

MÔNICA YURI ORITA MISAWA

**Caracterização do efeito imunomodulatório das células mesenquimais
indiferenciadas na resposta inflamatória a *Porphyromonas gingivalis***

São Paulo

2018

MÔNICA YURI ORITA MISAWA

**Caracterização do efeito imunomodulatório das células mesenquimais
indiferenciadas na resposta inflamatória a *Porphyromonas gingivalis***

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: Prof^a. Dr^a. Cristina Cunha Villar

São Paulo

2018

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.

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

Misawa, Mônica Yuri Orita.

Caracterização do efeito imunomodulatório das células mesenquimais indiferenciadas na resposta inflamatória a *Porphyromonas gingivalis* / Mônica Yuri Orita Misawa; orientadora Cristina Cunha Villar. -- São Paulo, 2018.

82p. : fig., tab., ; 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. Células tronco. 2. *Porphyromonas gingivalis*. 3. Neutrófilos. 4. Inflamação. I. Villar, Cristina Cunha. II. Título.

Misawa MYO. Caracterização do efeito imunomodulatório das células mesenquimais indiferenciadas na resposta inflamatória a *Porphyromonas gingivalis*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 04/12/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mauricio Guimarães Araújo

Instituição: Universidade Estadual de Maringá Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Luciana Saraiva

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Carla Renata Sipert

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Aos meus pais,

por fazerem da minha jornada a trama principal de suas vidas.

Aos meus tios Narumi e Angelo,

por despertarem em mim a busca pela caneta estrelada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Cristina Cunha Villar**, cujos ensinamentos repercutem além de minha vida acadêmica. Obrigada por exemplificar de forma tão humana o verdadeiro significado da palavra “*orientação*”. Palavras não são suficientes para agradecer sua presença em minha caminhada.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da Universidade de São Paulo; especialmente ao **Prof. Dr. Giuseppe Romito**, **Prof. Dr. João Batista César Neto**, **Prof. Dr. Claudio Pannuti**, **Prof.^a Dr.^a Luciana Saraiva**, **Prof.^a Dr.^a Marinella Holzhausen** e **Prof.^a Dr.^a Marina Conde**. Por todo conhecimento técnico e científico transmitido, pela dedicação demonstrada a cada encontro na formação dos próximos mestres e doutores.

Aos colegas e amigos de pós-graduação; em particular **Alexandre Llanos**, **André Barbisan**, **Bruna di Profio**, **Bruno França**, **Carlos Benitez**, **Carlos Rubio**, **Emanuel Rovai**, **Estela Rebeis**, **Letícia Rodrigues**, **Lucas Ambrósio**, **Marcelo Sirolli**, **Marília Cabral**, **Thais Guirado**, **Vanessa Almeida**, e **Vitor Sapata**. Pelo compartilhado amor à ciência, pela busca conjunta de maiores horizontes. Pela companhia, pelas discussões acaloradas, pela cumplicidade.

Aos colegas **Henrique Palombo** e **Stela Tassi** (*in memoriam*). Pela extensa contribuição na fase experimental de minha tese, e por acreditarem em meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, em especial à técnica **Marília Camargo** do Departamento de Estomatologia pelo amor e dedicação sempre disponíveis a todos os que precisassem.

Ao Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, nominalmente aos docentes **Prof. Dr. Francisco Nociti** e **Prof.^a Dr.^a Karina Silvério**, às colegas **Dr.^a Mayra Albiero** e **Dr.^a Miki Saito**, pela importante colaboração técnica e intelectual nas fases experimentais deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, nomeadamente **Prof. Dr. Antônio Condino Neto** e sua equipe **Christiane Lambert, Cristina, José Antônio Albuquerque, Lucila Barreiros, Marina Wall, Núria Zurro, Otávio Marques, Paola Vendramini, Renata Cruz, Tábata Takahashi**. Por tão generosamente compartilharem seus equipamentos, conhecimentos, técnicas e conselhos.

Ao **Prof. Dr. Mauricio Araujo**, pelo constante incentivo em meu caminho profissional, por todos esses anos. Sua figura inspiradora será sempre uma influência em minha vida.

A todo time Geistlich Pharma do Brasil, em especial **Poul Sorensen, Marcelo Calderero, Débora Furlani, Marcelo Kohn** pelo imenso suporte que possibilitou a realização dessa conquista.

Aos meus **pais, avós, tios e primos**, à base familiar que é o começo de tudo e a fundação de qualquer conquista.

Ao **Rodrigo Yanagawa**, por acompanhar minha evolução a cada passo, sempre me incentivando a ir além.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento desta pesquisa (processo 2014/11617-1).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

Misawa MYOM. Caracterização do efeito imunomodulatório das células mesenquimais indiferenciadas na resposta inflamatória a *Porphyromonas gingivalis* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi caracterizar as respostas das células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal (PDLSCs) ao extrato proteico total de *Porphyromonas gingivalis* (PgPE) e avaliar seu impacto nas propriedades biológicas das células leucêmicas promielocíticas humanas HL-60. PDLSCs enriquecidas com CD105 foram semeadas em placas de 6 poços durante 24h. Em seguida, as células foram desafiadas com PgPE (0 e 2 mg/ml) durante 3h (período de exposição). Os sobrenadantes foram então descartados; PDLSCs foram lavadas com PBS e cultivadas por 18h adicionais. Por fim, os sobrenadantes foram coletados. Os níveis de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes foram avaliados por ensaios multiplex. Na sequência, o efeito dos sobrenadantes derivados de PDLSCs (tratadas ou não com PgPE) sobre a ativação, o recrutamento e a resposta inflamatória de HL-60 foi avaliado. PDLSCs responderam ao tratamento com PgPE. RANTES, eotaxina e IP-10 (proteína produzida por IFN- α) foram detectados apenas em sobrenadantes de PDLSCs/PgPE. Além disso, PgPE induziu maior secreção de proteína quimiotática de neutrófilos (MCP)-1, intérferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-1ra ($p > 0,05$). O recrutamento de HL-60D aumentou 4,7 vezes quando estas células foram expostas a sobrenadantes PDLSCs/PgPE, enquanto que os sobrenadantes de PDLSCs não afetaram a quimiotaxia de HL-60D. Sobrenadantes PDLSCs promoveram uma redução de 16% na produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) por HL-60D estimuladas por PMA ($p=0,013$). Em contraste, sobrenadantes PDLSCs/PgPE promoveram um aumento de $1,78 \pm 1,04$ vezes ($p=0,046$) na produção de ROS. Finalmente, tanto sobrenadantes PDLSCs, como sobrenadantes PDLSCs/PgPE, não influenciaram a produção de fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-1 β pelas HL-60D em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS). Esses achados sugerem um importante papel das PDLSCs no reconhecimento de *P. gingivalis*, recrutamento de células imunes inatas e ativação de mecanismos antimicrobianos.

Palavras-chave: células tronco, *Porphyromonas gingivalis*, neutrófilos, inflamação.

ABSTRACT

Misawa MYOM. Role of periodontal-derived mesenchymal stem cells in *Porphyromonas gingivalis* infection [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

The aim of this study was to characterize periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells (PDLSCs) responses to *Porphyromonas gingivalis* total protein extract (PgPE) and its impact on human leucocyte promyelocyte cells HL-60 biological properties. CD105-enriched PDLSCs were seeded in 6-well plates for 24h. Next, cells were challenged with PgPE (0 and 2mg/ml) for 3h (exposure period). Supernatants were then discarded, cells were washed with PBS, and cultured further for 18h before supernatants were collected. Supernatants' cytokine and chemokine levels were assessed by bead-based multiplex assays. The effect of supernatants collected from untreated and PgPE-treated PDLSCs on HL-60D activation, recruitment and inflammatory responses was determined. PDLSCs were responsive to PgPE treatment. RANTES, eotaxin, and interferon-inducible protein (IP)-10 were detected only in supernatants collected from PgPE treated cells. Moreover, PgPE induced higher monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-1ra secretion ($p > 0.05$). HL-60D recruitment was increased by 4.7 fold when exposed to PDLSCs/PgPE supernatants, whereas PDLSCs supernatants did not affect HL-60D chemotaxis. PDLSCs supernatants promoted a 16% reduction in radical oxygen species (ROS) production by PMA-stimulated HL-60D ($p=0.013$). On the contrary, PDLSCs/PgPE supernatants promoted a 1.78 ± 1.04 fold increase ($p=0.046$) in ROS production. Finally, both PDLSCs and PDLSCs/PgPE supernatants had no effect on HL-60D tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-1 β responses to lipopolysaccharide (LPS). These findings strongly suggest an important role of PDLSCs in the recognition of *P. gingivalis*, recruitment of innate immune cells and activation of antimicrobial mechanisms.

Keywords: stem cells, *Porphyromonas gingivalis*, neutrophils, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fenótipo e critérios funcionais das células mesenquimais indiferenciadas multipotentes (MSC) de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular	26
Figura 2.2 - Células-tronco derivadas de diferentes estruturas dentárias	29
Figura 2.3 – Interação entre MSCs e neutrófilos durante resposta inflamatória.....	33
Figura 4.1 - Ilustração dos passos para obtenção do sobrenadante secretado pela cultura de PDLSC	40
Figura 4.2 - Representação de um ensaio de quimiotaxia	42
Figura 5.1 - Padronização das condições experimentais	47
Figura 5.2 - Quantificação de mediadores inflamatórios presentes nos sobrenatantes secretados por PDLSCs expostas ao PgPE.	49
Figura 5.3 - Efeito dos sobrenatantes de PDLSCs na expressão de CD62L na superfície de células HL-60D estimuladas por fMLP.	50
Figura 6.1 - Ilustração da interação entre as PDLSCs, bactérias anaeróbias e neutrófilos	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	infusão cérebro coração
BMMSC	células mesenquimais indiferenciadas multipotentes derivadas da medula óssea
BMSC	células-tronco derivadas da medula óssea
CD	cluster de diferenciação
CO ₂	gás carbônico
Cy	cianina
DFPC	células progenitoras do folículo dentário
DHR	dihidrorodamina
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DPSC	células mesenquimais indiferenciadas derivadas da polpa
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
FITC	isotiocianato de fluoresceína
fMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
g	força gravitacional
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GVHD	doença do enxerto versus hospedeiro
H	horas
H ₂	hidrogênio
HL-60	linhagem celular humana leucêmica promielocítica
HL-60D	células HL-60 diferenciadas em neutrófilos
HLA-DR	antígeno leucocitário humano
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN- γ	interferon gama
IL	interleucina
IP-10	proteína produzida por IFN- α
LPS	lipopolissacarídeo

MCP	proteína quimiotática de neutrófilos
MIF	fator inibitório de migração de macrófagos
MIN	minuto
MIP	proteína inflamatória de neutrófilos
ml	mililitro
mm	milímetro
MSC	células mesenquimais indiferenciadas multipotentes
N ₂	nitrogênio
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NIH	Institutos Nacionais de Saúde – Estados Unidos da América
°C	graus Célsius
PAMPS	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão fosfato-salino
PDGF	fator de crescimento de plaquetas
PDLSC	células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal
PE	ficoeritina
PgPE	extrato proteico total de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PMA	acetato de forbol, miristato
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
ROS	espécie de oxigênio reativo
RPM	rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	soro fetal bovino
SCAP	células mesenquimais indiferenciadas derivadas da papila apical
SEG	segundo
SHED	células mesenquimais indiferenciadas derivadas de dentes decíduos esfoliados
TLR	receptores Toll-like
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TSB	caldo tríptico de soja
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular
VEGF	fator de crescimento endotelial
µg	micrograma

μl	microlitro
μM	micromolar
ng	nanograma
nm	nanometro
nM	nanomolar
pg	picograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Células mesenquimais indiferenciadas multipotentes	25
2.1.1 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas da polpa dentária	27
2.1.2 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas dentes humanos decíduos esfoliados.....	27
2.1.3 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal....	28
2.1.4 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas da papila apical	28
2.1.5 Células progenitoras do folículo dentário	28
2.2 MSCs e o sistema imune	30
2.3 Neutrófilos e a doença periodontal	31
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Células e meios de cultura	37
4.2 Obtenção do extrato total de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	38
4.2.1 Cepas e condições de cultivo	38
4.2.2 Coleta e extração proteica total.....	38
4.3 Exposição das PDLSCs ao extrato total de <i>P. gingivalis</i> e obtenção de sobrenadantes	39
4.4 Quantificação de citocinas e quimiocinas secretadas no sobrenadante das culturas PDLSCs	39
4.5 Expressão de CD-62L e CD18 na superfície de células HL-60D	41
4.6. Ensaio de quimiotaxia	41
4.7 Explosão respiratória (“burst” oxidativo)	43
4.8 Resposta inflamatória de HL-60D ao LPS	43
4.9 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Padronização das condições experimentais da exposição PDLSCs ao extrato total de <i>P. gingivalis</i>	45
5.2 Caracterização dos sobrenadantes de PDLSCs utilizados nas análises funcionais das células HL-60D	48

5.3 Ativação das células HL-60D	49
5.4 Ativação funcional das células HL-60D	51
5.4.1 Quimiotaxia	52
5.4.2 Atividade da NADPH oxidase	53
5.4.3 Resposta inflamatória	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	64
ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

Células mesenquimais indiferenciadas derivadas da medula óssea (MSCs) são células progenitoras não-hematopoiéticas com a capacidade de se multiplicar e originar distintas linhagens de células mesenquimais (Prockop 1997; Pittenger et al., 1999). Mais recentemente, ficou claro que essas células migram preferencialmente para locais de inflamação e infecção, onde reconhecem patógenos e interagem com células imunes (Qiu et al., 2012; Ferrand et al., 2011). Vários estudos mostraram que as MSCs têm características semelhantes e desempenham funções em comum com células efetoras da imunidade inata. Essas funções incluem a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e a expressão de ligantes e receptores envolvidos na interação com leucócitos e o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (Shi et al., 2007; Lombardo et al., 2009; Romieu-Mourez et al., 2009; Raicevic et al., 2010; Raicevic et al., 2012). Além disso, essas células também reagem à presença de mediadores inflamatórios com efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios (Gonzalez et al., 2009; Gonzalez-Rey et al., 2010; De Miguel et al., 2012), tornando-as atrativas ferramentas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Estudos pré-clínicos demonstraram o uso bem-sucedido de MSCs no tratamento de doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla e diabetes mellitus (González et al., 2009; Bouffi et al., 2010; Gonzalez-Rey et al., 2010; Liu et al., 2010b; Zhou et al., 2011; De Miguel et al., 2012; Yeung et al., 2012; Wu; Mahato, 2014). No entanto, o papel das células mesenquimais indiferenciadas em processos infecciosos-inflamatórios, como as doenças periodontais, permanece inexplorado.

A plasticidade das MSCs para promover ou inibir as respostas imunes é dependente da intensidade da ativação do sistema imunológico e dos tipos de mediadores inflamatórios encontrados (Wang et al., 2014). Nesse contexto, os estímulos microambientais são diretamente responsáveis pelo destino imunorregulatório das MSCs. Embora as MSCs administradas exogenamente consigam suprimir a progressão de vários distúrbios imunológicos, as funções de imunomodulação das MSCs residentes em tecidos doentes e em condições saudáveis ainda precisam ser definidas.

A doença periodontal é uma patologia infecto-inflamatória, predominantemente desencadeada por fatores de virulência produzidos por bactérias

anaeróbicas gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), e cuja evolução está fortemente relacionada com a magnitude e intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro (Graves, 2008). Na invasão microbiana, as células epiteliais gengivais, fibroblastos e outras células residentes detectam estruturas microbianas e iniciam a ativação de vias que resultam na secreção de citocinas e quimiocinas, que, por sua vez, levam ao recrutamento e ativação de leucócitos não residentes aos tecidos periodontais (Di Benedetto 2013). Dentre os leucócitos acima citados, os neutrófilos são considerados as principais células envolvidas na patogênese da doença periodontal (Page; Schroeder, 1976; Van Dyke; Vaikuntam, 1994), representando a primeira linha de defesa contra os periodontopatógenos. Reduções no número e na função dos neutrófilos foram, até recentemente, associadas a uma maior predisposição à doença periodontal. No entanto, novas evidências científicas sugerem que os neutrófilos apresentam um estado hiperfuncional durante a progressão da doença periodontal, e que essa atividade excessiva seria responsável pela destruição dos tecidos periodontais (Kantarci et al., 2003).

Células mesenquimais indiferenciadas foram previamente reconhecidas em tecidos periodontais, indicando possuírem função significativa na orquestração da homeostase do periodonto (Liu et al., 2010a). Complementarmente, especula-se que as células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal (PDLSC) possam desempenhar papel fundamental no reconhecimento de patógenos periodontais e desencadear sinais necessários para a ativação de células efetoras da imunidade inata, sem um aumento concomitante das respostas inflamatórias.

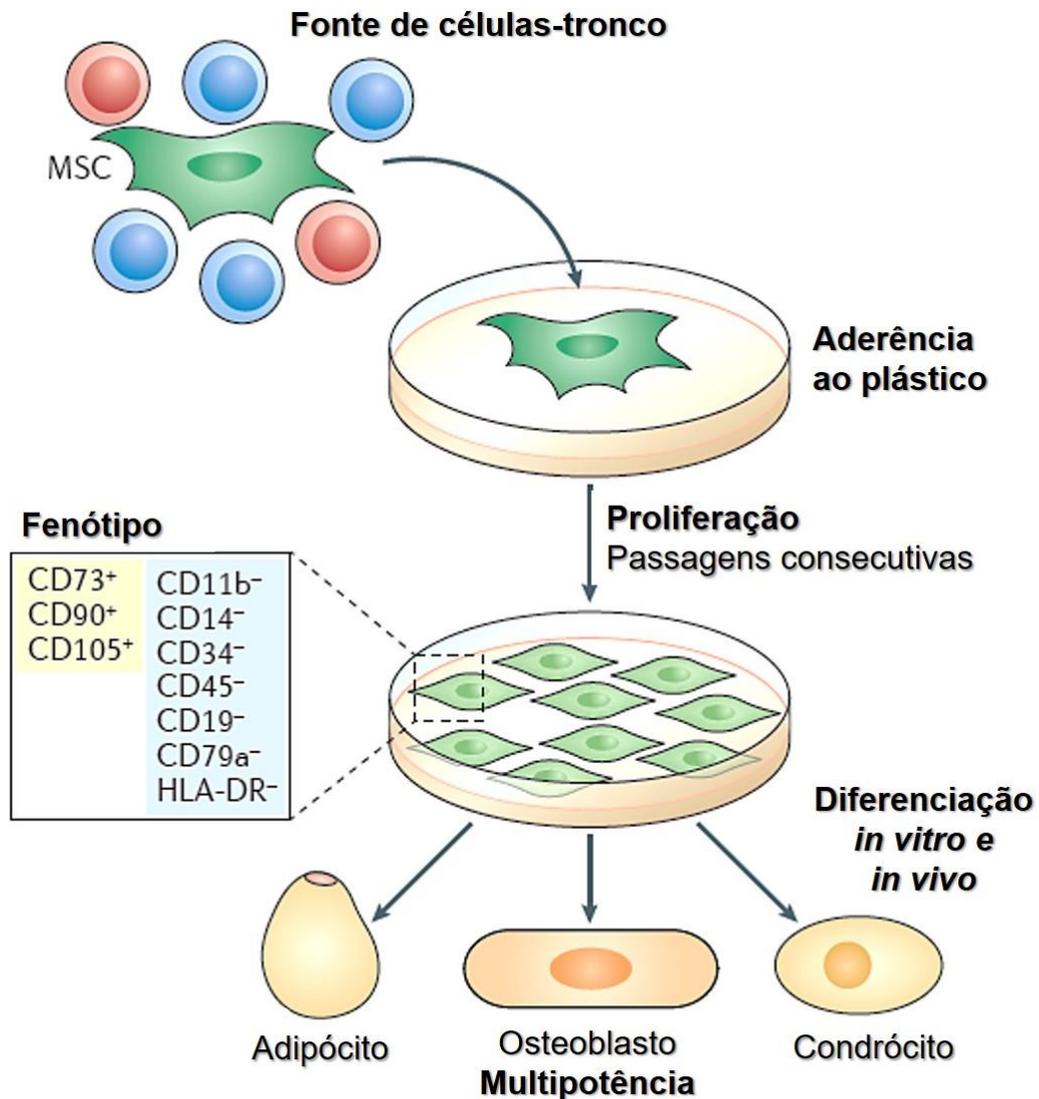
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células mesenquimais indiferenciadas multipotentes

As células-tronco, ou células mesenquimais indiferenciadas multipotentes (MSC), são células progenitoras não hematopoiéticas caracterizadas por duas principais propriedades: (1) a capacidade de se auto renovar e (2) a habilidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares (Wagers; Weissman, 2004).

As MSCs foram primeiramente identificadas por Friedenstein e colaboradores como células auto-renováveis semelhantes a fibroblastos na medula óssea (Friedenstein et al., 1970), sendo inicialmente referidas como células-tronco da medula óssea (BMSCs) e células mesenquimais multipotentes indiferenciadas da medula óssea (BMMSCs). Devido às várias técnicas existentes para isolar, expandir e caracterizar as MSCs, um conjunto mínimo de critérios para identificar essas células foi sugerido pelo Comitê de Células e Tecidos Mesenquimais Indiferenciados da Sociedade Internacional para Terapia Celular (Dominici et al., 2006). Especificamente, as MSCs: (1) devem ser aderentes ao plástico em condições de cultura padrão, (2) expressar ($\geq 95\%$ das células) um determinado padrão de moléculas de superfície tais como, CD73, CD90 e CD105, assim como (3) ausentar ($\leq 2\%$ das células) a expressão das moléculas CD11b e CD14 (marcadores de monócitos e macrófagos), CD34 (marcador celular endotelial e marcador progenitor hematopoiético), CD45 (marcador leucocitário), CD19 ou CD79 α (marcadores de células B), e HLA-DR (Figura 2.1). Essas células se proliferam formando populações de células semelhantes a fibroblastos (*colony-forming-unit fibroblasts*), conseguindo manter seu potencial multipotente por cerca de 30 a 40 divisões celulares. Contudo, sua taxa de crescimento e meia-vida replicativa diminuem com o envelhecimento celular, sendo sua morfologia alongada gradativamente perdida ao longo do tempo em cultura (Dominici et al., 2006). Por fim, MSCs podem se diferenciar em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica.

Figura 2.1 - Fenótipo e critérios funcionais das células mesenquimais indiferenciadas multipotentes (MSC) de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular



Fonte: figura modificada de Le Blanc e Mougiakakos (2012)

Posteriormente, as MSCs também foram identificadas em diversos tecidos além da medula óssea, como tecido adiposo, placenta, cordão umbilical, fluido amniótico, fígado e órgão dentário (Jung et al., 2012; Park et al., 2016). A este respeito, as células-tronco de origem dentária podem ser classificadas de acordo com a estrutura da qual elas são isoladas em: (1) células mesenquimais indiferenciadas derivadas da polpa (DPSCs) (Gronthos et al., 2000), (2) células mesenquimais indiferenciadas derivadas de dentes decíduos esfoliados (SHEDs) (Miura et al., 2003), (3) células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal (PDLSCs) (Seo et al., 2004), (4) células mesenquimais indiferenciadas derivadas da

papila apical (SCAPs) (Guo et al., 2013) e (5) células progenitoras do folículo dentário (DFPCs) (Silvério et al., 2012). Embora todas sejam derivadas de estruturas relacionadas, as características específicas destas distintas populações, como marcadores de expressão e potencial de diferenciação, são ligeiramente diferentes de acordo com a localização da qual foram isoladas (Figura 2.2).

2.1.1 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas da polpa dentária

DPSCs foram as primeiras células mesenquimais indiferenciadas a serem isoladas do elemento dentário, em 2000 (Miura et al. 2003). DPSCs são conhecidas pela capacidade em se diferenciarem em vários tipos de células e tecidos, como osteoblastos, células musculares lisas, células semelhantes a adipócitos, neurônios, dentina, e complexo semelhante a polpa e a dentina (Saito et al., 2015). Elas também demonstram potencial condrogênico *in vitro*. Sua multipotência, taxa de proliferação, disponibilidade e número de células demonstraram ser maiores quando comparadas às BMSCs. Em geral, DPSCs são mais indicadas que BMSCs para a regeneração de tecidos mineralizados (Alge et al., 2010).

2.1.2 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas dentes humanos decíduos esfoliados

SHEDs são células progenitoras isoladas da polpa remanescente de dentes decíduos esfoliados. Curiosamente, estas células apresentam maior taxa de proliferação e maior capacidade de diferenciação do que BMSCs e até maior do que DPSCs em alguns estudos (Miura et al., 2003; Wang et al., 2010). Relatos descrevem a diferenciação de SHEDs em osteoblastos, odontoblastos, adipócitos e neurônios (Wang et al., 2010; Saito et al., 2015).

2.1.3 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal

Apesar do ligamento periodontal ser originado de células da crista neural, as PDLSCs exibem características de células-tronco semelhantes às BMSCs (Chai et al., 2000; Silvério et al., 2010). PDLSCs são capazes de se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos, adipócitos e condrócitos. Relatos *in vivo* demonstram que a diferenciação destas células leva a formação de ligamento periodontal e de tecido semelhante ao cimento (Zhu; Liang, 2015).

Dados relatados na literatura sugerem que, assim como as BMSCs, as PDLSCs possuem propriedades imunossupressoras, diminuindo a proliferação de células mononucleares periféricas do sangue em reação linfocítica alogênica mista (Wada et al., 2009). Outras evidências indicam que as PDLSCs estão possivelmente localizadas na área perivascular, apresentando características morfológicas e fenotípicas semelhantes aos pericitos (Iwasaki et al., 2013).

2.1.4 Células mesenquimais indiferenciadas derivadas da papila apical

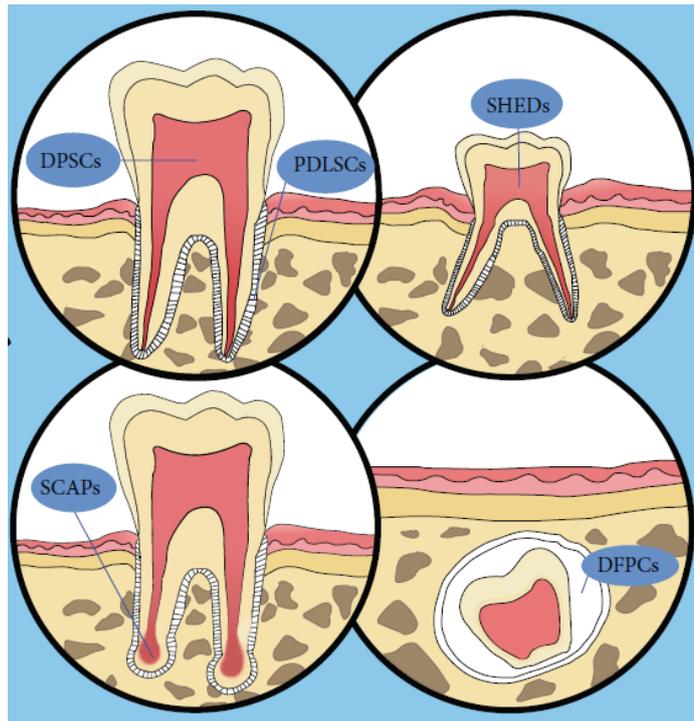
SCAPs são células isoladas do ápice radicular de dentes em desenvolvimento, possivelmente associada à formação de raízes (Guo et al., 2013). Elas apresentam características de MSCs e podem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e neurônios sob condições adequadas (Sedgley; Botero, 2012).

2.1.5 Células progenitoras do folículo dentário

DFPCs são células-tronco extraídas do folículo dentário ao redor do germe dentário nos estágios precoces da formação dos dentes (Silvério et al., 2012). O folículo dental é um condensado de células ectomesenquimais que abriga populações

célulares heterogêneas que compreendem o periodonto. Elas também podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e neurônios (Saito et al., 2015).

Figura 2.2 - Células-tronco derivadas de diferentes estruturas dentárias. DPSC (células mesenquimais indiferenciadas derivadas da polpa dentária), PDLSC (células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal), SHED (células mesenquimais indiferenciadas derivadas dentes humanos decíduos esfoliados), SCAP (Células mesenquimais indiferenciadas derivadas da papila apical), DFPC (células progenitoras do folículo dentário)



Fonte: figura modificada de Park et al. (2016)

Desde a primeira sugestão da utilização das MSCs para uso na medicina regenerativa devido às suas qualidades semelhantes a células-tronco, muitos estudos exploram a aplicação da capacidade multipotente das MSCs na regeneração de diferentes tecidos (Wang et al., 2018). Similarmente, a maioria das pesquisas que empregam células-tronco dentárias foi direcionada para a regeneração parcial ou total de defeitos relacionados à estrutura dentária (Bansal et al., 2015). De fato, os achados de um substancial número de estudos demonstram o aumento do interesse na regeneração da polpa dentária (Nakashima; Iohara, 2011; Tatullo et al., 2015), procedimentos regenerativos que podem mudar o tratamento endodôntico como conhecemos atualmente (Hilkens et al., 2015).

Da mesma forma, a regeneração do complexo periodontal e peri-implantar também tem sido investigado (Zhu e Liang, 2015; Misawa et al., 2016; Tassi et al.,

2017). Embora o uso das MSCs derivadas da medula óssea na regeneração de defeitos periodontais produziu resultados conflitantes, uma série de estudos demonstrou que o uso de PDLSCs promove a regeneração do ligamento periodontal e do cimento radicular em defeitos periodontais (Tassi et al., 2017). Já em defeitos peri-implantares, a maioria dos estudos demonstrou que a aplicação local de MSCs promoveu um efeito positivo na neoformação óssea e osseointegração (Misawa et al., 2016).

2.2 MSCs e o sistema imune

Além da capacidade regenerativa, as MSCs também possuem propriedades imunoreguladoras (Uccelli et al., 2008). A relativa facilidade de enxertia das MSCs, e seu fenótipo estável em cultura *in vitro* tornam essas células uma atrativa ferramenta para terapia de doenças autoimunes, aloimunes e inflamatórias (Le Blanc; Mougiakakos, 2012). Recentemente, um crescente número de pesquisas a este respeito tem surgido na literatura. De acordo com uma revisão publicada por Wang e colaboradores (2018), existem 105 estudos clínicos registrados no banco de dados de estudos clínicos do NIH (Institutos Nacionais de Saúde - EUA) relacionados aos efeitos imunomodulatórios das MSCs (Tabela 2.1). Estudos clínicos e pré-clínicos incluem a utilização de MSCs no tratamento de doenças como GVHD (doença do enxerto versus hospedeiro) (Le Blanc et al., 2004; Le Blanc et al., 2008; Sedgley; Botero, 2012), doença de Crohn (Liechty et al., 2000; Duijvestein et al., 2010; Ciccocioppo et al., 2011; Le Blanc; Mougiakakos, 2012; Ibraheim et al., 2018), esclerose múltipla (Bai et al., 2009; Connick et al., 2011; Connick et al., 2012), diabetes tipo I (Wu; Mahato, 2014; Aikawa et al., 2016) e lúpus eritematoso sistêmico (Wang et al., 2013; Sharma et al., 2017).

Tabela 2.1 - Estudos clínicos utilizando células mesenquimais indiferenciadas registrados no banco de dados de estudos clínicos do NIH até outubro de 2017

Indicação	Número de estudos
Imunomodulação	105
Esclerose múltipla	31
Diabetes tipo I	18
Doença de Chron	22
Lúpus sistêmico	11
Artrite reumatoide	7
HIV	2
Doença periodontal	5
GvHD	41

Fonte: tabela modificada de Wang et al. (2018)

2.3 Neutrófilos e a doença periodontal

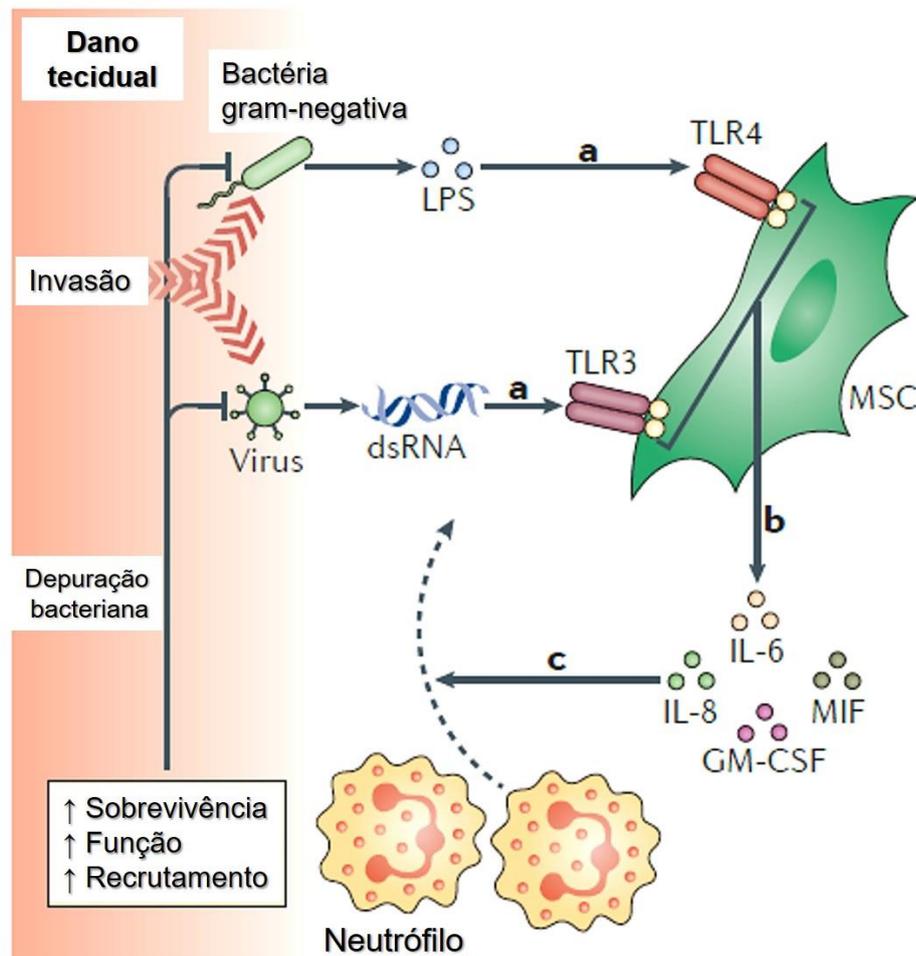
Um desequilíbrio na flora bacteriana é essencial, mas não suficiente, para induzir a destruição periodontal. Neste sentido, a resposta imune do hospedeiro ao desafio bacteriano constitui uma peça chave para estabelecimento e progressão da doença periodontal (Page; Schroeder, 1976). Neutrófilos são as células mais abundantes do sistema imune inato e são os principais facilitadores das respostas antimicrobianas. Eles são geralmente encontrados no sistema circulatório, contudo são capazes de deixar a corrente sanguínea e migrarem de forma rápida, orientada e unidirecional para se acumularem nos sítios de infecção e inflamação. Nestes locais, os neutrófilos exercem atividade antimicrobiana através da fagocitose, da secreção de moléculas bactericidas e das NETs (*neutrophil extracellular traps*). Em conformidade com sua função, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra as infecções periodontais (Page; Schroeder, 1976). Entretanto, embora historicamente os neutrófilos tenham sido considerados simplesmente como células efetoras antimicrobianas, dados mais recentes demonstraram a versatilidade funcional destas células, incluindo sua capacidade de regular a atividade de outros leucócitos (Scapini; Cassatella, 2014; Hajishengallis et al., 2016). Sua relevância nos

processos de manutenção de saúde e etiopatogenia da doença periodontal é ilustrada pela forte associação entre hiper- ou hipoatividade neutrofílica e o desenvolvimento da periodontite severa e generalizada (Hajishengallis; Korostoff, 2017).

As MSCs possuem receptores que possibilitam o reconhecimento de microorganismos e seus fatores de virulência (Ferrand et al., 2011; Qiu et al., 2012). Por conseguinte, essas células secretam citocinas, quimiocinas e outros fatores capazes de recrutar e ativar células do sistema imunológico. Quando ativados por lipopolissacarídeos (LPS) *in vitro*, MSCs isoladas de glândulas parótidas humanas elevaram a produção de interleucina (IL)-6, IL-8 e fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) (Brandau et al., 2010) (Figura 2.3). Complementarmente, há evidência de recrutamento de neutrófilos por BMSCs humanas ativadas por LPS injetados subcutaneamente (Romieu-Mourez et al., 2009).

As MSCs também possuem a capacidade de diminuir a resposta inflamatória das células da imunidade inata. Quando cultivados concomitantemente, MSCs aumentam a expressão neutrofílica de fatores anti-apoptóticos, diminuem a expressão neutrofílica de fatores pró-apoptóticos e reduzem o estresse oxidativo intracelular dos neutrófilos (Raffaghello et al., 2008; Duffy et al. 2011). Portanto, através desses mecanismos, as MSCs poderiam preservar os neutrófilos localizados na medula óssea, permitindo a rápida mobilidade de neutrófilos maduros em resposta a patógenos (Tate et al., 2009). Não está claro, no entanto, se as PDLSCs também possuem a mesma capacidade de atuação e interação com as células imunes durante os desafios infecto-inflamatórios observados nas doenças periodontais.

Figura 2.3 – Interação entre MSCs e neutrófilos durante resposta inflamatória. Moléculas derivadas de patógenos, como RNA *double-stranded* de vírus ou lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, se ligam aos respectivos receptores de reconhecimento de padrões expressos por MSCs (*toll-like receptor* TLR3 para dsRNA e TLR4 para LPS) (a). Em resposta a esse estímulo, MSCs secretam grande número de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como IL-6, IL-8, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) (b). Essas moléculas sustentam e amplificam as funções dos neutrófilos, e o recrutamento de neutrófilos é expandido (c). Ademais, a sobrevivência de ambos os neutrófilos ativados ou dormentes é aumentada



Fonte: figura modificada de Le Blanc e Mougiakakos (2012)

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as respostas das PDLSCs ao extrato proteico total de *P. gingivalis* e avaliar o impacto de mediadores solúveis derivados das PDLSCs na migração, ativação e respostas inflamatórias das células HL-60 diferenciadas em neutrófilos (HL-60D).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Células e meios de cultura

Células mesenquimais indiferenciadas primárias derivadas do ligamento periodontal (PDLSCs) de dentes humanos foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, da Área de Periodontia do Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. PDLSCs (células CD105+ CD34- CD45-) foram obtidas a partir do ligamento periodontal de terceiros molares inclusos indicados para exodontia, de acordo com o protocolo descrito por Silvério et al. (2010). Estas células foram expandidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), 1% l-glutamina (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. PDLSCs foram usadas entre a terceira e a sétima passagem.

Para eliminar variações interpessoais e temporais associadas à utilização de neutrófilos primários, a linhagem celular leucêmica promielocítica humana HL-60 foi adquirida comercialmente (American Type Culture Collection, ATCC, CCL-240, Manassas, VA, USA) e diferenciada em neutrófilos (HL-60D). Células HL-60 foram mantidas em RPMI 1640 (meio Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Clerical, St. Louis, MO, EUA) contendo 10% soro fetal bovino (SBF) (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Para diferenciação, HL-60 foram expostas a 1,25% dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Clerical, St. Louis, MO, EUA) por 6 a 7 dias. A diferenciação de HL-60D (HL-60 diferenciadas) foi confirmada em ensaios de quimioluminescência dependente de luminol. Nestes, a capacidade de HL-60D em responder ao acetato de forbol, miristato (PMA) (Sigma Clerical, St. Louis, MO, EUA) com a produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada. Todos os experimentos

foram conduzidos com culturas de HL-60D comprovadamente diferenciadas e com viabilidade superior a 90%, determinada pelo método de exclusão com azul de tripano.

4.2 Obtenção do extrato total de *Porphyromonas gingivalis*

4.2.1 Cepas e condições de cultivo

P. gingivalis cepa W83 foi adquirida da ATCC (ATCC, BAA-308, Manassas, VA, USA) e usada para o preparo de estoques primários, liofilizados. *P. gingivalis* foram reativadas a 37°C em ambiente anaeróbico (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂), em placas ágar contendo meio Brucella Agar contendo hemina e vitamina K (Sigma, St Louis, MO, EUA) e suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após 72h, colônias isoladas foram transferidas para 25 ml de caldo BHI (infusão cérebro coração) /TSB (caldo trípico de soja) suplementado com 0,5% de extrato de levedura, hemina (5 µg/ml) e vitamina K (1 µg/ml), e na sequência, foram mantidas por 24h. O crescimento bacteriano foi monitorado por meio de leituras de absorbância no comprimento de onda de 550 nanômetros (A_{550nm}).

4.2.2 Coleta e extração proteica total

Após centrifugação da cultura planctônica, o pellet foi acrescido de 700µl de água ultrapura e 0,16g de beads de zircônia de 0,1mm de diâmetro (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, EUA). Em seguida, os microtubos foram agitados em um Mini-BeadBeater em força máxima (3 ciclos de 60 seg com 1 min de descanso em gelo) e centrifugados duas vezes (8min, 4°C, ≈13000g). A concentração proteica do sobrenadante resultante foi dosada pelo reagente de Bradford (Sigma). O extrato homogeneizado foi dividido em alíquotas de uso único e armazenado a -80°C.

4.3 Exposição das PDLSCs ao extrato total de *P. gingivalis* e obtenção de sobrenadantes

A fim de se padronizar as condições experimentais, ensaios piloto utilizaram PDLSCs derivadas de uma única população do ligamento periodontal que foram semeadas em placa de 6-poços a uma concentração de 5×10^5 células/poço e cultivadas em 2ml de DMEM contendo o PgPE (0, 100ng/ml e 2µg/ml) por 3 ou 6 horas (período de exposição), a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Na sequência, os sobrenadantes foram descartados, PDLSCs foram vigorosamente lavadas duas vezes com PBS para a remoção do PgPE e 2ml de DMEM fresco foram adicionados às placas de 6-poços. Em seguida, as PDLSCs foram incubadas por 6, 18 ou 24 horas adicionais (período de secreção). Ao término deste período, os sobrenadantes de secreção foram coletados e armazenados em -80°C até seu uso.

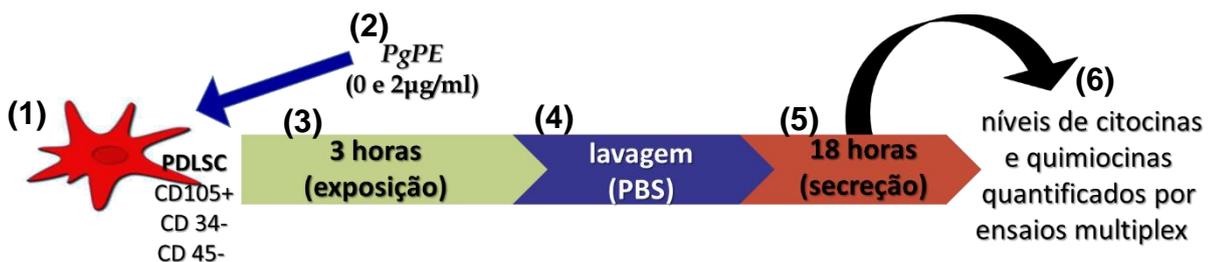
Após o estabelecimento das condições experimentais ideais (concentração de PgPE, horas de exposição e horas de secreção), experimentos foram repetidos para produção de sobrenadantes em larga escala de acordo com as seguintes condições experimentais. PDLSCs derivadas de uma única população do ligamento periodontal que foram semeadas em placa de 6-poços a uma concentração de 5×10^5 células/poço e cultivadas em 2ml de DMEM contendo o PgPE (0 ou 2µg/ml) por 3 horas (período de exposição), a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Na sequência, os sobrenadantes foram descartados, PDLSCs foram vigorosamente lavadas duas vezes com PBS para a remoção do PgPE e 2 ml de DMEM fresco foram adicionados às placas de 6-poços. Em seguida, as PDLSCs foram incubadas por 18 horas adicionais (período de secreção). Ao término deste período, os sobrenadantes de secreção foram coletados e armazenados em -80°C.

4.4 Quantificação de citocinas e quimiocinas secretadas no sobrenadante das culturas PDLSCs

Os sobrenadantes secretados por PDLSCs foram analisados em relação a citocinas pró- e anti-inflamatórias e quimiocinas com o auxílio de kits de ensaio

multiplex (Bio-Rad Life Sciences, Hercules, CA, EUA). Foram quantificados simultaneamente 27 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humanos IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, fator de crescimento de fibroblasto (FGF)-básico, eotaxina, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , proteína induzida pelo IFN- γ (IP-10), proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-BB, RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), fator de necrose tumoral (TNF)- α e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)) e do sistema um sistema de leitura Bio-Plex (Bio-Rad Life Sciences, Hercules, CA, EUA). O protocolo dos ensaios multiplex foi executado de acordo com as instruções do fabricante. Concentrações da amostra (pg/ml) foram determinadas a partir da intensidade média de fluorescência em comparação com uma curva padrão de cinco parâmetros gerada a partir de padrões de concentrações conhecidas. Os dados foram analisados com auxílio do software Bio-Plex Manager, versão 4.1.1 (Bio-Rad Life Sciences, Hercules, CA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes com amostras em sextuplicata.

Figura 4.1 Ilustração dos passos para obtenção do sobrenadante secretado pela cultura de PDLSC



(1) Obtenção de células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal, apresentando marcações positivas para CD 105 e negativas para CD 34 e 45; (2) Adição de 2 µg/ml do PgPE em metade das amostras; (3) Cultura das PDLSCs por 3 horas na presença do PgPE (teste) ou apenas PDLSCs (controle) a 37°C com 5% de CO₂ – período de exposição; (4) Descarte dos sobrenadantes, intensa lavagem das PDLSCs com PBS para a remoção do PgPE e adição de 2 ml de DMEM fresco; (5) Cultura das PDLSCs por 18 horas a 37°C com 5% de CO₂ – período

de secreção ; (6) Coleta dos sobrenadantes, quantificação simultânea de 27 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humanos através de ensaios de multiplex.

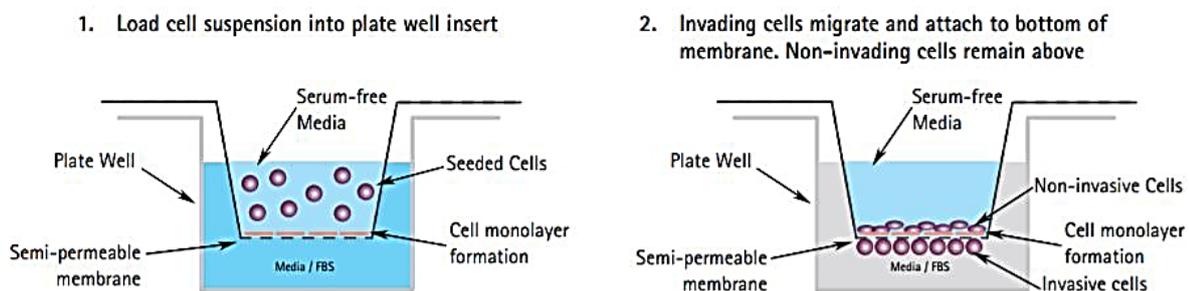
4.5 Expressão de CD-62L e CD18 na superfície de células HL-60D

A caracterização funcional (ativação) de células HL-60D foi avaliada por citometria de fluxo usando anticorpos anti-CD62L (L-selectina), anti-CD18 e controles isotipo (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Sumariamente, 5×10^5 HL-60D suspensas em 500 μ l de DMEM fresco (controle negativo) ou de sobrenadantes derivados de PDLSCs (previamente estimuladas ou não com PgpE) foram incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ por 2h. Na sequência, HL-60D foram centrifugadas a 900g durante 10 minutos e incubadas em 100 μ l de PBS contendo 0 (sem ativação) ou 50 η M de fMLP (formil-metionil-leucil-phenilalanina) (ativação) por 60 ou 120 min a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Esta etapa foi seguida da incubação de HL-60D com anticorpos anti-CD62L e anti-CD18 conjugados aos fluorocromos fluoresceína isoticianato (FITC) e ficoeritrina (PE)-cianina (Cy)-5, respectivamente, por 30 minutos a 4°C e na ausência de luz. Posteriormente, HL-60D foram lavadas com 500 μ l de PBS, centrifugadas a 900g por 10 minutos e suspensos em 1ml de PBS. A caracterização da ativação neutrofílica foi conduzida com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA), através da quantificação da intensidade de fluorescência. Foram coletados 30.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software FlowJo (Tree Star Inc., OR, EUA). O fator de ativação foi calculado dividindo-se a intensidade média de fluorescência em HL-60D pré-incubadas com sobrenadantes de secreção, pela intensidade média de fluorescência em HL-60D pré-incubadas em DMEM fresco (grupo controle), para cada uma das condições experimentais avaliadas. Foram realizados três experimentos independentes com amostras em duplicata.

4.6. Ensaios de quimiotaxia

Ensaio de quimiotaxia foram realizados em Câmaras de Boyden modificadas de 12-poços (placa “Transwell”) (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Nestas, 200µl de suspensão de HL-60D (numa concentração de $2,5 \times 10^6$ células/ml em RPMI1640) foram adicionados ao compartimento superior e 500 µl de sobrenadantes de secreção provenientes de culturas de PDLSCs previamente estimuladas ou não com PgPE foram adicionados ao compartimento inferior, sendo esses dois compartimentos separados por um filtro com poros de 8 µm. DMEM fresco foi usado como controle negativo. Após 1 hora de incubação a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, o compartimento superior foi cuidadosamente removido e os sobrenadantes de secreção de PDLSCs ou meio DMEM fresco (controle negativo) contidos no compartimento inferior foram homogeneizados com o auxílio de uma pipeta. Para cada amostra, uma alíquota de 10ul foi removida do compartimento inferior da Câmara de Boyden modificadas e colocada em uma câmara de Neubauer para a quantificação das células migradas. As células migradas foram quantificadas com o auxílio de um microscópio óptico invertido com objetiva de 20X. O fator de quimiotaxia foi calculado dividindo-se o número de células HL-60D migradas em resposta aos sobrenadantes de secreção pelo número de células HL-60D migradas em resposta ao DMEM fresco (migração ao acaso - grupo controle negativo). Foram realizados quatro experimentos independentes com amostras em duplicata.

Figura 4.2 - Representação de um ensaio de quimiotaxia. A Câmara de Boyden é composta por uma câmara superior, separada da câmara inferior por um filtro contendo poros de 8mm que dificultam, mas não impedem, a passagem de neutrófilos.



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/cellular-assays/cell-migration-invasion-assays.html>

4.7 Explosão respiratória (“burst” oxidativo)

A explosão respiratória foi avaliada pela conversão da molécula não fluorescente dihidrorodamina (DHR-123) (Sigma-Aldrich, St Luis, MO, USA) em rodamina 123, que é altamente fluorescente e detectada por citometria de fluxo. Para este ensaio, 5×10^5 HL-60D foram incubadas por 2 horas em 500 μ l de DMEM fresco (controle negativo) ou em sobrenadantes de secreção provenientes de culturas de PDLSCs.

Na sequência, HL-60D foram centrifugadas a 900g durante 10 minutos, suspensas em PBS e estimulada com phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (0 ou 100nM) (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, EUA) por 30 minutos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, DHR-123 (4,5nM) (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, EUA) foi adicionado as amostras, as quais foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 10 minutos. Após lavagem e ressuspensão em 1ml de PBS, as células foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), foram coletados 30.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software FlowJo (Tree Star Inc., OR, EUA). Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas com amostras em duplicata.

4.8 Resposta inflamatória de HL-60D ao LPS

Para estes ensaios, 5×10^5 HL-60D foram incubadas em uma mistura de 250 μ l de DMEM fresco (controle negativo) ou sobrenadantes de secreção de PDLSCs (grupos testes) e 250 μ l de RPMI 1640 acrescido de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (0 ou 50ng/ml), por 18h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao término do período experimental, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. A quantificação de IL-1 β e TNF- α nestes sobrenadantes foi efetuada com o auxílio de kits de ensaio multiplex e do sistema de leitura Bio-Plex (Bio-Rad Life Sciences, Hercules, CA, EUA), conforme descrito anteriormente. Foram realizados três experimentos independentes com amostras em duplicata.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média ou fator de indução (*fold induction*) acompanhados de desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando Teste T de Student, análise de variância a um critério (ANOVA) seguida de teste post-hoc de Tukey e teste não-paramétrico Wilcoxon/Kruskal-Wallis Rank sum a 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização das condições experimentais da exposição PDLSCs ao extrato total de *P. gingivalis*

Estudos de cinética foram conduzidos para estabelecer: (i) a concentração ideal do PgPE, (ii) a duração da exposição das PDLSCs ao PgPE e (iii) o período de secreção.

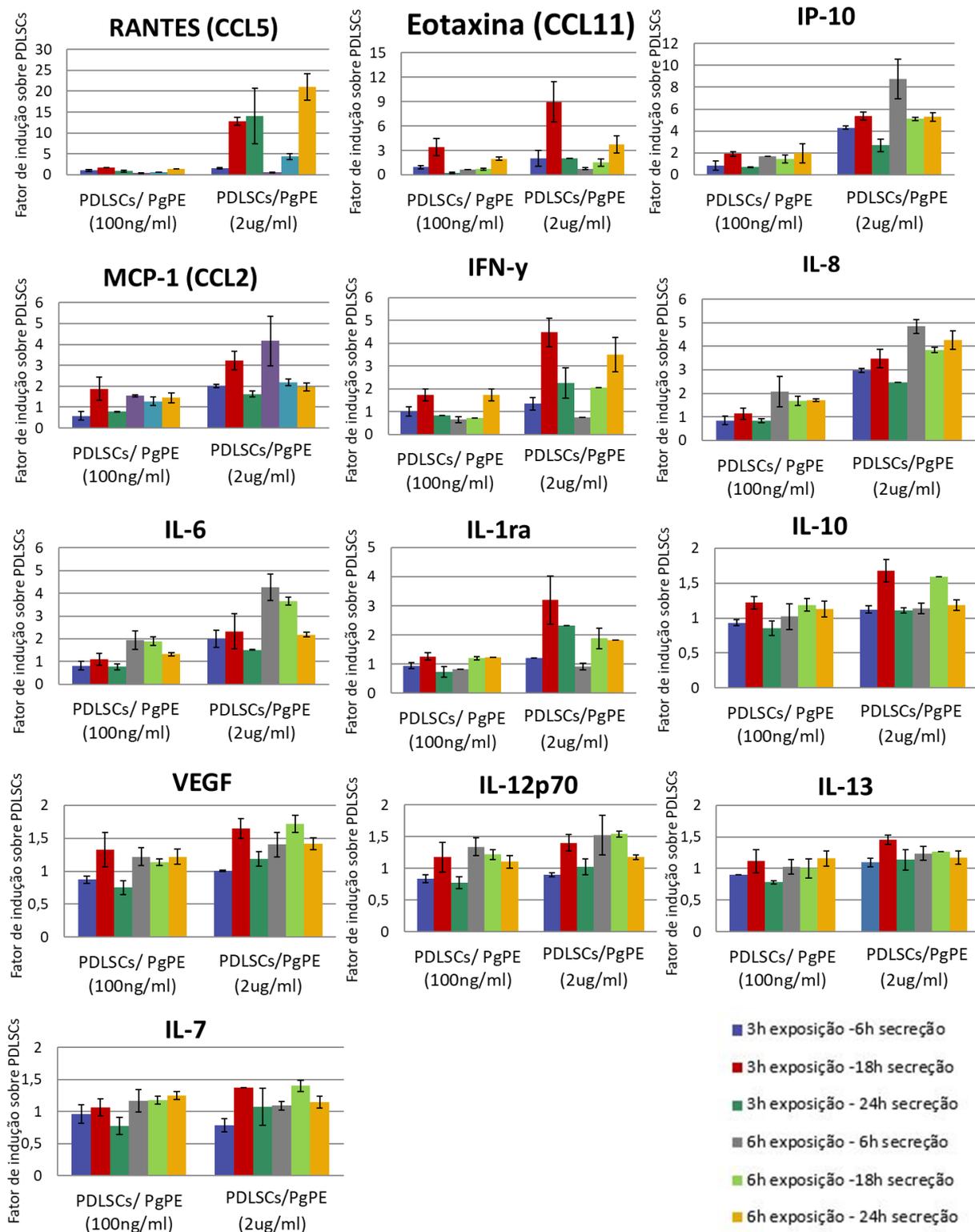
IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-15, IL-17 α , β FGF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-bb e TNF- α não foram detectados nos sobrenadantes de secreção de culturas de PDLSCs, em nenhuma das condições experimentais testadas. Em contraste, VEGF, IL-7, IL-10, e IL-12p70 e IL-13 foram secretados pelas PDLSCs. Porém, os níveis desses mediadores não foram alterados em resposta ao PgPE (Figura 5.1), independentemente da concentração do extrato bacteriano, do período de exposição e do período de secreção avaliados.

De forma geral, o padrão de secreção de culturas de PDLSCs não estimuladas e o de culturas tratadas com PgPE a 100ng/ml foram semelhantes (Figura 5.1). Mais especificamente, em baixa concentração (100ng/ml), o PgPE desencadeou a indução significativa de apenas um único mediador inflamatório (eotaxina) acima dos níveis basais observados nas culturas de PDLSCs não estimuladas, sendo incapaz de provocar a regulação significativa de qualquer outra citocina ou quimiocina. O aumento da secreção da eotaxina em resposta a 100ng/ml do PgPE ocorreu somente nas culturas submetidas a 3 horas de exposição e 18 horas de secreção (Figura 5.1).

Em nítido contraste, o PgPE em concentração de 2 μ g/ml induziu a secreção de níveis mais elevados de RANTES, eotaxina, IP-10, MCP-1, IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-1ra, em comparação aos níveis basais encontrados nos sobrenadantes de PDLSCs não estimuladas (Figura 5.1). Dentre as condições experimentais testadas, o período de exposição de 3 horas seguido por 18 horas de secreção induziu o aumento do maior número de mediadores solúveis, tais como RANTES, eotaxina, IP-10, MCP-1, IFN- γ , IL-8 e IL-1ra.

Com base nestes resultados, nos experimentos subsequentes, PDLSCs foram estimuladas com PgPE em concentração de 2 μ g/ml por 3 horas (período de exposição), seguidas de 18 horas de secreção (período de secreção).

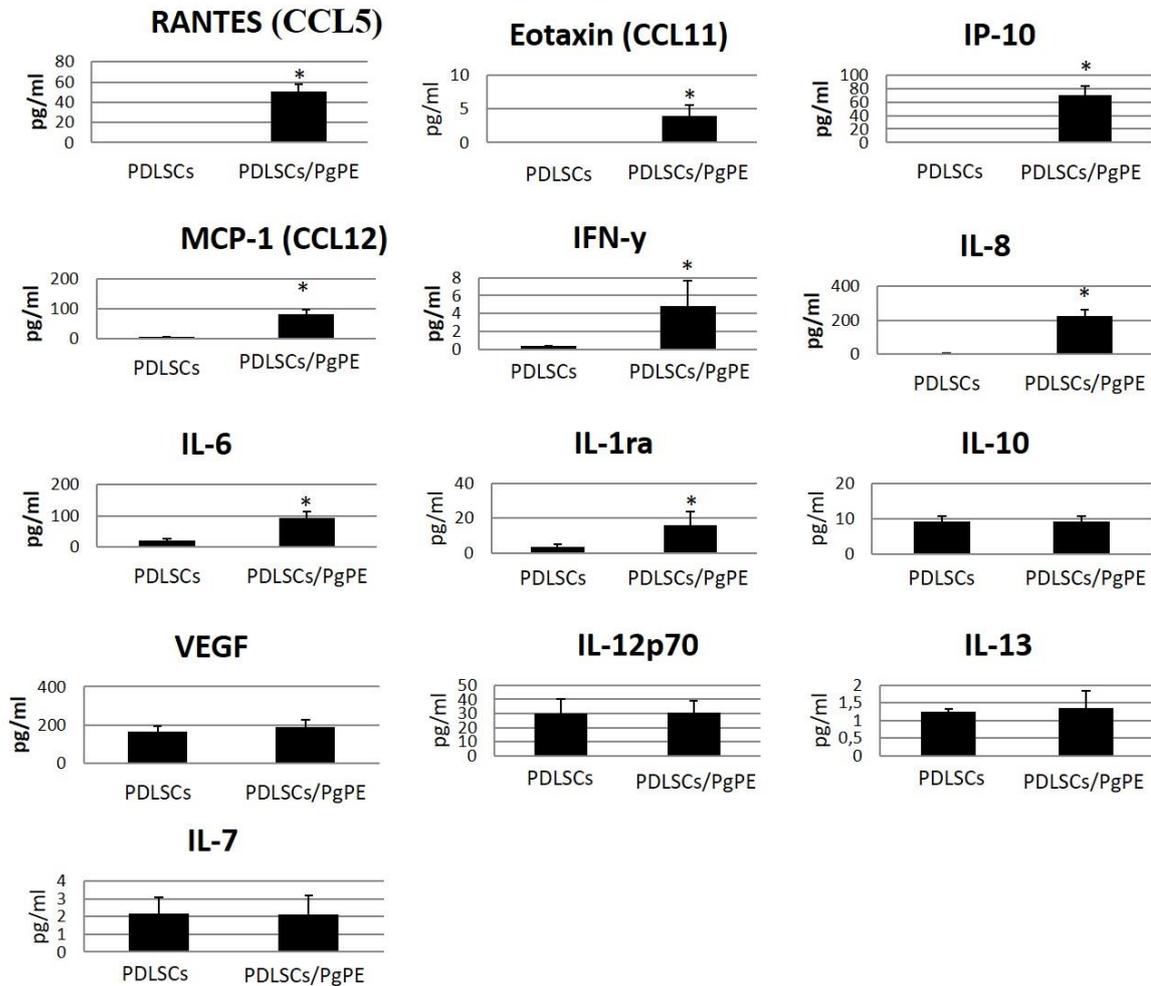
Figura 5.1 - Padronização das condições experimentais. PDLSCs expostas ao PgPE (0, 100ng/ml e 2µg/ml) por 3h ou 6h (período de exposição). Sobrenadantes descartados e PDLSCs mantidas por 6h, 18h ou 24h adicionais (período de secreção) em DMEM fresco. Fator de indução sobre PDLSCs não estimuladas ≥ 3 foi considerado significativo (Villar et al., 2005). Dados representam média e desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos com amostras em duplicata



5.2 Caracterização dos sobrenadantes de PDLSCs utilizados nas análises funcionais das células HL-60D

A análise dos sobrenadantes revelou diferenças qualitativas e quantitativas entre culturas de PDLSCs não estimuladas (controle negativo) e culturas expostas ao PgPE (Figura 5.2). Mais especificamente, RANTES, eotaxina, IP-10 foram detectadas apenas nos sobrenadantes de culturas de PDLSCs expostas a PgPE. Além disso, o PgPE induziu a secreção de níveis mais elevados de MCP-1, IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-1ra em comparação com os níveis basais observados em PDLSCs não estimuladas ($p \leq 0,05$) (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Quantificação de mediadores inflamatórios presentes nos sobrenatantes secretados por PDLSCs expostas ao PgPE, em comparação às PDLSCs não estimuladas. Média e desvio padrão de três experimentos independentes com amostras em sextuplicata (* $p \leq 0,05$; Wilcoxon/ Kruskal Wallis rank)



5.3 Ativação das células HL-60D

Os níveis de CD62L e CD18 permaneceram inalterados em resposta a exposição aos sobrenatantes PDLSCs e PDLSCs/PgPE (Figuras 5.3 e 5.4).

Figura 5.3 - Efeito dos sobrenadantes de PDLSCs na expressão de CD62L na superfície de células HL-60D estimuladas por fMLP. Média e desvio padrão do fator de indução em três experimentos independentes. O fator de ativação foi calculado através da divisão da intensidade média da fluorescência emitida por HL-60D pré-incubadas com sobrenadantes secretados por PDLSCs pela intensidade média da fluorescência emitida por HL-60D pré-incubadas com meio DMEM fresco, para cada uma das condições experimentais avaliadas

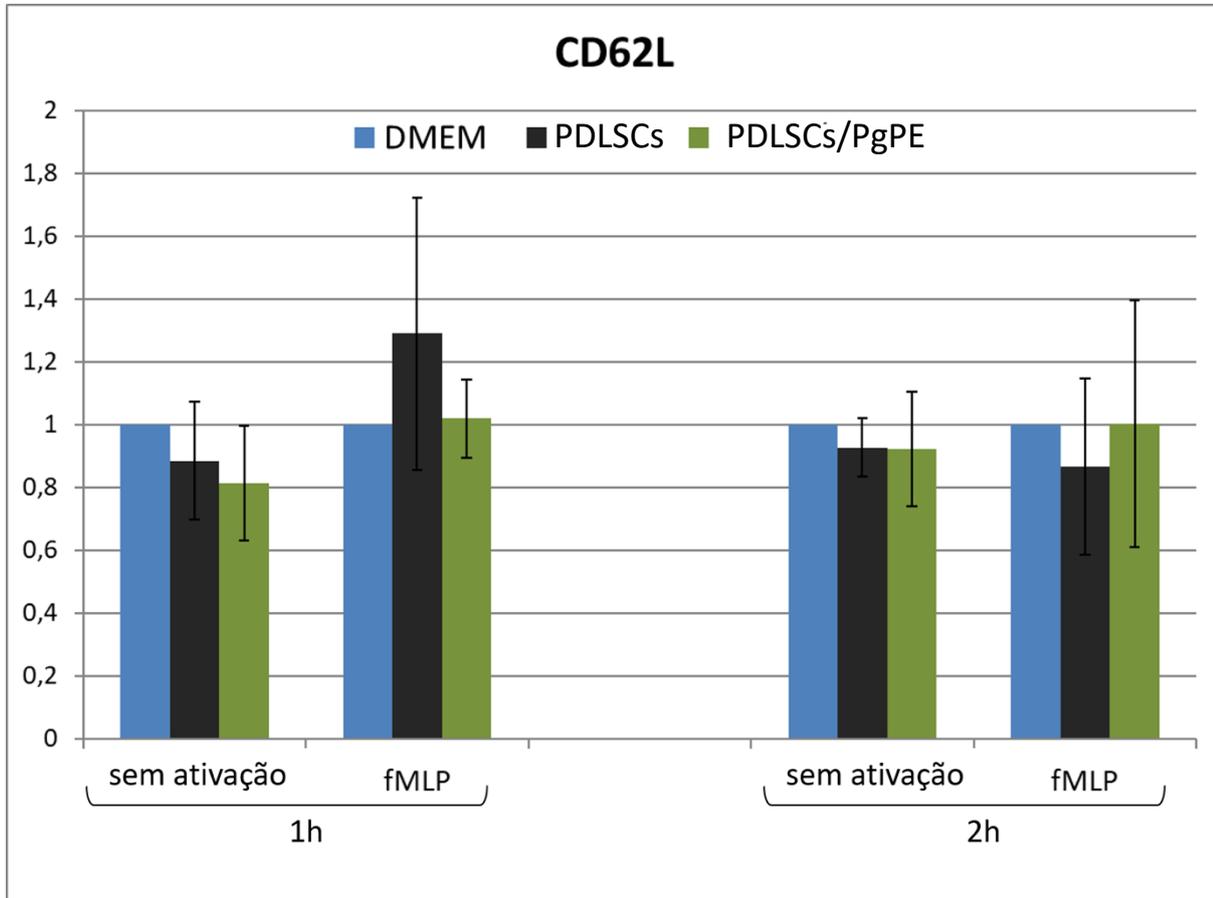
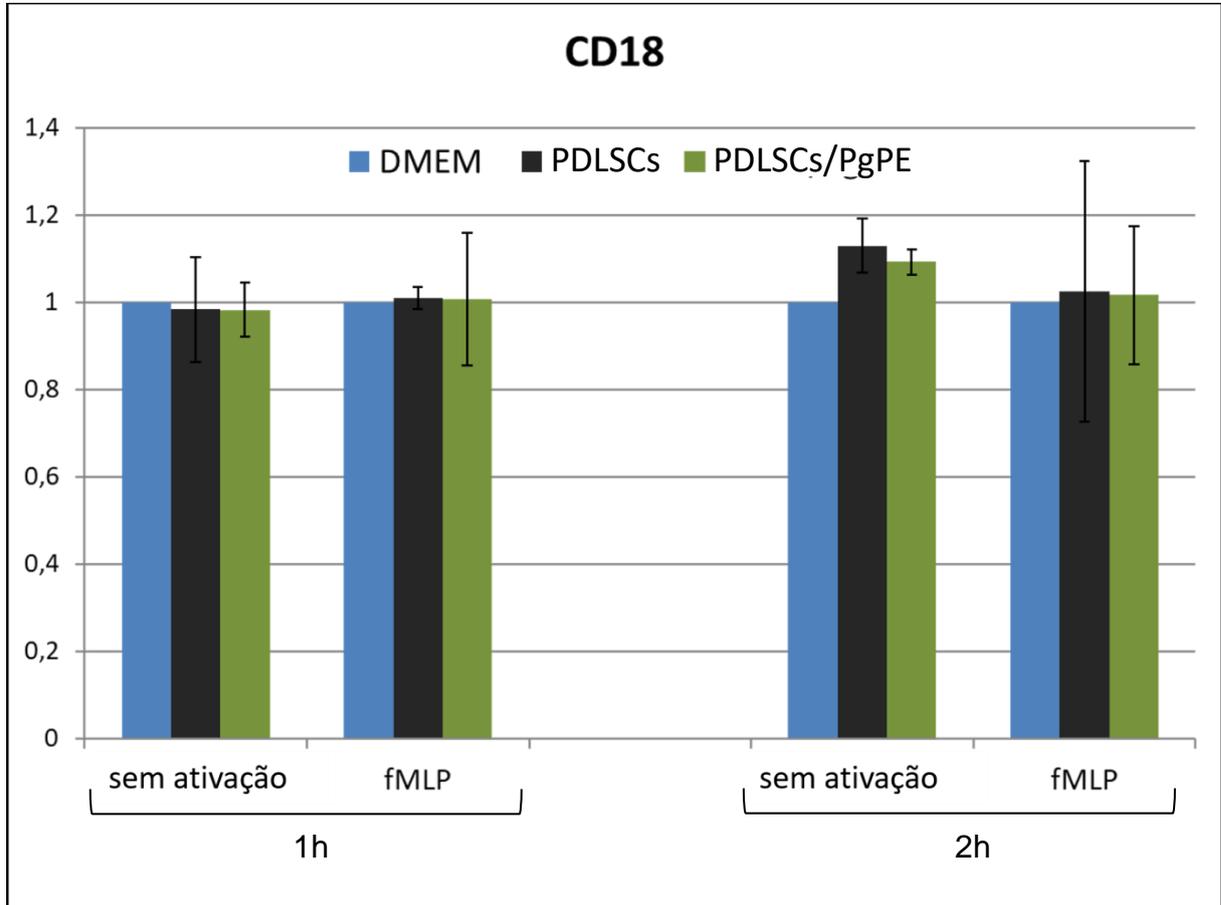


Figura 5.4 - Efeito dos sobrenadantes de PDLSCs na expressão de CD62L na superfície de células HL-18 estimuladas por fMLP. Média e desvio padrão do fator de indução em três experimentos independentes. O fator de ativação foi calculado através da divisão da intensidade média da fluorescência emitida por HL-60D pré-incubadas com os sobrenadantes secretados por PDLSCs pela intensidade média da fluorescência emitida por HL-60D pré-incubadas com meio DMEM fresco, para cada uma das condições experimentais avaliadas

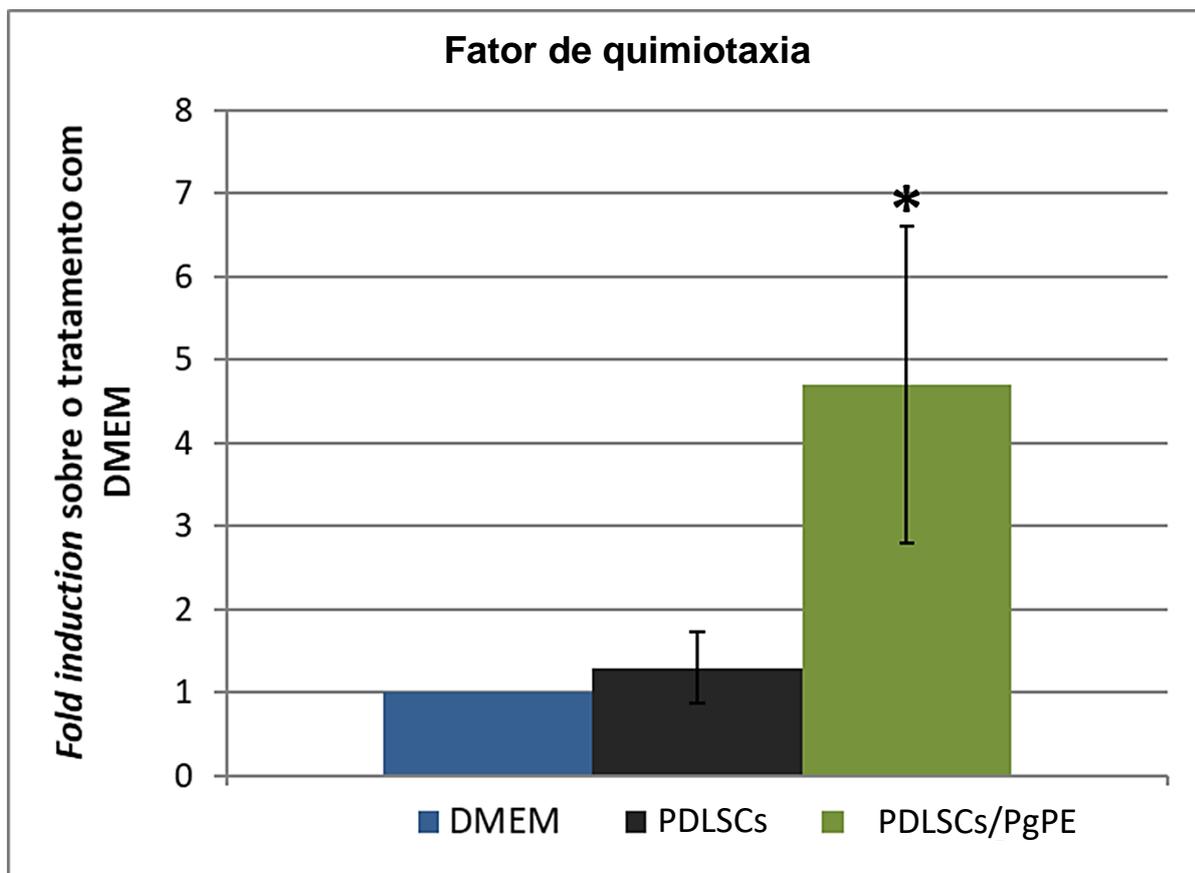


5.4 Ativação funcional das células HL-60D

5.4.1 Quimiotaxia

A capacidade dos sobrenadantes de secreção derivados de PDLSCs em estimular a quimiotaxia de HL-60D foi avaliada. HL-60D responderam aos sobrenadantes de secreção de PDLSCs previamente expostas ao PgPE (2 μ g/ml) com um aumento de 4,7 vezes na taxa de quimiotaxia (Figura 5.5), quando comparado a resposta quimiotática ao DMEM fresco. Em contraste, sobrenadantes derivados de PDLSCs não estimuladas não induziram um aumento na taxa basal de quimiotaxia (Figura 5.5).

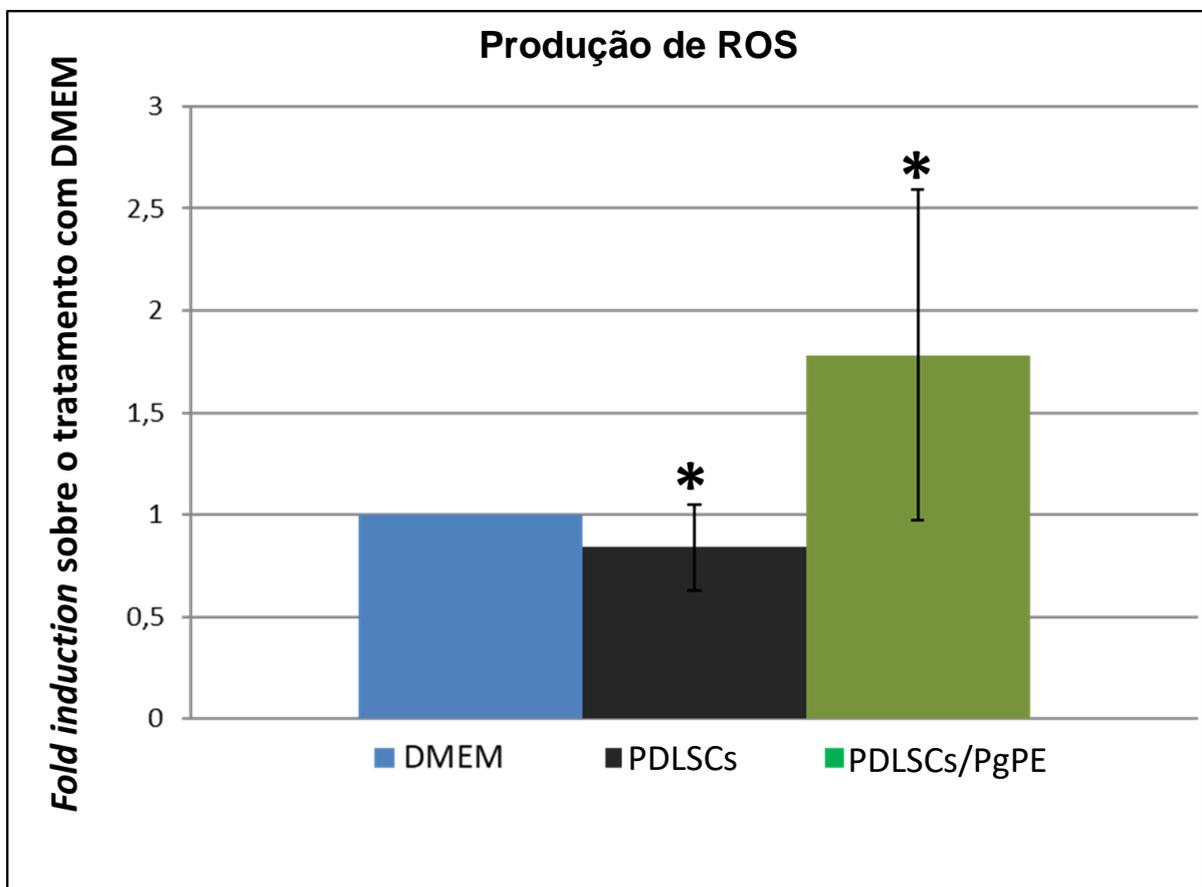
Figura 5.5 - Efeito dos sobrenadantes de PDLSCs na migração de células HL-60D. Média e desvio padrão do fator de quimiotaxia em quatro experimentos independentes com amostras em duplicata (* $p \leq 0,05$; teste T de Student não pareado)



5.4.2 Atividade da NADPH oxidase

Sobrenadantes derivados de PDLSCs incubadas na presença ou na ausência do PgPE não alteraram os níveis basais de explosão respiratória em HL-60D não-estimuladas. Em contrapartida, sobrenadantes derivados de PDLSCs não-estimuladas promoveram uma redução de 16% da produção de radicais livres de oxigênio pelas HL-60D em resposta ao PMA ($p=0,013$) (Figura 5.6). Por outro lado, os sobrenadantes de PDLSCs expostas ao PgPE promoveram um aumento de $1,78\pm 1,04$ vez ($p=0,046$) na produção de radicais livres de oxigênio pelas HL-60D em resposta ao PMA (Figura 5.6).

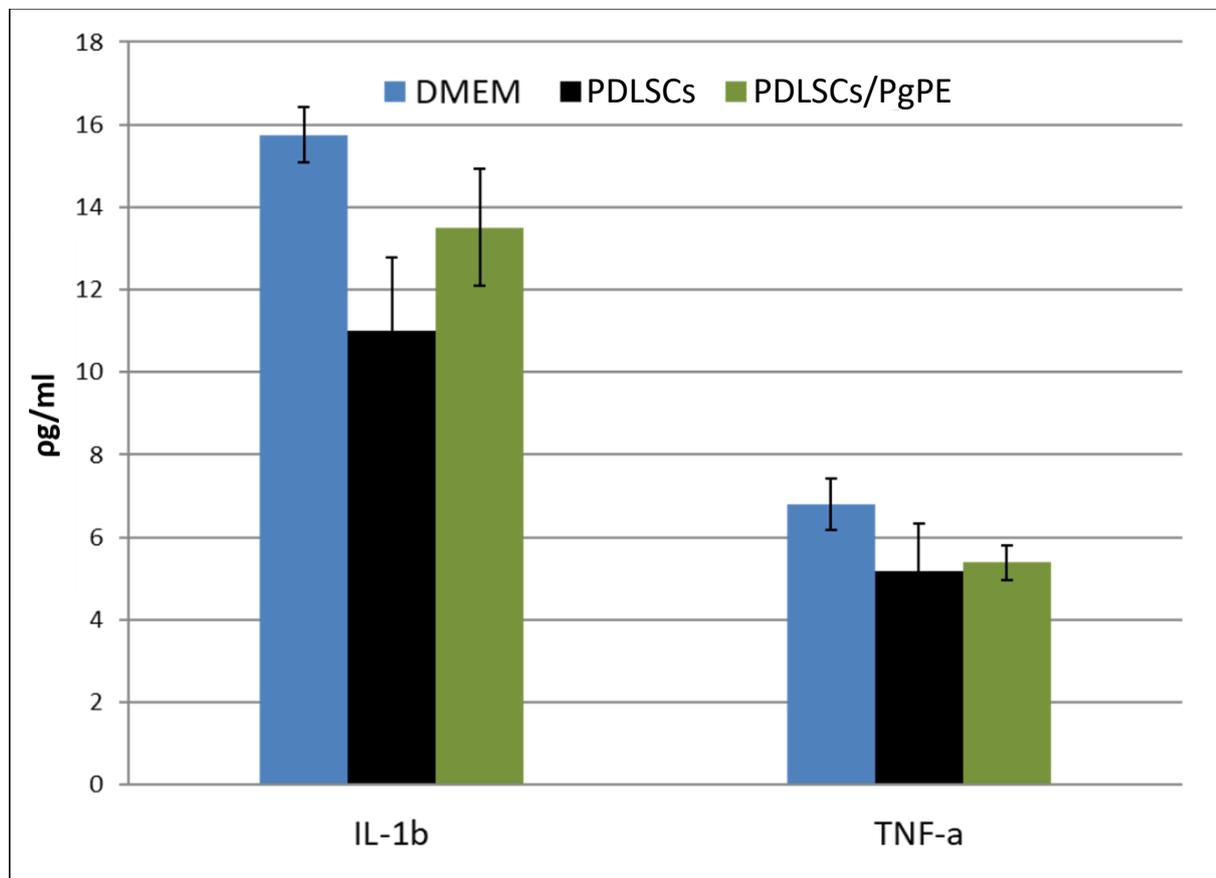
Figura 5.6 - Efeito dos sobrenadantes de PDLSCs na produção de espécies de oxigênio reativo por células HL-60D estimuladas com PMA. Média e desvio padrão de cinco experimentos independentes com amostras em duplicata (* $p \leq 0,05$; ANOVA seguido do teste de Tukey post-hoc, comparado ao controle negativo - DMEM)



5.4.3 Resposta inflamatória

Por fim, foi avaliado o efeito dos sobrenadantes de secreção derivados de PDLSCs na resposta inflamatória de HL-60D ao LPS. Tanto os sobrenadantes derivados de PDLSCs não estimuladas, como os sobrenadantes de PDLSCs expostas PgPE, não interferiram na produção de TNF- α e de IL-1 β pelas células HL-60D em resposta ao LPS (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Efeito dos sobrenadantes de PDLSCs na secreção de IL-1 β e TNF- α por células HL-60D tratadas com LPS. Média e desvio padrão de três experimentos independentes com amostras em duplicata



6 DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstraram que células-tronco mesenquimais indiferenciadas expressam receptores Toll-like (TLR) responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) (Raicevic et al., 2012; Raicevic et al., 2010; Lombardo et al., 2009; Romieu-Mourez et al., 2009; Shi et al., 2007). Dados recentes demonstraram que as PDLSCs respondem ao PgPE com aumentos significativos na expressão gênica de IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Albiero et al., 2017). Em suporte a esses dados, o presente estudo também demonstrou que as proteínas inflamatórias são reguladas positivamente pelo PgPE em PDLSCs. Há muito tempo, *P. gingivalis* tem sido implicada na patogênese da periodontite pela expressão de importantes fatores de virulência que são, em parte, regulados pelo *quórum sensing*, outros patógenos e fatores ambientais locais (temperatura, aerobiose, anaerobiose, condições estático-dinâmicas, pH) que provavelmente diferem entre os indivíduos (Zenobia; Hajishengallis, 2015). O impacto das variações espaço-temporais na expressão de fatores de virulência não pode ser inteiramente recapitulado *in vitro*. Portanto, isso e a falta de uma caracterização precisa dos fatores de virulência encontrados no extrato PgPE constituem uma limitação no presente estudo. Além disso, deve-se reconhecer que a carga de *P. gingivalis* e seus fatores de virulência que atingem e afetam diretamente as funções do PDLSC *in vivo* permanece amplamente desconhecida.

Mais da metade das proteínas secretadas diferencialmente em resposta a PgPE foram quimiocinas, incluindo RANTES, eotaxina, IP10, MCP-1 e IL-8, sugerindo um papel fundamental das PDLSCs no recrutamento de células imunes para os tecidos infectados. Em apoio a essa hipótese, demonstramos que os sobrenadantes de PDLSCs tratadas com PgPE desencadearam o aumento da quimiotaxia de HL-60D. Outros estudos *in vitro* também mostraram que células mesenquimais indiferenciadas estimuladas por LPS induzem a quimiotaxia de neutrófilos via secreção do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) e da IL-8 (Brandau et al., 2010). Em contraste, nossos resultados demonstraram que os sobrenadantes de PDLSCs não tratadas pelo PgPE não tiveram efeito na quimiotaxia de HL-60D, sugerindo que PDLSCs não estimulam o recrutamento de células de vigilância imunológica em locais não infectados.

Os neutrófilos do sangue periférico são atraídos aos tecidos em resposta a estímulos microbianos e/ou produtos inflamatórios induzidos localmente (revisado por Voisin e Nourshargh, 2013). Este processo de migração é iniciado pela marginalização de neutrófilos em direção às paredes dos vasos sanguíneos e subsequente adesão transitória dessas células ao endotélio por moléculas de adesão da família selectina (revisado por Voisin; Nourshargh, 2013). Nesse processo, a L-selectina (CD62L) que é constitutivamente expressa em neutrófilos, liga-se aos receptores CD62P transientemente expressos nas células endoteliais (Smalley; Ley, 2005). Subsequentemente, o CD62L é rapidamente eliminado da superfície das células neutrofílicas para permitir o estabelecimento de uma adesão firme entre as integrinas leucocitárias LFA-1 (CD11a / CD18) e Mac-1 (CD11b / CD18) com as integrinas endoteliais VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) e ICAM-1/2 (molécula de adesão intercelular) (revisado por Voisin; Nourshargh, 2013). Depois disso, os neutrófilos extravasam para o espaço extravascular via diapedese e migram em resposta a gradientes quimiotáticos (revisado por Voisin; Nourshargh, 2013). A expressão de CD18 na superfície de neutrófilos é crítica para o estabelecimento da adesão firme dos neutrófilos ativados ao endotélio vascular e subsequente mobilização destes neutrófilos, dos vasos sanguíneos em direção aos tecidos inflamados (Kolaczowska; Kubes, 2013).

No presente estudo, os sobrenadantes de PDLSCs previamente tratadas com PgPE promoveram o aumento da quimiotaxia de HL-60D sem afetar os níveis de superfície celular de CD62L e CD18. Estes resultados sugerem que os fatores solúveis secretados pelas PDLSCs em resposta a PgPE não favorecem a adesão endotélio-neutrófilo e o extravasamento de neutrófilos, mas influenciam apenas o movimento de leucócitos já extravasados nos tecidos infectados. Nossos resultados estão de acordo com dados recentes que demonstraram que as células mesenquimais indiferenciadas derivadas de aspirados de medula óssea, cordão umbilical e ossos trabeculares não alteram a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (Munir et al., 2016). Uma sequência de eventos de adesão entre leucócitos e células endoteliais é necessária para o extravasamento de leucócitos. Portanto, no futuro, estudos devem investigar o efeito das proteínas solúveis de PDLSCs na expressão de proteínas adesivas em células endoteliais a fim de se revelar por completo o papel das PDLSCs no recrutamento de neutrófilos. Neste sentido, outros trabalhos já demonstraram que, em condições não infecciosas, as BMSCs regulam negativamente

a adesão de neutrófilos em fluxo, inibindo expressão de ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais (Munir et al., 2016).

Este estudo demonstrou que os sobrenadantes de PDLSCs não tratados com PgPE inibiram a produção de ROS por HL-60D ativadas por PMA. Da mesma forma, outros estudos também mostraram que as células indiferenciadas derivadas da medula óssea suprimem a produção de ROS por neutrófilos (Mumaw et al., 2015) e macrófagos (Oh et al., 2014) ativados.

A homeostase tecidual e a regeneração dependem da autorrenovação e do controle da inflamação pela responsividade adaptativa das MSCs (Oh et al., 2016). As MSCs têm uma capacidade única de detectar e controlar negativamente sinais inflamatórios em seu microambiente (Wang et al., 2014). Na ausência de infecção ou outros sinais de perigo exógenos, as MSCs exercem uma variedade de funções regulatórias para promover a resolução da inflamação (Gornostaeva et al., 2016; Ma et al., 2014; Wang et al., 2014; De Miguel et al. 2012). Desequilíbrios homeostáticos caracterizados por atividade excessiva e descontrolada de ROS resultam em dano oxidativo a células e matrizes extracelulares (Bulua et al., 2011; Naik; Dixit, 2011; Circu; Aw, 2010; Vanuchi et al., 1998). O aumento dos níveis de ROS prejudica o funcionamento de células mesenquimais indiferenciadas, pois inibe a proliferação, adesão, disseminação, diferenciação osteogênica e atividade imunomoduladora dessas células (Denu; Hematti, 2016; Song et al., 2010). Além disso, o excesso de ROS pode promover disfunção endotelial, exacerbação de respostas inflamatórias e culminar em lesão tecidual (Zhang et al., 2016; Förstermann et al., 2017; Bozzo et al., 2017; Gerber; Rutter., 2017; Propack et al., 2017). Não surpreendentemente, o estresse oxidativo elevado tem sido associado a um aumento de risco a periodontite (Chapple; Matthews, 2007).

Nesse sentido, é plausível supor que, ao controlar a produção de ROS, as MSCs evitem ataques deletérios de ROS, garantindo i) sua autorrenovação, capacidade de diferenciação e proliferação (Denu; Hematti, 2016); ii) proteção substancial às células e tecidos locais (Denu; Hematti, 2016; Circu; Aw, 2010; Naik; Dixit, 2011); iii) e inflamação local mais baixa. Consequentemente, a capacidade dos PDLSCs de regular negativamente a produção de ROS por células de vigilância imunológica é provavelmente um mecanismo conservador e crítico para a manutenção da homeostasia dos tecidos periodontais na saúde.

Por outro lado, os sobrenadantes de PDLSCs tratados com PgPE amplificaram a produção de ROS por HL-60D ativadas pelo PMA. Da mesma forma, outros estudos demonstraram que as células-tronco derivadas da medula óssea promovem respostas aumentadas de neutrófilos contra *Escherichia coli* (Brandau et al., 2014) e potencializam a produção de ROS em macrófagos ativados por PMA em resposta a *Salmonella enterica* (Vasandan et al., 2016). ROS possuem amplo espectro de atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e, portanto, desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Em conjunto, estes dados indicam que, em contraste com o efeito imunossupressor das PDLSCs nas respostas induzidas por agentes não infecciosos, as PDLSCs potenciam os mecanismos antimicrobianos contra microrganismos patogênicos. No entanto, esse efeito pode não ser totalmente benéfico, pois evidências indicam que o aumento dos níveis de ROS pode desempenhar um papel importante na patologia da periodontite e dos danos teciduais associados (Chapple; Mathews, 2007). Assim, é sensato supor que as PDLSCs atuam como reguladores locais da homeostase, imunidade e inflamação. De acordo com essa hipótese, as PDLSCs locais (i) potencializam a produção de ROS por células imunes inatas em resposta a infecções periodontais, porém (ii) reduzem a geração de ROS por células imunes locais na ausência da infecção para prevenir respostas inflamatórias excessivas e dano tecidual.

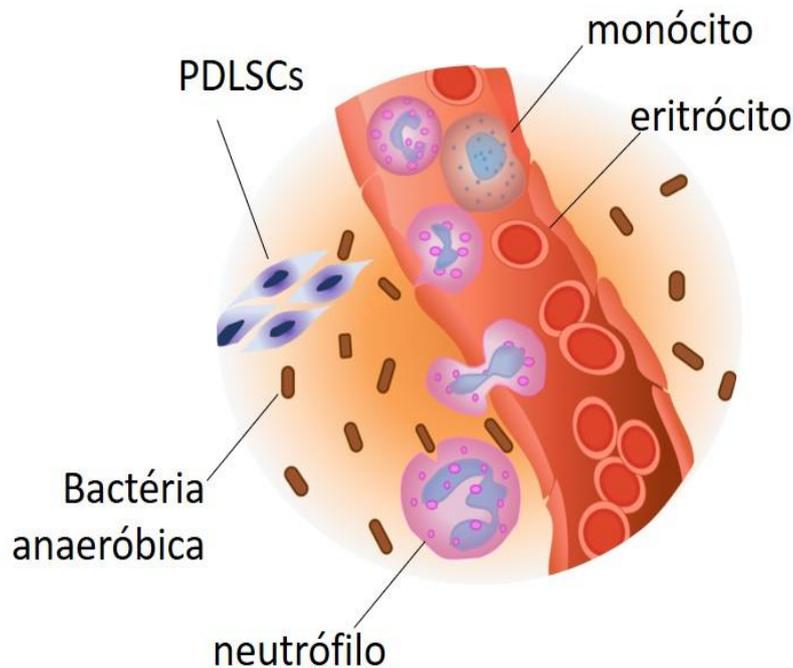
Um crescente corpo de evidências sugere que as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células residentes da mucosa oral e intestinal em resposta à infecção amplificam as respostas pró-inflamatórias de células epiteliais, estromais e células infiltrativas do sistema imunológico (Owens; Simmons, 2013; Dongari-Bagtzoglou; Fidel, 2005). Embora ainda não abordadas com o mesmo detalhe, os neutrófilos podem ser uma fonte significativa de citocinas pró-inflamatórias (Tecchio et al., 2014). Entre as citocinas produzidas por essas células, o TNF- α e a IL-1 β são de particular relevância devido à sua capacidade singular de mediar a perda de inserção conjuntiva, formação de osteoclastos e perda óssea alveolar (Graves; Cochran, 2003). Nosso trabalho mostrou que os sobrenadantes de PDLSC tratados com PgPE continham principalmente quimiocinas e, portanto, não potencializavam a secreção de TNF- α e IL-1 β por HL-60D tratados com LPS. Assim, diferentemente de outras células do estroma, as PDLSCs têm uma notável capacidade de reconhecer antígenos microbianos, aumentar a quimiotaxia de neutrófilos e mecanismos de defesa

antimicrobianos oxidativos, sem amplificar respostas pró-inflamatórias neutrofílicas. Este último, por sua vez, provavelmente limita os danos no tecido periodontal.

Do mesmo modo, os sobrenadantes de PDLSC não tratados com PgPE também falharam na regulação negativa da secreção de TNF- α e IL-1 β por HL-60D tratados com LPS. As MSCs podem induzir ou inibir as respostas imunoinflamatórias, de acordo com a magnitude da inflamação, a força de ativação do sistema imunológico e os tipos de mediadores inflamatórios encontrados (Wang et al., 2014). Nesse cenário, uma possível explicação para nossos achados é que sobrenadantes produzidos por PDLSCs não tratados com PgPE em condições não inflamatórias não continham os imunossuppressores requeridos para a regulação negativa do TNF- α e da IL-1 β em HL-60D.

Enfim, é possível se especular que a capacidade dos sobrenadantes de PDLSCs tratados com PgPE de aumentar os mecanismos antimicrobianos oxidativos neutrofílicos, sem desencadear respostas pró-inflamatórias aumentadas, limita o dano tecidual e favorece subsequente reparo ou regeneração (Figura 6.1). Entretanto, a relevância clínica desses dados necessita ainda ser explorada em estudos futuros.

Figura 6.1 - Ilustração da interação entre as PDLSCs, bactérias anaeróbicas e neutrófilos



Finalmente, deve-se ressaltar que, apesar do grande interesse em desvendar os mecanismos que regulam o comportamento dos neutrófilos humanos, seu uso na pesquisa experimental é limitado por sua curta duração de vida. Para abordar esta questão, células leucêmicas promielocíticas humanas diferenciada em neutrófilos (HL-60D) foram utilizadas no nosso modelo *in vitro*. Apesar das possíveis limitações, o protocolo de diferenciação utilizando DMSO torna as células HL-60 um bom modelo para estudar marcadores de superfície de neutrófilos (Hauert et al., 2002) e comportamentos neutrofilicos como quimiotaxia, fagocitose e *burst* oxidativo (Rincón et al., 2018; Hauert et al., 2002). Curiosamente, evidências recentes demonstraram grande semelhança na expressão gênica global entre células leucêmicas promielocíticas humanas diferenciadas por DMSO (HL-60D) e neutrófilos humanos primários, incluindo um conjunto de genes relacionados a receptores quimioatrativos, genes relacionados à explosão oxidativa, moléculas de adesão e outros genes associados a neutrófilos (Rincón et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, estes achados sugerem um papel importante das PDLSCs no reconhecimento de *P. gingivalis*, no recrutamento de células imunes inatas e na ativação de mecanismos antimicrobianos, sem contudo promover um aumento concomitante nas respostas inflamatórias.

REFERÊNCIAS¹

Albiero ML, Stipp RN, Saito MT, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, et al. Viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament progenitor cells are maintained after incubation with *Porphyromonas gingivalis* protein extract. J Periodontol. 2017 Nov; 88(11): e188-e199. doi: 10.1902/jop.2017.170116.

Alge DL, Zhou D, Adams LL, Wyss BK, Shadday MD, Woods EJ, et al. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. J Tissue Eng Regen Med. 2010 Jan;4(1):73-81. doi: 10.1002/term.220.

Alipour R, Adib M, Masoumi Karimi M, Hashemi-Beni B, Sereshki N. Comparing the immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2013 Aug 28;12(4):331-44.

Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. Glia. 2009 Aug 15;57(11):1192-203. doi: 10.1002/glia.20841.

Bansal R, Jain A, Mittal S. Current overview on challenges in regenerative endodontics. J Conserv Dent. 2015 Jan-Feb;18(1):1-6. doi:10.4103/0972-0707.148861. Review.

Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. PLoS One. 2010 Dec 7; 5(12):e14247. doi: 10.1371/journal.pone.0014247.

Bozzo F, Mirra A, Carrì MT. Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: New perspectives. Neurosci Lett. 2017 Jan 1; 636:3-8. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.065. Epub 2016 May 3. Review.

Brandau S, Jakob M, Bruderek K, Bootz F, Giebel B, Radtke S, et al. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. PLoS One. 2014 Sep 19;9(9): e106903. doi: 10.1371/journal.pone.0106903. eCollection 2014.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, et al. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol.* 2010 Nov;88(5):1005-15. doi: 10.1189/jlb.0410207. Epub 2010 Aug 3.

Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med.* 2011 Mar 14;208(3):519-33. doi: 10.1084/jem.20102049. Epub 2011 Jan 31.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 2000 Apr;127(8):1671-9.

Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 2007; 43:160-232. Review.

Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, et al. Autologous bone marrow derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut.* 2011 Jun;60(6):788-98. doi: 10.1136/gut.2010.214841. Epub 2011 Jan 21.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar 15;48(6):749-62. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022. Epub 2010 Jan 4. Review.

Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 2012 Feb;11(2):150-6. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70305-2. Epub 2012 Jan 10.

Connick P, Kolappan M, Patani R, Scott MA, Crawley C, He XL, et al. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials.* 2011 Mar 2; 12:62. doi: 10.1186/1745-6215-12-62.

De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012 Jun; 12(5): 574-91. Review.

Denu RA, Hematti P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:2989076. doi: 10.1155/2016/2989076. Epub 2016 Jun 16. Review.

Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013:503754. doi:10.1155/2013/503754. Epub 2013 May 23. Review.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315–7.

Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res*. 2005 Nov;84(11):966-77.

Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, et al. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor *Eur J Immunol*. 2011 Oct;41(10):2840-51. doi: 10.1002/eji.201141499. Epub 2011 Aug 30.

Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. Autologous bone marrow derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010 Dec;59(12):1662-9. doi: 10.1136/gut.2010.215152. Epub 2010 Oct 4.

Ferrand J, Lehours P, Schmid-Alliana A, Mégraud F, Varon C. *Helicobacter pylori* infection of gastrointestinal epithelial cells in vitro induces mesenchymal stem cell migration through an NF- κ B-dependent pathway. *PLoS One*. 2011;6(12):e29007. doi: 10.1371/journal.pone.0029007. Epub 2011 Dec 28.

Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):713-35. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326. Review.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.

Gerber PA, Rutter GA. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Apr 1; 26(10):501-18. doi: 10.1089/ars.2016.6755. Epub 2016 Jun 30. Review.

González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2009; 60(4):1006-19.

Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(1):241-8.

Gornostaeva A, Andreeva E, Buravkova L. Factors governing the immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotechnology*. 2016 Aug;68(4):565-77. doi: 10.1007/s10616-015-9906-5.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91. doi: 10.1902/jop.2008.080183. Review.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):391-401.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Guo L, Li J, Qiao X, Yu M, Tang W, Wang H, et al. Comparison of odontogenic differentiation of human dental follicle cells and human dental papilla cells. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4):e62332. doi: 10.1371/journal.pone.0062332.

Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1):116-151. doi: 10.1111/prd.12181. Review.

Hajishengallis G, Moutsopoulos NM, Hajishengallis E, Chavakis T. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Semin Immunol*. 2016 Apr;28(2):146-58. doi: 10.1016/j.smim.2016.02.002. Epub 2016 Feb 28. Review.

Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Jul;34(7):838-54.

Hilkens P, Meschi N, Lambrechts P, Bronckaers A, and Lambrechts I. Dental stem cells in pulp regeneration: near future or long road ahead? *Stem Cells Dev.* 2015 Jul 15;24(14):1610-22. doi: 10.1089/scd.2014.0510. Epub 2015 May 20. Review.

Ibraheim H, Giacomini C, Kassam Z, Dazzi F, Powell N. Advances in mesenchymal stromal cell therapy in the management of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Feb;12(2):141-153. doi: 10.1080/17474124.2018.1393332. Epub 2017 Nov 2.

Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, et al. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol.* 2013 Oct;84(10):1425-33. doi: 10.1902/jop.2012.120547. Epub 2012 Dec 14.

Jung Y, Bauer G, Nolte JA. Concise review: induced pluripotent stem cell-derived. *Stem Cells.* 2012 Jan;30(1):42-7. doi: 10.1002/stem.727. Review.

Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2003 Jan;74(1):66-75. Review.

Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 2009 Dec;37(12):1445-53. doi: 10.1016/j.exphem.2009.09.004. Epub 2009 Sep 20.

Kolaczowska E, Kuberski P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399. Review.

Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008 May 10;371(9624):1579-86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X.

Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr; 12(5):383-96. doi: 10.1038/nri3209. Review.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May; 363(9419):1439-41.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000 Nov; 6(11):1282-6.

Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000. 2010(a) Feb; 52(1):163-206. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00321.x. Review.

Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010(b);12(6): R210. doi: 10.1186/ar3187. Epub 2010 Nov 16.

Lombardo E, Dela Rosa O, Mancheño-Corvo P, Menta R, Ramírez C, Büscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A*. 2009 Jul; 15(7):1579-89. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0340.

Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Feb;21(2):216-25. doi: 10.1038/cdd.2013.158.

Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010 Feb 16;5(2):e9252. doi: 10.1371/journal.pone.0009252.

Misawa MYO, Huynh-Ba G, Villar GM, Villar CC. Efficacy of stem cells on the healing of peri-implant defects: systematic review of preclinical studies. *Clin Exp Dent Res*. 2016 Feb 4;2(1):18-34. doi: 10.1002/cre2.16.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25.

Mumaw JL, Schmiedt CW, Breidling S, Sigmund A, Norton NA, Thoreson M, et al. Feline mesenchymal stem cells and supernatant inhibit reactive oxygen species production in cultured feline neutrophils. *Res Vet Sci*. 2015 Dec; 103:60-9. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.09.010. Epub 2015 Sep 14.

Munir H, Luu NT, Clarke LS, Nash GB, McGettrick HM. Comparative ability of mesenchymal stromal cells from different tissues to limit neutrophil recruitment to

inflamed endothelium. PLoS One. 2016 May 12;11(5):e0155161. doi: 10.1371/journal.pone.0155161. eCollection 2016.

Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. J Exp Med. 2011 Mar 14;208(3):417-20. doi: 10.1084/jem.20110367. Epub 2011 Feb 28. Review.

Nakashima M, Iohara K. Regeneration of dental pulp by stem cells. Adv Dent Res. 2011 Jul;23(3):313-9. doi: 10.1177/0022034511405323.

Oh JY, Ko JH, Lee HJ, Yu JM, Choi H, Kim MK, et al. Mesenchymal stem/stromal cells inhibit the NLRP3 inflammasome by decreasing mitochondrial reactive oxygen species. Stem Cells. 2014 Jun;32(6):1553-63. doi:10.1002/stem.1608.

Owens BM, Simmons A. Intestinal stromal cells in mucosal immunity and homeostasis. Mucosal Immunol. 2013 Mar;6(2):224-34. doi: 10.1038/mi.2012.125.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest. 1976 Mar;34(3):235-49. Review.

Park YJ, Cha S, Park YS. Regenerative applications using tooth derived stem cells in other than tooth regeneration: a literature review. Stem Cells Int. 2016; 2016: 9305986. doi: 10.1155/2016/9305986. Epub 2015 Dec 20. Review.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. Trends Pharmacol Sci. 2017 Jul;38(7):592-607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005. Epub 2017 May 24. Review.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997 Apr 4;276(5309):71-4. Review.

Qiu Y, Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord blood migrate in response to complement C1q. Cytotherapy. 2012 Mar;14(3):285-95. doi: 10.3109/14653249.2011.651532. Epub 2012 Jan 23.

Raffaghella L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan; 26(1): 151-62. Epub 2007 Oct 11.

Raicevic G, Najar M, Pieters K, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jul;18(13-14):1410-8. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0434. Epub 2012 Apr 25.

Raicevic G, Rouas R, Najar M, Stordeur P, Boufker HI, Bron D, et al. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum Immunol*. 2010 Mar;71(3):235-44. doi: 10.1016/j.humimm.2009.12.005. Epub 2010 Jan 6.

Rincón E, Rocha-Gregg BL, Collins SR. A map of gene expression in neutrophil-like cell lines. *BMC Genomics*. 2018 Aug 1;19(1):573. doi:10.1186/s12864-018-4957-6.

Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol*. 2009 Jun 15;182(12):7963-73. doi: 10.4049/jimmunol.0803864.

Saito MT, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Tooth-derived stem cells: update and perspectives. *World J Stem Cells*. 2015 Mar 26;7(2):399-407. doi:10.4252/wjsc.v7.i2.399. Review.

Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014 Jul 31;124(5):710-9. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217. Epub 2014 Jun 12. Review.

Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):549-61. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.004. Epub 2012 Jun 23. Review.

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

Sharma J, Hampton JM, Valiente GR, Wada T, Steigelman H, Young MC, et al. Therapeutic development of mesenchymal stem cells or their extracellular vesicles to

inhibit autoimmune-mediated inflammatory processes in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2017 May 10; 8:526. doi: 10.3389/fimmu.2017.00526. eCollection 2017. Review.

Shi L, Wang JS, Liu XM, Hu XY, Fang Q. Upregulated functional expression of Toll like receptor 4 in mesenchymal stem cells induced by lipopolysaccharide. *Chin Med J (Engl).* 2007 Oct 5; 120(19):1685-8.

Silvério KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH Jr, et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontal Res.* 2012 Jun;47(3):309-19. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01433.x. Epub 2011 Dec 11.

Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol.* 2010 Aug;81(8):1207-15. doi: 10.1902/jop.2010.090729.

Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 2005 Apr-Jun;9(2):255-66. Review.

Song H, Cha MJ, Song BW, Kim IK, Chang W, Lim S, et al. Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex. *Stem Cells.* 2010 Mar 31;28(3):555-63. doi: 10.1002/stem.302.

Tassi SA, Sergio NZ, Misawa MYO, Villar CC. Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: Systematic review of pre-clinical studies. *J Periodontal Res.* 2017 Oct;52(5):793-812. doi: 10.1111/jre.12455. Epub 2017 Apr 10. Review.

Tate MD, Deng YM, Jones JE, Anderson GP, Brooks AG, Reading PC. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7441-50. doi: 10.4049/jimmunol.0902497. Epub 2009 Nov 16.

Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Nov;9(11):1205-16. doi: 10.1002/term.1899. Epub 2014 May 21. Review.

Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts

beyond expression. *Front Immunol.* 2014 Oct 21;5:508. doi:10.3389/fimmu.2014.00508.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726-36. doi: 10.1038/nri2395. Review.

Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 1994:19-27.

Vanucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MVM, Bernardes MM, Jordão-Jr AA. Role of nutrients in lipid peroxidation and in the antioxidant defense system (in Portuguese). *Medicina, Ribeirão Preto* 1998; 31:31-44.

Vasandan AB, Jahnavi S, Shashank C, Prasad P, Kumar A, Prasanna SJ. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep.* 2016 Dec 2;6:38308. doi: 10.1038/srep38308.

Vasandan AB, Shankar SR, Prasad P, Jahnavi VS, Bhonde RR, Prasanna SJ. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *J Cell Mol Med.* 2014 Feb;18(2):344-54. doi: 10.1111/jcmm.12192. Epub 2014 Jan 3.

Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4588-95.

Voisin MB, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun.* 2013;5(4):336-47. doi: 10.1159/000346659. Epub 2013 Mar 2. Review.

Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol.* 2009 Jun;219(3):667-76. doi: 10.1002/jcp.21710.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004 Mar 5;116(5):639-48. Review.

Wang D, Zhang H, Liang J, Li X, Feng X, Wang H, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4

years of experience. *Cell Transplant*. 2013;22(12):2267-77. doi: 10.3727/096368911X582769c.

Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*. 2010 Sep;19(9):1375-83. doi: 10.1089/scd.2009.0258.

Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. *Stem Cells Int*. 2018 Jun 14; 2018:3057624. doi:10.1155/2018/3057624. eCollection 2018. Review.

Wang S, Zhu R, Li H, Li J, Han Q, Zhao RC. Mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Front Med*. 2018; 30:[Epub ahead of print]

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014; 15:1009-1016.

Wu H, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy for type 1 diabetes. *Discov Med*. 2014 Mar;17(93):139-43. Review.

Yeung TY, Seeberger KL, Kin T, Adesida A, Jomha N, Shapiro AM, et al. Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2012;7(5):e38189. doi: 10.1371/journal.pone.0038189. Epub 2012 May 30.

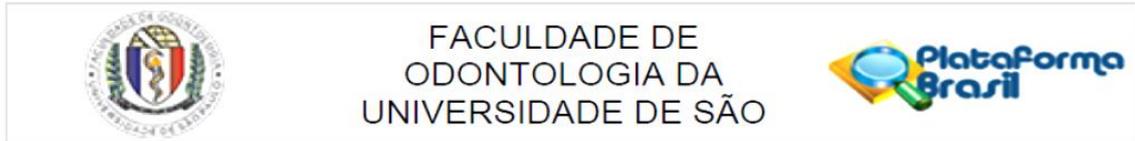
Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. 2015;6(3):236-43. doi: 10.1080/21505594.2014.999567. Review.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 4350965. doi: 10.1155/2016/4350965. Epub 2016 Feb 22. Review.

Zhou B, Yuan J, Zhou Y, Ghawji M Jr, Deng YP, Lee AJ, et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. *Clin Immunol*. 2011 Dec;141(3):328-37. doi: 10.1016/j.clim.2011.08.014. Epub 2011 Sep 2.

Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 972313. doi: 10.1155/2015/972313. Epub 2015 Mar 16. Review.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do efeito imunomodulatório das células mesenquimais indiferenciadas na resposta inflamatória a infecção.

Pesquisador: Cristina Cunha Villar

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56433016.7.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.664.753

Apresentação do Projeto:

A doença periodontal é uma patologia de origem infecto-inflamatória que acomete os tecidos de suporte dos dentes e é uma das maiores responsáveis pela perda dental. A doença é desencadeada predominantemente por fatores de virulência produzidos por bactérias anaeróbias gram-negativas, entre elas a *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), os quais medeiam a destruição dos tecidos periodontais, portanto entender mecanismos biológicos referentes à infecção presente na doença periodontal é de extrema relevância.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral deste trabalho será caracterizar a resposta inflamatória das células mesenquimais indiferenciadas ao extrato da *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e o impacto dos mediadores solúveis produzidos pelas células mesenquimais indiferenciadas na ativação e resposta inflamatória dos neutrófilos.

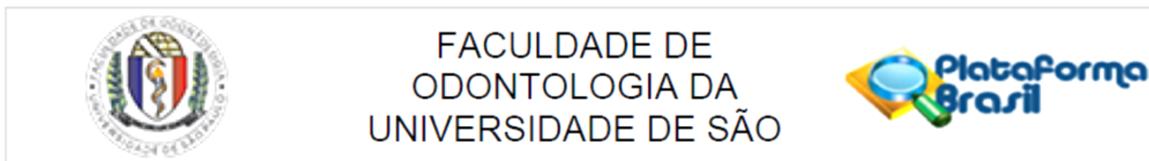
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto prevê:

Riscos:

Os riscos para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa na Faculdade de Odontologia da USP serão mínimos, considerando que apenas células

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



Continuação do Parecer: 1.664.753

humanas comercializadas e sobrenadantes de células mesenquimais indiferenciadas primárias obtidos na Faculdade de Odontologia de Piracicaba serão envolvidas.

Benefícios:

Os voluntários se beneficiarão em contribuir para o avanço do conhecimento e possível desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença periodontal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com grande potencial para contribuir com a área de periodontia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequadamente apresentados:

Carta do biobanco da FP; Folha de rosto, projeto e cronograma detalhado.

Recomendações:

Todas as recomendações solicitadas no parecer anterior foram atendidas. Lembrando aos pesquisadores que tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_689054.pdf	11/07/2016 16:49:02		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoComCronograma.pdf	11/07/2016 16:48:19	Cristina Cunha Villar	Aceito
Outros	Biobanco_FOP.pdf	24/05/2016 18:39:26	Cristina Cunha Villar	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

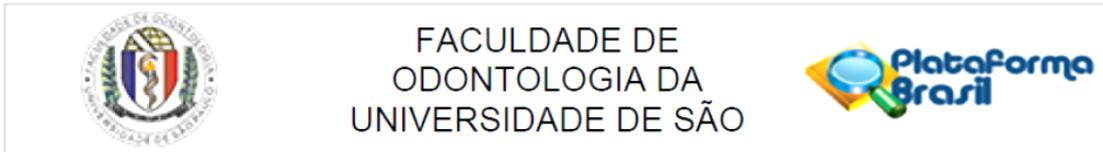
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 1.664.753

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	19/04/2016 18:03:38	Cristina Cunha Villar	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