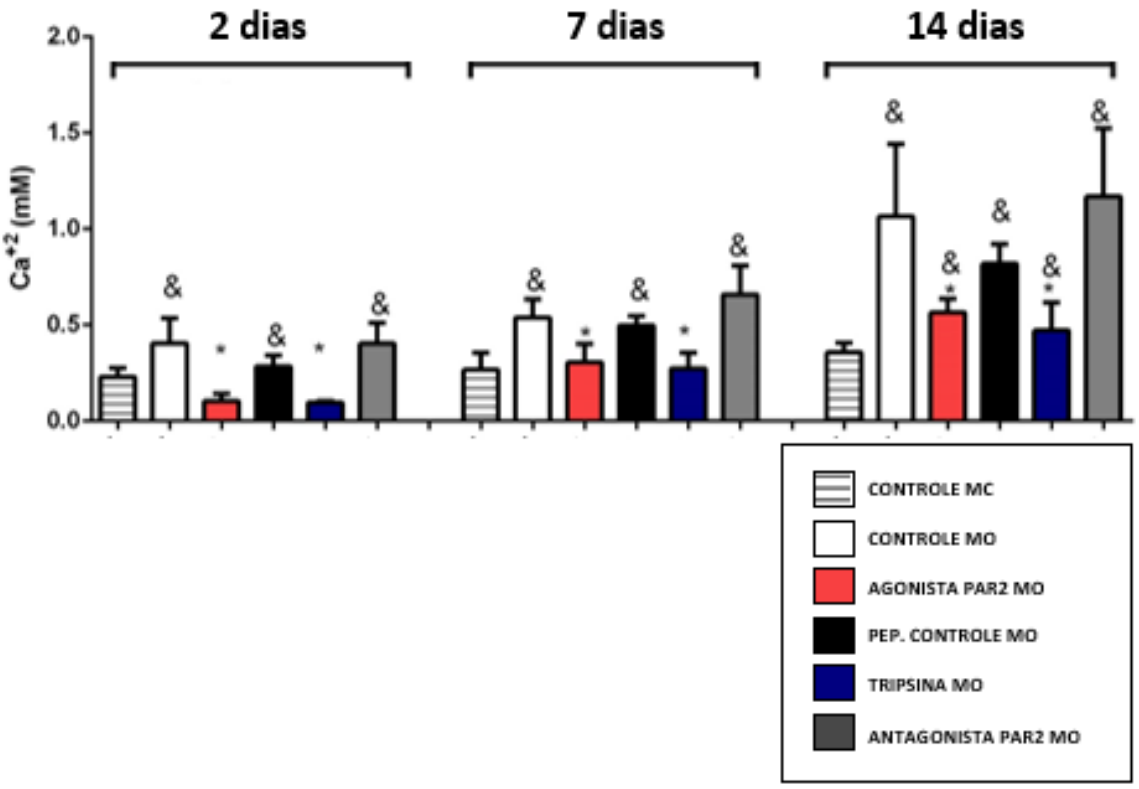
* - Diferença em relação ao grupo Controle - p<0,05.

Fonte: O autor

5.6 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CALCIO

No gráfico 5.27 é possível observar que os grupos Agonista do PAR-2 e Tripsina levaram á uma diminuição nos níveis de cálcio aos 2, 7 e 14 dias. ($p<0,05$.).

Gráfico 5.27 - Resultado Níveis de Cálcio – 2, 7 e 14 dias



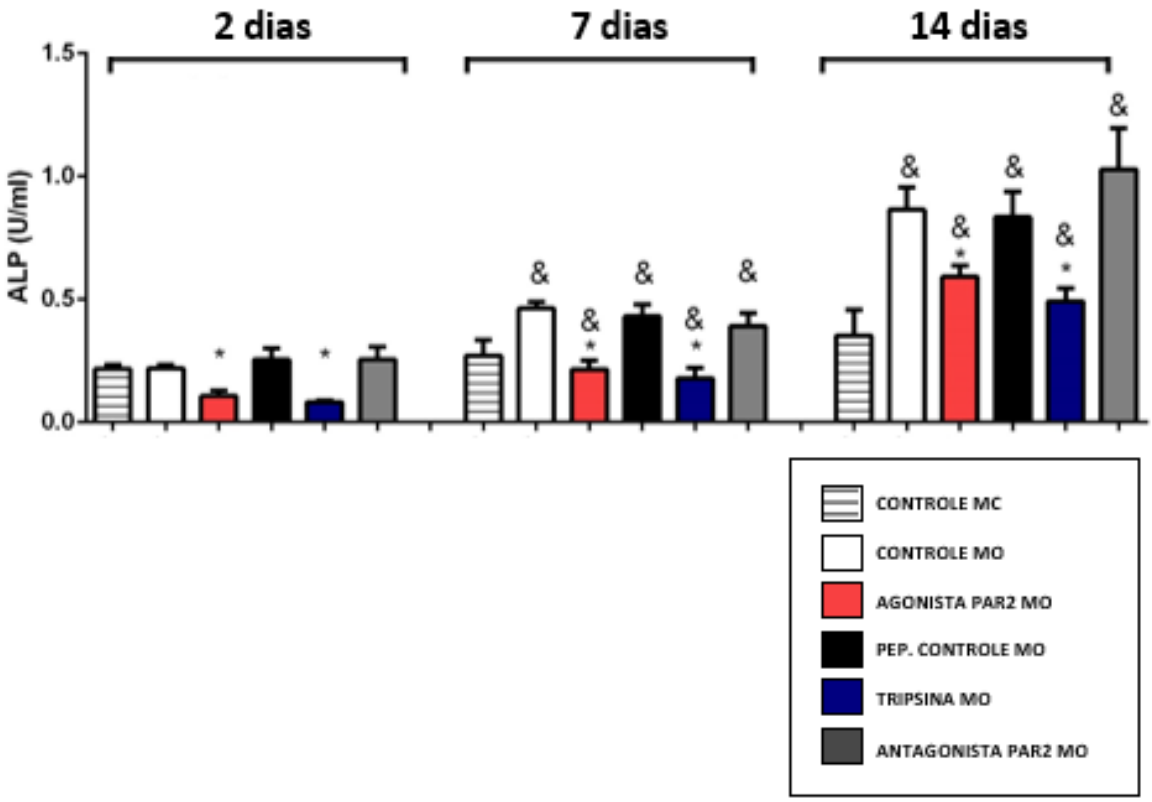
* - Diferença em relação ao grupo Controle MO - $p<0,05$.
& - Diferença em relação ao grupo Controle MC - $p<0,05$.

Fonte: O autor

5.7 DETECÇÃO DOS NÌVEIS DE ALP

No gráfico 5.28 é possível observar que os grupos Agonista do PAR-2 e Tripsina levaram á uma diminuição dos níveis de ALP aos 2, 7 e 14 dias. (p<0,05.)

Gráfico 5.28 - Resultado Níveis de ALP – 2, 7 e 14 dias



* - Diferença em relação ao grupo Controle MO - p<0,05.
& - Diferença em relação ao grupo Controle MC - p<0,05.

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

Como principal resultado do presente estudo, a ativação do PAR-2 levou a um menor potencial de mineralização e formação de depósitos de cálcio aos 21 dias no ensaio de mineralização por vermelho de Alizarina, sugerindo que a ativação do PAR-2 pode estar associada à menor atividade osteogênica, efeito que parece associado à diminuição inicial da proliferação celular, diminuição da atividade da ALP e balanço alterado entre OPG e RANKL, onde houve um aumento da expressão gênica e dos níveis protéicos de RANKL e diminuição da expressão gênica e dos níveis protéicos de OPG.

Tang e colaboradores em 2016 mostraram que o processo inflamatório em PDLSCs coletadas de sítios com inflamação gengival, torna as PDLSCs disfuncionais em sua capacidade de diferenciação osteogênica inclusive em termos de sua capacidade de mineralizar nódulos e níveis de expressão de genes osteogênicos (Tang et al., 2016), estando de acordo com os dados observados em nosso estudo.

A ativação do PAR-2 e sua influência na proliferação de células cancerígenas já foi definida em vários tipos de câncer, como pâncreas, melanoma, fígado, entre outros (Zheng et al., 2009; Al-Eryani et al., 2015; Xie; Zhang, 2015) no entanto, o papel da ativação de PAR-2 na proliferação das células mesenquimais do ligamento periodontal ainda não está claro. A tripsina é um ativador não específico do PAR-2 (Ramachandran et al., 2016) e também atua em outras vias levando ao aumento da proliferação celular. Entretanto, o ativador específico de PAR-2 (SLIGRL-NH2) mostrou uma diminuição na proliferação celular nas primeiras 48 horas e um retorno a níveis semelhantes ao grupo controle em 96 horas, sugerindoo que a ativação específica do PAR-2 pode prejudicar a proliferação celular inicial e pode ter efeito compensado ao longo do tempo. Este efeito da ativação específica do PAR-2 na diminuição da proliferação celular nas células mesenquimais do ligamento periodontal ainda não está claro na literatura e nossos resultados mostram que mais pesquisas devem ser feitas para elucidar este mecanismo.

Os dados obtidos através do q-PCR mostram que a ativação do PAR-2 levou a uma diminuição na expressão do gene da OPG e um aumento na expressão do gene RANKL em todos os tempos experimentais. Estes resultados foram corroborados pelo ELISA que mostrou o mesmo padrão nos níveis proteicos de OPG e RANK Estes resultados são consistentes com a literatura onde foi demonstrado que a ativação de PAR-2 induziu aumento da expressão de RANKL em osteoblastos, o que pode estar associado com aumento da diferenciação osteoclástica e aumento da reabsorção óssea (Amiable et al., 2009).

Ainda, houve diminuição na expressão gênica e nos níveis de Runx2 quando o PAR-2 foi ativado em PDLSCs. Sabe-se que o Runx2 está envolvido na diferenciação de osteoblastos, regulação osteogênica e crescimento ósseo (Lee et al., 1999).

Outra molécula importante que pode influenciar o metabolismo ósseo é a CCL2, que pode ser encontrada em locais de erupção dentária e a degradação óssea, que é expressa por osteoclastos maduros e osteoblastos (Meirelles et al., 2009). No presente estudo, os níveis de CCL2 também aumentaram nos grupos agonista específico de PAR-2 e Tripsina aos 7, 14 e 21 dias, evidenciando a influência da ativação do PAR-2 na degradação óssea.

A ALP é um importante marcador de diferenciação osteoblástica (Choi et al., 2015). Sabe-se que os PDLSCSs diminuem a atividade da ALP durante o processo inflamatório (Li et al., 2014), resultado semelhante ao encontrado no presente estudo, onde a ativação do PAR-2 pela tripsina e o agonista do PAR-2 resultou em uma atividade mais fraca da ALP.

Os achados do presente estudo sugerem fortemente que a ativação do PAR-2 desempenha um papel importante no metabolismo dos PDLSCs, reduzindo o processo de osteogênese através da proliferação celular alterada, diminuição da atividade da ALP e desequilíbrio entre RANKL e OPG. No entanto, mais estudos precisam ser feitos para esclarecer esses resultados.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a ativação de PAR-2 regula negativamente a atividade osteogênica em PDLSCs. Além disso, a ativação do PAR-2 pode diminuir a formação de depósitos de cálcio, interferir na proliferação celular e diminuir a expressão gênica e proteica de OPG e aumentar a expressão gênica e proteica do RANKL, indicando que o PAR-2 pode ser um alvo importante a ser considerado no uso de células mesenquimais do ligamento periodontal em procedimentos regenerativos em periodontontia.

REFERÊNCIAS[1]

Abraham LA, MacKie EJ. Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. J Bone Miner Res. 1999 Aug;14(8):1320-9.

Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner KC, Guardiola JJ, Clair HB, Prough RA, Cave M. Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. Toxicol Pathol. 2015 Jun;43(4):482-97. doi: 10.1177/0192623314549960.

Amiable N, Tat SK, Lajeunesse D, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Boileau C. Proteinase-activated receptor (PAR)-2 activation impacts bone resorptive properties of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. Bone. 2009 Jun;44(6):1143-50. doi: 10.1016/j.bone.2009.02.015.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:253-69.

Belibasakis GN, Meier A, Guggenheim B, Bostanci N. The RANKL-OPG system is differentially regulated by supragingival and subgingival biofilm supernatants. Cytokine. 2011 Jul;55(1):98-103. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.009.

Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. Biochem J. 1996 Mar 15;314 (Pt 3):1009-16.

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

Choi JK, Hwang HI, Jang YJ. The efficiency of the in vitro osteo/dentinogenic differentiation of human dental pulp cells, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. Int J Mol Med. 2015 Jan;35(1):161-8. doi:10.3892/ijmm.2014.1986.

.1 De acordo com o estilo Vancouver

Euzebio Alves VT, Bueno da Silva HA, de França BN, Eichler RS, Saraiva L, de Carvalho MH, Holzhausen M. Periodontal treatment downregulates protease-activated receptor 2 in human gingival crevicular fluid cells. Infect Immun. 2013 Dec;81(12):4399-407. doi: 10.1128/IAI.01107-13.

Fagundes JA, Monoo LD, Euzébio Alves VT, Pannuti CM, Cortelli SC, Cortelli JR, Holzhausen M. Porphyromonas gingivalis is associated with protease-activated receptor-2 upregulation in chronic periodontitis. J Periodontol. 2011 Nov;82(11):1596-601. doi: 10.1902/jop.2011.110073.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol. 2015 Jan;15(1):30-44. doi: 10.1038/nri3785.

Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. Aust Dent J. 2014 Jun;59 Suppl 1:117-30. doi: 10.1111/adj.12100.

Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2008 May;3(2):131-45.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Ellen RP, Jobin MC, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of Porphyromonas gingivalis infection. Am J Pathol. 2006 Apr;168(4):1189-99.

Holzhausen M, Cortelli JR, da Silva VA, Franco GC, Cortelli SC, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 (PAR(2)) in human periodontitis. J Dent Res. 2010 Sep;89(9):948-53. doi: 10.1177/0022034510373765.

Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. Oral Dis. 2018 Jul;24(5):696-705. doi: 10.1111/odi.12703.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Dis. 2002 May;8(3):147-59.

Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi JY, Rosen V, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Ryoo HM. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. J Cell Biochem. 1999 Apr 1;73(1):114-25.

Li B, Zhang Y, Wang Q, Dong Z, Shang L, Wu L, Wang X, Jin Y. Periodontal ligament stem cells modulate root resorption of human primary teeth via Runx2 regulating RANKL/OPG system. Stem Cells Dev. 2014 Oct 15;23(20):2524-34. doi:10.1089/scd.2014.0127.

Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. Arginine-specific protease from Porphyromonas gingivalis activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. Infect Immun. 2001 Aug;69(8):5121-30.

Lourbakos A, Chinni C, Thompson P, Potempa J, Travis J, Mackie EJ, et al. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from Porphyromonas gingivalis. FEBS Lett. 1998 Sep 11;435(1):45-8. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01036-9.

Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.

Nanci A. Periodontium. In: Ten Cate's oral histology: development, structure and function. St. Louis: CV Mosby; 2003. p. 240–74.

Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev. 2004 Apr;84(2):579-621.

Ramachandran R, Altier C, Oikonomopoulou K, Hollenberg MD. Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling. Pharmacol Rev. 2016 Oct;68(4):1110-42.

Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. Periodontol 2000. 2006;40:77-93.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Sowmya S, Chennazhi KP, Arzate H, Jayachandran P, Nair SV, Jayakumar R. Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast. Tissue Eng Part C Methods. 2015 Oct;21(10):1044-58. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0603.

Tang HN, Xia Y, Yu Y, Wu RX, Gao LN, Chen FM. Stem cells derived from "inflamed" and healthy periodontal ligament tissues and their sheet functionalities: a patient-matched comparison. J Clin Periodontol. 2016 Jan;43(1):72-84. doi: 10.1111/jcpe.12501.

Travis J, Banbula A, Potempa J. The role of bacterial and host proteinases in periodontal disease. In: Langner J, Ansorge S. (eds). Cellular peptidases in immune functions and diseases 2. advances in experimental medicine and biology. Boston MA: Springer; 2002. Vol. 477.

Uehara A, Muramoto K, Imamura T, Nakayama K, Potempa J, Travis J, et al. Arginine-specific gingipains from Porphyromonas gingivalis stimulate production of hepatocyte growth factor (scatter factor) through protease-activated receptors in human gingival fibroblasts in culture. J Immunol. 2005 Nov 1;175(9):6076-84.

Xie F, Zhang B. microRNA evolution and expression analysis in polyploidized cotton genome. Plant Biotechnol J. 2015 Apr;13(3):421-34. doi: 10.1111/pbi.12295.

Wu YC, Lin LK, Song CJ, Su YX, Tu YK. Comparisons of periodontal regenerative therapies: A meta-analysis on the long-term efficacy. J Clin Periodontol. 2017 May;44(5):511-519. doi: 10.1111/jcpe.12715.

Zheng C, Cotrim AP, Sunshine AN, Sugito T, Liu L, Sowers A, Mitchell JB, Baum BJ. Prevention of radiation-induced oral mucositis after adenoviral vector-mediated transfer of the keratinocyte growth factor cDNA to mouse submandibular glands. Clin Cancer Res. 2009 Jul 15;15(14):4641-8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0819.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre a atividade osteogênica de células do ligamento periodontal

Pesquisador: Marinella Holzhausen Caldeira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34651214.8.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.664.766

Apresentação do Projeto:

Desenho Observacional. Estudo in vitro sobre o efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre a atividade osteogênica de células do ligamento periodontal.O estudo será realizado comcélulas do ligamento periodontal de 10 terceiros molares hígidos extraídos com indicação ortodôntica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito da ativação do PAR1 através de trombina sobre a diferenciação osteogênica das células do ligamento. Além disso, serão avaliados os efeitos da ativação do PAR1 sobre a expressão gênica e proteica de fosfatase alcalina (ALP), osteopontina, osteocalcina, RANKL, OPG e runt-related transcription factor-2 (RUNX2) e expressão proteica de IL-10 e TGF-ß1. Nada foi inserido relativo à Protease do tipo 2 (PAR-2).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O risco envolvido ao paciente que aceite participar desta pesquisa é mínimo, haja visto que todo o procedimento de raspagem será feito após o
dente ser extraído.

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

Benefícios:Colaborar no desenvolvimento científico na área da periodontia através de se melhor conhecer o mecanismo de ativação do PAR1 nas células dos tecidos periodontais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É apresentada emenda solicitando a inclusão da avaliação do Receptor Ativado por Protease do tipo 2 (PAR -2) para analisarmos os efeitos da ativação desse receptor nas células mesenquimais previamente extraídas do ligamento periodontal. Esta etapa a mais não necessitara de novas coletas, portanto não demandando a inclusão de novos pacientes, sendo realizada com as culturas de células já estabelecidas. A inclusão da análise do PAR-2 não oferecerá nenhum risco adicional aos pacientes e não necessitará de nenhum procedimento adicional com os pacientes. Além disso, a inclusão
desta análise será de grande importância, pois permitirá definir o papel do PAR-2 na atividade osteoclástica tornando possível projetar futuras alternativas terapêuticas importantes na terapia periodontal.

Entretanto no título da pesquisa continua sendo "Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre a atividade osteogênica de células do ligamento periodontal" o que torna incompatível a presente emenda.

Consta nas Informações Básicas que "A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

São adequadamente apresentados o TCLE e a Carta de Autorização para uso de Clínica Odontológica da FOUSP.

Recomendações:

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

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.664.766

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_765726 E1.pdf	27/07/2016 14:15:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO PROPOSTO in vitrofinal-3.docx	25/08/2014 18:48:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Projeto dentes.docx	25/08/2014 18:47:53		Aceito
Outros	autorização da clinica projetoinvitro.pdf	06/08/2014 14:36:05		Aceito
Folha de Rosto	File-04-08-2014-15-49-11.pdf	04/08/2014 16:56:57		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 05 de Agosto de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

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

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CONFORME RESOLUÇÃO 466/12 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa intitulada EFEITO DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE DO TIPO 1 (PAR1) SOBRE A ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Responsável pelo projeto: Profa Dra. Marinella Holzhausen Caldeira
Fone:(11)3091 7833

Antes de qualquer coisa é necessário que você leia atentamente as informações que estão neste documento.

Sabemos que existe em células da gengiva proteínas que são chamadas de Receptores Ativados por Protease do Tipo 1 (PAR1). Estas proteínas têm se mostrado importante na resolução da inflamação gengival e na formação óssea em volta dos dentes. Por outro lado, ainda falta no campo científico mais estudos nessa área para melhor se entender como esta proteína funciona nessas células da gengiva.

Assim, o objetivo da nossa pesquisa é elucidar os mecanismos desta proteína, PAR1, nas células da gengiva.

PROCEDIMENTOS: Você que for extrair seus terceiros molares no ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) na disciplina de cirurgia, após concordar em participar desta pesquisa ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, irá somente doar os dentes recém extraídos para que algum membro da equipe da pesquisa raspe parte da raiz do dente e então armazene o material em local apropriado para futuras análises laboratoriais.