

EMANUEL DA SILVA ROVAI

**Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre as
atividades osteogênica e cementogênica de células mesenquimais do
ligamento periodontal**

São Paulo

2018

EMANUEL DA SILVA ROVAI

Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre as atividades osteogênica e cementogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Renata Sipert

São Paulo

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 da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rovai, Emanuel da Silva.

Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre as atividades osteogênica e cementogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal / Emanuel da Silva Rovai ; orientador Marinella Holzhausen Caldeira; coorientador Carla Renata Sipert. -- São Paulo, 2018.

101 p. : fig., tab., graf. ; 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. Regeneração periodontal. 2. Células de ligamento periodontal. 3. Potencial osteogênico. 4. Receptor do tipo 1 ativado por protease. 5. Trombina. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Sipert, Carla Renata. III. Título.

Rovai ES. Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre as atividades osteogênica e cementogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 17/09/2018

Banca Examinadora

Prof(a). Andrea Carvalho de Marco

Instituição: Universidade Estadual Paulista Julgamento: Aprovado

Prof(a). Márcia Martins Marques

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Prof(a). Cristina Cunha Villar

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Fernando e Roseli**,

Que sempre me incentivaram a estudar e buscar meus objetivos. Com vocês aprendi os valores da família, tudo o que sou hoje é graças a vocês.

À **Mariana**,

Uma verdadeira companheira que Deus me deu. Obrigado por todo amor, amizade, companheirismo e paciência durante todo este meu trajeto.

Aos meus irmãos **Tiago, Felipe e Rebeca**,

Verdadeiros amigos com quem compartilho minhas melhores lembranças.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira**, quem primeiramente idealizou este projeto. Obrigado por sempre ter acreditado em mim, me ensinando e me guiando durante toda minha trajetória do doutorado. Não há palavras que possam descrever toda a minha gratidão pela senhora.

A minha coorientadora **Profa. Dra. Carla Renata Sipert**, quem me ensinou diversas técnicas laboratoriais, tornando possível a realização deste projeto. Obrigado pelos ensinamentos, paciência e por toda a sua disposição em me ajudar.

Ao **Prof. Dr. Alpdogan Kantarci**, meu orientador no exterior, que me recebeu de portas abertas no Instituto Forsyth, tornando possível vivenciar uma experiência incrível, a qual me ajudou a desenvolver ainda mais como pessoa e pesquisador.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, por ter me aberto as portas da pós-graduação da FOUSP. Obrigado também por todos os ensinamentos e parcerias na área de periodontia e revisões sistemáticas.

À **Profa. Dra. Luciana Saraiva**, um exemplo de dedicação e determinação na docência. Obrigado por todos os ensinamentos e por toda a paciência no laboratório. Obrigado também pela ótima convivência.

À **Profa. Dra. Cristina Cunha Villar**, professora qual eu admiro muito. Sempre de bom humor e disposta a me ajudar, obrigado por tudo.

Aos professores da disciplina de periodontia da FOUSP **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, **Prof. Dr. Giorgio de Micheli**, **Profa. Dra. Marina Clemente Conde**, **Prof. Dr. Marco Antonio Paupério Georgetti**, **Prof. Dr. João Batista César Neto**, por toda colaboração na minha formação acadêmica.

Aos professores da disciplina de periodontia do ICT-UNESP por toda colaboração na minha formação, em especial ao **Prof. Dr. Warley David Kerbauy**, um grande

amigo que me ensinou muito e me inspirou a seguir seus passos na periodontia. À **Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco** por todos os ensinamentos e por ter me dado conselhos tão preciosos quando precisei.

Aos amigos e colegas **Bruno França, Lucas Ambrósio, Letícia Gasparoni e Letícia Rodrigues** por toda a colaboração neste projeto.

Aos amigos e colegas de pós-graduação **Marília Cabral, Maria Luisa Souto, Marcella Moro, Estela Rebeis, Marcela Giudicissi, Bruna di Profio, Ieda Abreu, Carlos Rubio, Carlos Benitez, Emmanuel Albuquerque, Alexandre Llanos, Monica Misawa, Marcelo Sirolli e Vanessa Almeida** por toda amizade, companheirismo e cumplicidade.

À técnica da disciplina de periodontia **Marília Camargo** por toda ajuda.

À **Profa. Dra. Márcia Marques**, por ceder gentilmente seu laboratório de cultura de células para a realização deste projeto.

Às alunas de pós-graduação do departamento de dentística **Juliana Garuba, Laís Pizzatto, Cláudia Meneses e Ana Clara Pedroni** por toda convivência e aprendizado no laboratório.

À técnica de laboratório **Débora França** por toda ajuda e disponibilidade.

Aos meus amigos com quem morei durante estes 3 anos e meio de doutorado, **Henrique Fukushima, Victor Fukushima, Lucas Ambrósio, Alexandre Ambrósio e Pablo Prado**, obrigado por toda amizade e pela ótima convivência.

Aos **pacientes** que doaram seus dentes, sem vocês não seria possível realizar este estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de doutorado (processo 2015/11587-8) e auxílio à pesquisa (processo 2015/07396-2).

"A vida começa no final da sua zona de conforto"

Neale Donald Walsch

RESUMO

Rovai ES. Efeito da ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) sobre as atividades osteogênica e cementogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

O receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR1) foi o primeiro membro clonado da família de receptores acoplados à proteína G. Sua ativação tem sido associada ao reparo tecidual e cicatrização óssea. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da ativação do PAR1 nas atividades osteogênica e cementogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal (CMLP). CMLP obtidas de 3 indivíduos foram cultivadas e tratadas com meio clonogênico (MC) ou meio osteogênico (MO) por 2, 7 e 14 dias. Depósitos de cálcio, concentração de cálcio (sobrenadante), atividade de fosfatase alcalina (ALP), proliferação celular, expressão gênica (qPCR) e níveis proteicos (ELISA) de fatores osteogênicos e cementogênicos foram avaliados na presença de trombina, agonista do PAR1 ou antagonista do PAR1. A ativação do PAR1 levou ao aumento da formação de depósitos de cálcio ($p < 0,05$), o que foi associado ao aumento da concentração de cálcio ($p < 0,05$), atividade da ALP ($p < 0,05$) e proliferação celular ($p < 0,05$). Além disso, os ensaios qPCR e ELISA mostraram que a ativação do PAR1 pode aumentar a expressão gênica de Runx2, OPG e CEMP1 ($p < 0,05$) e níveis proteicos de Runx2 e OPG ($p < 0,05$). Em conclusão, nossos resultados demonstram que a ativação de PAR1 aumenta as atividades osteogênica e cementogênica de CMLP.

Palavras chave: Regeneração periodontal, células do ligamento periodontal, potencial osteogênico, receptor do tipo 1 ativado por protease, trombina.

ABSTRACT

Rovai ES. Effect of protease activated receptor type 1 (PAR1) activation on the osteogenic activity of periodontal ligament cells [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Protease activated receptor 1 (PAR1) was the first cloned member of the G protein-coupled receptor family. Its activation has been associated to tissue repair and bone healing. The aim of the present study was to evaluate the effect of PAR1 activation on the osteogenic and cementogenic activities of human periodontal ligament stem cells (HPLSC). HPLSC obtained from 3 subjects and treated with a control medium or with an osteogenic medium for 2, 7 and 14 days. Calcium deposits, calcium concentration (supernatant), alkaline phosphatase activity (ALP), cell proliferation and gene (qPCR) and protein expression (ELISA assay) of osteogenic and cementogenic factors were assessed in the presence of thrombin, PAR1 specific agonist peptide or PAR1 antagonist peptide. The activation of PAR1 led to increased formation of calcium deposits ($p<0.05$), which was associated to increased calcium concentration ($p<0.05$), ALP activity ($p<0.05$) and cell proliferation ($p<0.05$). Further, qPCR and ELISA assay showed that activation of PAR1 may increase gene expression of Runx2, OPG and CEMP1 ($p<0.05$) and protein levels of Runx2 and OPG ($p<0.05$). In conclusion, our results demonstrate that PAR1 activation increases osteogenic and cementogenic activities of HPLSC.

Keywords: Periodontal regeneration, periodontal ligament cells, Osteogenic potential, Protease activated receptor type 1, Thrombin

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ativação do receptor PAR1 pela trombina.....	32
Figura 2.2 – Efeito dos PARs na homeostase do tecido ósseo.	37
Figura 4.1 – Ilustração dos passos realizados para obtenção das células do ligamento periodontal.....	44
Figura 4.2 – Células do ligamento periodontal migrando do espécime após 10 dias de cultura. Fotografia obtida através de um microscópio invertido (100x)	45
Figura 4.3 – Células do ligamento periodontal atingindo 80%-90% de confluência após 14 dias de cultura. Fotografia obtida através de um microscópio invertido (100x).....	45
Figura 5.1 – Fluxograma do estudo..	55
Figura 5.2 – Caracterização das células através da citometria de fluxo.	56
Figura 5.3 – Efeitos do PAR1 na formação de depósitos de cálcio após 7 e 14 dias de experimento.....	58
Figura 5.4 – Análise quantitativa do ensaio do vermelho de alizarina após 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão em média e desvio padrão (DP); n = 3 pacientes.....	59
Figura 5.5 – Análise de concentração de cálcio após 2, 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes.	60
Figura 5.6 – Análise de atividade de ALP após 2, 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes.	61
Figura 5.7 – Análise de proliferação celular após 2 e 4 dias de experimento. Os dados estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes.....	62
Figura 5.8 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de Runx2 aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes	63
Figura 5.9 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de Runx2 aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes	64
Figura 5.10 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de Runx2 aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes.....	64
Figura 5.11 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OPG aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes.....	65

- Figura 5.12 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OPG aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 65
- Figura 5.13 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OPG aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 66
- Figura 5.14 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de RANKL aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes66
- Figura 5.15 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OC aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 67
- Figura 5.16 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OC aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 67
- Figura 5.17 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OC aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes... ..68
- Figura 5.18 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CEMP-1 aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes69
- Figura 5.19 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CEMP-1 aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes69
- Figura 5.20 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CEMP-1 aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes70
- Figura 5.21 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CAP aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 70
- Figura 5.22 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CAP aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 71
- Figura 5.23 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CAP aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes71
- Figura 5.24 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de Runx2 aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes72
- Figura 5.25 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de Runx2 aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 72
- Figura 5.26 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de Runx2 aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes73
- Figura 5.27 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes 74

- Figura 5.28 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes74
- Figura 5.29 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes75
- Figura 5.30 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OC aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes75
- Figura 5.31 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OC aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes76
- Figura 5.32 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OC aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes76
- Figura 5.33 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPN aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes77
- Figura 5.34 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPN aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes77
- Figura 5.35 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPN aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	atividade de fosfatase alcalina
CAP	cementum attached protein
CEMP1	cementum protein 1
cm	centímetros
CMLP	células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal
CTGF	fator de crescimento do tecido conjuntivo
DEPC	água tratada com dietil-pirocarborato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	trifosfato de desoxinucleotídeos
DP	desvio padrão
ET	endotelina
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FXa	fator Xa
IL	interleucina
LPS	lipopolissacarídeos
MC	meio clonogênico
MCSF	fator estimulante de colônias de macrófagos
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
MMP	metaloproteinase da matriz
MO	meio osteogênico
mTOR	alvo da rapamicina em mamíferos
nm	nanômetro
nM	nanomolar
NF- κ β	factor nuclear kappa β
OC	osteocalcina
OD	densidade óptica

OPG	osteoprotegerina
OPN	osteopontina
PAR	receptor ativado por protease
PBS	tampão fosfato-salino
PCA	proteína C ativada
PCR	reação da polimerase em cadeia
pg	picogramas
pH	potencial hidrogeniônico
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RQ	expressão relativa
Runx2	runt-related transcription factor 2
s	segundos
SBF	soro bovino fetal
TA	temperatura ambiente
TGF- β	fator de transformação do crescimento
TNF	fator de necrose tumoral
U	unidade
α -MEM	α -Modified Eagle Medium
μ g	microgramas
μ L	microlitro
μ M	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	REGENERAÇÃO PERIODONTAL	27
2.2	CÉLULAS MESENQUIMAIS	30
2.2.1	CMLP	30
2.3	PAR1	31
2.3.1	Principais ativadores do PAR1	33
2.3.1.1	Ativadores endógenos e exógenos do PAR1	34
2.3.1.2	Ativadores sintéticos do PAR1	35
2.3.1.3	Antagonista do PAR1	35
2.3.2	PAR1 e a regeneração e homeostase periodontal	35
2.3.3	PAR1 e a regeneração e homeostase do tecido ósseo	37
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	SELEÇÃO DOS PACIENTES	43
4.2	CULTURA CELULAR	43
4.3	CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO	46
4.4	INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR	46
4.5	TRATAMENTO DAS CÉLULAS	47
4.6	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO POR COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA	47
4.7	ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM SOBRENADANTE	48
4.8	ENSAIO DE ATIVIDADE DA ALP	48
4.9	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO	49
4.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE OPG, RANKL, OC, RUNX2, CEMP1 e CAP	49
4.11	ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE OPG, OC, OPN E RUNX2	53
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	PERFIL CARACTERÍSTICO DAS CMLP	56

5.2	A ATIVAÇÃO DO PAR1 LEVA À MAIOR DEPOSIÇÃO DE CÁLCIO EM CMLP.....	57
5.3	ATIVAÇÃO DO PAR1 AUMENTOU A CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM CMLP.....	59
5.4	EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NA ATIVIDADE DE ALP.....	60
5.5	EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	61
5.6	EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES OSTEOGÊNICOS E CEMENTOGÊNICOS.....	63
5.7	EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NOS NÍVEIS POTEICOS DE FATORES OSTEOGÊNICOS.....	71
6	DISCUSSÃO.....	79
7	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Periodontite é uma doença multifatorial caracterizada pela inflamação dos tecidos periodontais a qual resulta na destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar (American Academy of Periodontology, 2001). Embora a terapia cirúrgica e não cirúrgica sejam efetivas no tratamento e controle dessa doença (Lindhe et al., 1982; Heitz-Mayfield, Lang, 2013), sabe-se que estes tratamentos não resultam na regeneração significativa dos tecidos periodontais perdidos. (Wu et al., 2017).

O uso de células mesenquimais indiferenciadas na terapia periodontal regenerativa tem sido proposto devido a sua capacidade de diferenciar e expandir em linhagens de células diferentes, mantendo as suas funções específicas (Hu et al., 2017). As células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal (CMLP) podem diferenciar-se em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos e desempenham um papel importante na regeneração dos tecidos periodontais (Sowmya et al., 2015). Ainda, em um estudo *in vivo*, Seo et al. (2004) mostraram que quando transplantadas em defeitos periodontais criados cirurgicamente em camundongos, as CMLP podem levar à regeneração do ligamento periodontal, cimento e osso alveolar.

A trombina é uma serino protease a qual exerce várias atividades biológicas essenciais no processo de cicatrização e regeneração de tecidos periodontais (Hou et al., 1998; Coughlin, 2000). A trombina leva à agregação e degranulação plaquetária, resultando na liberação de diversos fatores de crescimento os quais podem atuar na cascata de cicatrização óssea, como recrutamento de células-tronco, angiogênese, produção de matriz extracelular e remodelação óssea (Coughlin, 2000; Song et al., 2005; Mackie et al., 2008). A partir dos anos 90, foi demonstrado que alguns desses efeitos podem ser mediados pelos receptores ativados por proteases (PAR)s. Até o momento, quatro membros da família dos PARs foram descritos, o PAR1, PAR3 e PAR4 que podem ser ativados pela trombina e PAR2 que pode ser ativado por proteases endógenas e bacterianas (Ramachandran et al., 2016).

O PAR1 foi o primeiro membro da família dos receptores acoplados à proteína G a ser clonado. A clivagem proteolítica do PAR1 determina uma nova sequência N-

terminal que se liga ao próprio receptor, resultando em sua ativação, gerando um padrão de sinalização intracelular (Ramachandran et al., 2016). O seu envolvimento nos tecidos periodontais foi sugerido após ser demonstrada a expressão deste receptor por vários tipos de células dos tecidos periodontais, tais como células epiteliais gengivais (Rohani et al., 2010), fibroblastos gengivais humanos (Uehara et al., 2005), osteoblastos (Pagel et al., 2009), células de ligamento periodontal (Arayatrakoollikit, et al., 2008) e células monocíticas (Uehara et al., 2008). Entre os possíveis candidatos que podem ativar o PAR1 nestas células do periodonto, os principais são a trombina, metaloproteinases da matriz (MMP)-1, MMP-13 e a gingipaína.

Estudos têm sugerido um papel importante do PAR1 no reparo dos tecidos periodontais (Rovai; Holzhausen, 2017), correlacionando sua ativação com a proliferação de fibroblastos através da produção de endotelina-1 (ET-1) (Ohuchi et al., 2010) e síntese do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e ativação do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) em fibroblastos gengivais (Yang et al., 2017). Além disso, da Silva et al. (2014) demonstraram que, em pacientes com periodontite crônica, a terapia periodontal resulta no aumento da expressão de PAR1 nas células do fluido gengival, o qual foi associado à diminuição da expressão de biomarcadores inflamatórios, tais como a interleucina (IL)-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e MMP-2.

Com relação ao metabolismo ósseo, já foi demonstrado que a trombina via ativação do PAR1 regula vários aspectos da função dos osteoblastos e reparo ósseo (Mackie et al., 2008; Sato et al., 2016). Estudos *in vitro* relataram que a ativação de PAR1 pode levar ao aumento da proliferação de osteoblastos (Abraham & Mackie, 1999) e da expressão de TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos do tipo 1 (FGF-1) e tipo 2 (FGF-2) e CTGF (Pagel et al., 2009; Song et al., 2005). Além disso, Arayatrakoollikit et al. (2008) demonstraram em células do ligamento periodontal que a ativação do PAR1 pela trombina poderia aumentar a síntese de osteoprotegerina (OPG), uma proteína que regula a homeostase óssea e diminui a ativação dos osteoclastos. Corroborando com esses achados, um estudo recente observou que uma protease ativadora de plasminogênio pode reduzir a osteoclastogênese inflamatória induzida por lipopolissacarídeos (LPS) através da ativação de PAR1 (Kanno et al., 2016). Por fim, em um modelo de reparo ósseo em camundongos PAR1 (-/-) foi mostrado que o PAR1 atua sobre a proliferação de células

mesenquimais da medula óssea e está relacionado com o aumento da formação óssea e menor quantidade de osteoclastos, desempenhando um papel importante nos estágios iniciais da reparação óssea (Song et al., 2005a).

A formação de novo cemento é considerada um dos principais eventos da regeneração periodontal (Cortellini; Tonetti, 2015), pois além de se inserir as fibras de Sharpey do ligamento periodontal, os componentes da matriz extra-celular do cemento são capazes de emitir sinais para recrutamento, proliferação e diferenciação de células periodontais, regulando a regeneração do cemento, assim como a regeneração de outros componentes periodontais (Bartold et al., 2000). Entretanto, apesar de haver evidências do papel do PAR1 na reparação do tecido ósseo, até o momento não se sabe a ação deste receptor na cementogênese.

Tomados em conjunto, os achados da literatura sugerem que o PAR1 pode desempenhar um papel importante na regeneração dos tecidos periodontais. A hipótese do presente estudo é que a ativação do PAR1 aumenta a atividade osteogênica e cementogênica através do aumento da formação de depósitos de cálcio, concentração de cálcio, proliferação celular e expressão de fatores osteogênicos e cementogênicos em CMLP humanas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O paradigma atual na ciência da saúde é encontrar soluções biológicas para problemas biológicos. Na periodontia, a regeneração de tecidos é considerada o resultado ideal da terapia. Dessa forma, com o avanço do conhecimento nas áreas de engenharia tecidual através de novos biomateriais, técnicas inovadoras de biologia molecular e uso de células mesenquimais, novas alternativas terapêuticas vêm sendo propostas.

2.1 REGENERAÇÃO PERIODONTAL

A regeneração dos tecidos periodontais perdidos: osso, ligamento e cimento, constitui-se o objetivo ideal da terapia periodontal. Apesar de trazer resultados satisfatórios no controle da doença, o tratamento periodontal através da raspagem e alisamento radicular não promove a neoformação significativa dos tecidos perdidos (Arzate et al., 2015). Nestes casos, ocorre apenas uma reparação tecidual, principalmente pela formação de um epitélio juncional longo no lugar da bolsa periodontal (Caton; Zander, 1979).

Os osteoblastos e as células do ligamento periodontal participam ativamente na restauração da arquitetura e função original do periodonto por meio da capacidade de sintetizar fatores importantes no processo de formação de osso alveolar e na regeneração periodontal (Aukhil, 1991). No entanto, para que ocorra regeneração, os eventos da cicatrização devem progredir de maneira organizada e em uma sequência programada, a fim de que células progenitoras apropriadas possam migrar para o sítio e aderir à superfície radicular, onde irão proliferar e diferenciar-se em componentes teciduais de um aparato de inserção periodontal funcional (Bartold et al., 2000). O sucesso da proliferação, migração e maturação de células progenitoras depende da disponibilidade de fatores de crescimento apropriados na matriz extracelular, os quais controlarão a expressão gênica destas células (Aukhil, 1991; Ivanovski et al., 2006). Na ausência destes componentes moleculares e

celulares, a cicatrização pode ser comprometida levando à reparação ao invés de regeneração dos tecidos periodontais (Han et al., 2014).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo fibroso vascularizado altamente especializado e situado entre o cemento e a parede do alvéolo dental. O ligamento é composto de matriz extracelular não-colágena, constituintes extracelulares de fibras colágenas, osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos, restos epiteliais de Malassez, macrófagos, cementoblastos e rico em células mesenquimais indiferenciadas (de Oliveira et al., 2003; Seo et al., 2004; Bartold; Narayanan, 2006).

As células do ligamento periodontal são importantes componentes na manutenção da função normal do ligamento e estão envolvidas na regeneração dos tecidos periodontais, principalmente, na mediação da formação óssea durante o remodelamento do osso alveolar (Somerman et al., 1990). Dessa forma, o sucesso na regeneração periodontal pode ser alcançado através de uma seletiva migração, proliferação e diferenciação das células do ligamento periodontal.

O processo de diferenciação osteoblástica consiste de três fases: proliferação com formação de matriz, maturação e mineralização (Afzal et al., 2004). Durante este processo, ocorre a expressão de genes osteogênicos específicos nas células do ligamento, incluindo o Runx2, osteopontina (OPN), fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OC) (Qian et al., 2010).

A ALP é um marcador precoce de diferenciação das células osteogênicas (Wlodarski; Reddi, 1986). No periodonto, ela pode regular a homeostase óssea, formação de cemento e remodelação do ligamento periodontal (Ram et al., 2015). Ainda, uma vez que um estudo de periodontite experimental mostrou uma associação entre a ALP e profundidade de sondagem (Nakamura; Slots, 1983), tem-se sugerido que a ALP pode servir futuramente como um monitor de estabilidade da doença e um marcador secundário para o planejamento e monitoramento da doença.

O Runx2 é um fator de transcrição específico de osteoblastos, sendo considerado o mais importante regulador de diferenciação osteoblástica, osteogênica e formação óssea (Yamaguchi et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que baixos níveis de Runx2 no fluido gengival estão associados à progressão da periodontite em humanos (Horie et al., 2016).

A OC é uma proteína associada à matriz óssea e secretada pelos osteoblastos nos estágios mais maduros de mineralização óssea. No periodonto, níveis altos desta proteína no fluido gengival vêm sendo relacionados com a remodelação óssea (Giannobile et al., 2003).

OPN funciona como moduladora da mineralização da matriz óssea (Beresford et al., 1984). Um aumento na sua expressão é observado em osteoblastos maduros em locais de formação e reabsorção óssea. Ainda, tem-se sugerido que a OPN pode exercer um papel nas doenças periodontais, uma vez que a mesma tem sido implicada no recrutamento e estimulação de macrófagos e linfócitos em resposta a infecções não específicas (Ram et al., 2015).

Além da expressão destes genes, a OPG e o RANKL, os quais são expressos pelos osteoblastos, também têm sido associados com a osteoclastogênese. O RANKL liga-se ao seu receptor RANK na superfície do osteoclasto precursor, determinando sua ativação e diferenciação em um osteoclasto maduro. A OPG funciona como um falso receptor de RANKL, dessa forma, impedindo sua ligação ao receptor RANK em osteoclastos, inibindo a ativação de osteoclastos. Acredita-se que a OPG e o RANKL sejam genes essenciais na osteoclastogênese, sendo que a razão OPG/RANKL pode determinar a diferenciação e ativação de osteoclastos (Lacey et al., 1998).

A cementogênese é considerada o processo mais importante da regeneração periodontal (Cortellini; Tonetti, 2015). Para que ela ocorra, diversas moléculas presentes na matriz extra-celular devem atuar na proliferação e diferenciação cementoblástica, assim como na formação de uma nova matriz de cimento (Bartold et al., 2000). CEMP1 é a principal proteína reguladora da cementogênese, ele desempenha papel importante no metabolismo local, regulando a diferenciação cementoblástica e a indução da deposição de cimento (Bermúdez et al., 2015). Outra molécula importante neste processo é o CAP, o qual vem sendo relacionado às fases tardias da cementogênese, principalmente pela sua capacidade de recrutar células cementoblásticas para a superfície radicular (Barkana et al., 2000).

Diversas abordagens clínicas para regeneração periodontal foram propostas ao longo dos anos. No entanto, os resultados obtidos em longo prazo por essas técnicas são limitados, tendo aplicabilidade apenas em casos específicos como classes II de furca em molares inferiores e defeitos intra-ósseos (Needleman et al., 2006; Villar; Cochran, 2010; Reddy et al., 2015). Dessa forma, novas alternativas

terapêuticas vêm sendo estudadas, e a engenharia tecidual com base em células-tronco tem-se mostrado promissora neste campo.

2.2 CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células mesenquimais, as quais foram primeiramente identificadas na medula óssea, possuem a capacidade de diferenciar-se em uma variedade de células, como osteoblastos, condrócitos, miócitos e adipócitos (Hu et al., 2017). Desta forma, estudos têm avaliado o seu potencial para regenerar, substituir, manter e melhorar a função de um tecido ou órgão (Mao; Mooney, 2015).

A descoberta de que as células mesenquimais poderiam ser encontradas também em tecidos dentários trouxe bastante entusiasmo na comunidade científica, principalmente por apresentar uma fonte alternativa de células mesenquimais autógenas, as quais poderiam ser obtidas com um mínimo de desconforto aos pacientes e com boa disponibilidade numérica. Dentre as principais fontes destas células, destacam-se as células mesenquimais da polpa dental, células mesenquimais provenientes de dentes decíduos, células mesenquimais da papila apical e as CMLP (Hu et al., 2017)

2.2.1 CMLP

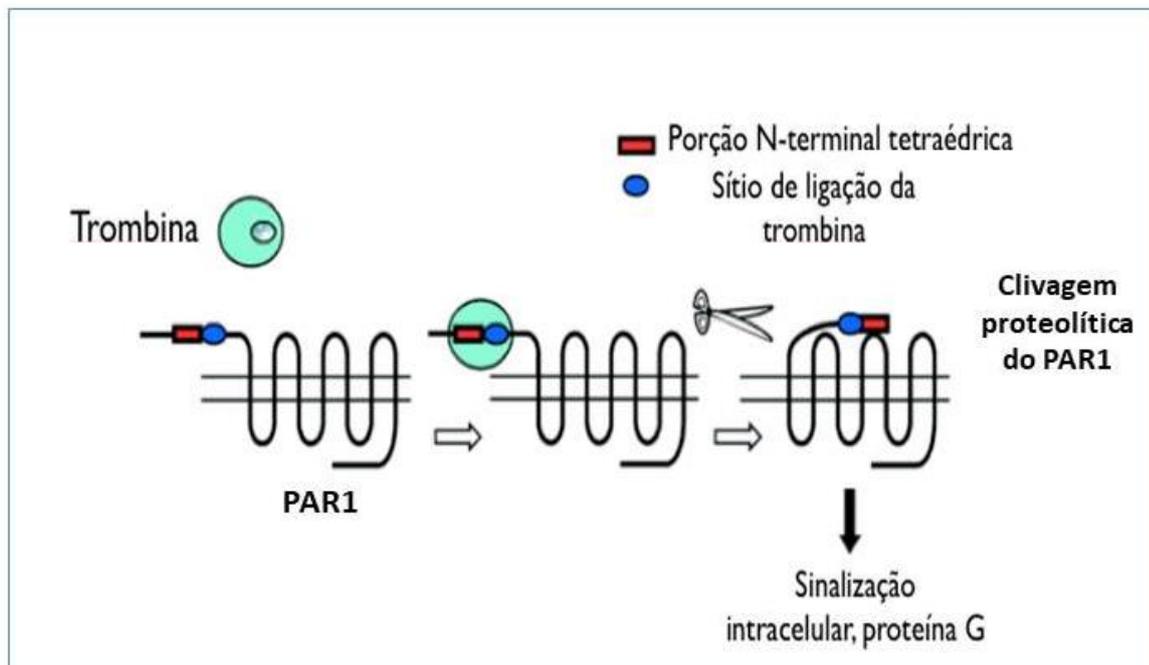
As CMLP são células progenitoras com características de células-tronco, ou seja, com capacidade de diferenciarem-se em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, responsáveis pela restauração dos tecidos periodontais perdidos (Han et al., 2014). O estudo de Seo et al., (2004), mostrou que quando transplantadas em defeitos periodontais criados cirurgicamente em camundongos, as células do ligamento periodontal podem levar à regeneração de ligamento periodontal e podem estar associadas com o osso trabecular no periodonto regenerado, implicando um potencial papel funcional das células do ligamento na regeneração do tecido ósseo. Corroborando com esses achados, estudos com miniporcocos observaram que as

CMLP são capazes de regenerar os tecidos periodontais (Liu et al., 2008; Ding et al., 2010). Ainda, uma revisão sistemática a qual incluiu vinte e dois estudos em modelos animais, avaliou o potencial regenerativo das células mesenquimais transplantadas em defeitos periodontais (Tassi et al., 2017) e concluiu que o uso de células mesenquimais tem potencial para regenerar o periodonto. Assim, evidências dos estudos da literatura sugerem que o uso de CMLP na engenharia tecidual pode ser eficaz no tratamento das sequelas das doenças periodontais.

2.3 PAR1

O PAR1, também denominado de receptor de trombina, foi o primeiro membro clonado da família dos receptores acoplados à proteína G, com 7 domínios transmembrânicos, cuja ativação ocorre através da clivagem proteolítica do domínio N-terminal que pode ser efetuada pela trombina, gingipaína, proteína C ativada (PCA), fator Xa (FXa), granzima A, tripsina e MMP-1 e MMP-13 (Lourbakos et al., 2001; Jaffré et al., 2012). A clivagem proteolítica do PAR1 na ligação Arg41/Ser42 determina uma nova sequência N-terminal que se liga ao próprio receptor, resultando em sua ativação automática e gerando um padrão de sinalização intracelular (Ossovskaya; Bunnett, 2004), vide Figura 2.1.

Figura 2.1 – Ativação do receptor PAR1 pela trombina.



Fonte: Figura modificada de Ossovskaya e Bunnett (2004)

Além do PAR1, outros receptores integram a família dos receptores ativados por protease (PARs), o PAR3, o PAR4, os quais também podem ser ativados por trombina, e o PAR2, que pode ser ativado por diversos tipos de proteases endógenas e bacterianas, desempenhando papel fundamental na inflamação periodontal (Macfarlane et al., 2001, Holzhausen et al., 2005, Holzhausen et al., 2006, Holzhausen et al., 2010, Fagundes et al., 2011, Euzebio Alves et al., 2013).

O PAR1 pode ser expresso por plaquetas, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, miócitos, neurônios e astrócitos, e seu envolvimento no metabolismo do tecido periodontal tem sido sugerido por diversos estudos *in vitro* (Déry et al., 1998; Coughlin 1999; O'Brien et al., 2001; Austin et al., 2013) os quais verificaram a expressão deste receptor por várias células periodontais, bem como a presença de seus possíveis ativadores nos tecidos periodontais. O PAR1 tem sido demonstrado em fibroblastos gengivais humanos, células epiteliais gengivais, células do ligamento periodontal, osteoblastos, osteoclastos e monócitos (Lourbakos et al., 2001; Tanaka et al., 2004; Pagel et al., 2009). Entre os possíveis candidatos que podem ativar o PAR1 nestas células, a trombina e a gingipaína são as enzimas mais estudadas (Ramachandran et al., 2016).

2.3.1 Principais ativadores do PAR1

O PAR1 pode ser ativado por diversas proteases endógenas e bacterianas. Nos tecidos periodontais, os principais possíveis ativadores do PAR1 são a trombina, plasmina, triptase, MMP-1, MMP-13 e as gingipaínas. No entanto, é importante salientar que diferentes proteases podem gerar diferentes padrões de sinalização intracelular, ativando vias canônicas ou não canônicas (Ramachandran et al., 2016).

2.3.1.1 Ativadores endógenos e exógenos do PAR1

A trombina é uma serino protease endógena que pode ser liberada a partir de um coágulo após uma lesão ou inflamação. Nos tecidos periodontais, sugere-se que a trombina desempenhe um papel importante nos processos de cicatrização (Coughlin, 1999). Ainda, a trombina via ativação do PAR1 vem sendo relacionada a várias funções celulares que regulam a inflamação e cicatrização no periodonto (Yang et al., 2017).

Plasmina é uma serino protease que não apenas age na degradação da fibrina levando a dissolução do coágulo, mas também ativa MMPs, fatores de crescimento e o PAR1. Estudos demonstraram que a plasmina pode ativar diferentes tipos de células, desempenhando um papel no processo de remodelação, reparação e defesa do hospedeiro (Rømer et al., 1996; Ploplis et al., 1998; Collen, 2001). No periodonto, Sulniute et al. (2011) mostraram que a plasmina desempenha um papel importante na prevenção do desenvolvimento da periodontite em camundongos.

A triptase de mastócitos é uma protease encontrada em grandes quantidades na mucosa oral, tecido conjuntivo e fluido gengival de pacientes com periodontite crônica (Eley; Cox, 1992). Apesar de estudos sugerirem que essa protease pode ter papel importante na patogênese da doença periodontal através da ativação do PAR2 (Holzhausen et al., 2011), até o momento pouco se sabe sobre a sua ação sobre o PAR1.

As MMPs fazem parte da principal família de enzimas responsáveis pela remodelação de matriz extracelular (Paiva; Granjeiro, 2014). De maneira interessante, foi demonstrado que as MMP-1 e 13 têm a capacidade de ativar o PAR1 em sítios não canônicos gerando padrões de sinalizações específicos para as MMPs. A ativação do PAR1 pelas MMPs vem sendo estudada principalmente na área médica, sendo relacionada às doenças cardiovasculares (Austin et al., 2013).

A gingipaína é uma protease bacteriana produzida por um dos principais patógenos periodontais, o *Porphyromonas gingivalis*. Essa protease bacteriana tem a capacidade de interagir com os receptores da superfície da célula do hospedeiro, modulando a resposta inata (Belibasakis et al., 2010) e desempenhando papel importante na doença periodontal. Sabe-se que alguns dos mecanismos de ação desta protease são mediados pelos receptores PAR1 e 2. A gingipaína pode ativar

o PAR1 em células monocíticas desencadeando uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias (Uehara et al., 2008) e na superfície de plaquetas levando a agregação plaquetária (Lourbakos et al., 2001).

2.3.1.2 Ativadores sintéticos do PAR1

Peptídeos sintéticos que correspondem à sequência tetraédrica da porção terminal do PAR podem ativar o receptor sem a necessidade que ocorra a clivagem proteolítica (Cocks; Moffat, 2000). Com exceção do PAR3, todos os outros receptores possuem seus peptídeos agonistas seletivos. O PAR1 pode ser especificamente ativado pelo peptídeo TFLLR-NH2 (Hollemborg et al., 2014). A descoberta dos peptídeos agonistas ativadores dos PARs representou um avanço importante neste campo científico, colaborando para a análise das ações específicas mediadas por esses receptores (Rovai; Holzhausen, 2017).

2.3.1.3 Antagonista do PAR1

O PAR1 possui um antagonista efetivo (Ramachandran et al., 2016), cuja descoberta foi importante para os estudos os quais visam analisar os efeitos de seus ativadores não específicos, como por exemplo, a trombina. De fato, um antagonista do PAR1 (Vorapaxar) já vem sendo estudado e utilizado na inibição da ativação do PAR1 pela trombina, resultando na prevenção da agregação plaquetária em pacientes com alto risco para doenças cardiovasculares (Hollemborg et al., 2014).

2.3.2 PAR1 e a regeneração e homeostase periodontal

Um possível papel do PAR1 na regeneração e homeostase periodontal vem sendo sugerido, uma vez que durante estes processos, vários ativadores do PAR1 podem estar presentes, como por exemplo, a trombina, plasmina, MMP-1 e MMP-13 (Rovai; Holzhausen, 2017).

Apesar do PAR1 já ter sido associado às ações inflamatórias em alguns tipos celulares, em estudo conduzido por Wong et al. (2010), camundongos PAR1+/+ e camundongos PAR1-/-, após serem induzidos à doença periodontal por meio de cepas de *Porphyromonas gingivalis*, não demonstraram diferenças com relação a perda óssea alveolar, indicando que o PAR1 não possui um papel relevante na progressão da destruição periodontal.

Em um estudo com linhagens de monócitos, demonstrou-se que a ativação do PAR1 pela trombina e por seu peptídeo agonista, leva à síntese de IL-10, uma IL que age em macrófagos, principalmente na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Naldini et al., 2005). Corroborando com esses achados, esses mesmos autores verificaram que a ativação do PAR1 pela trombina inibe a síntese de IL-12, citocina relacionada com a ativação de macrófagos.

Ainda, Ohuchi et al. (2010) demonstraram que a ativação do PAR1 pela trombina e seu peptídeo agonista aumenta a taxa de proliferação de fibroblastos gengivais.

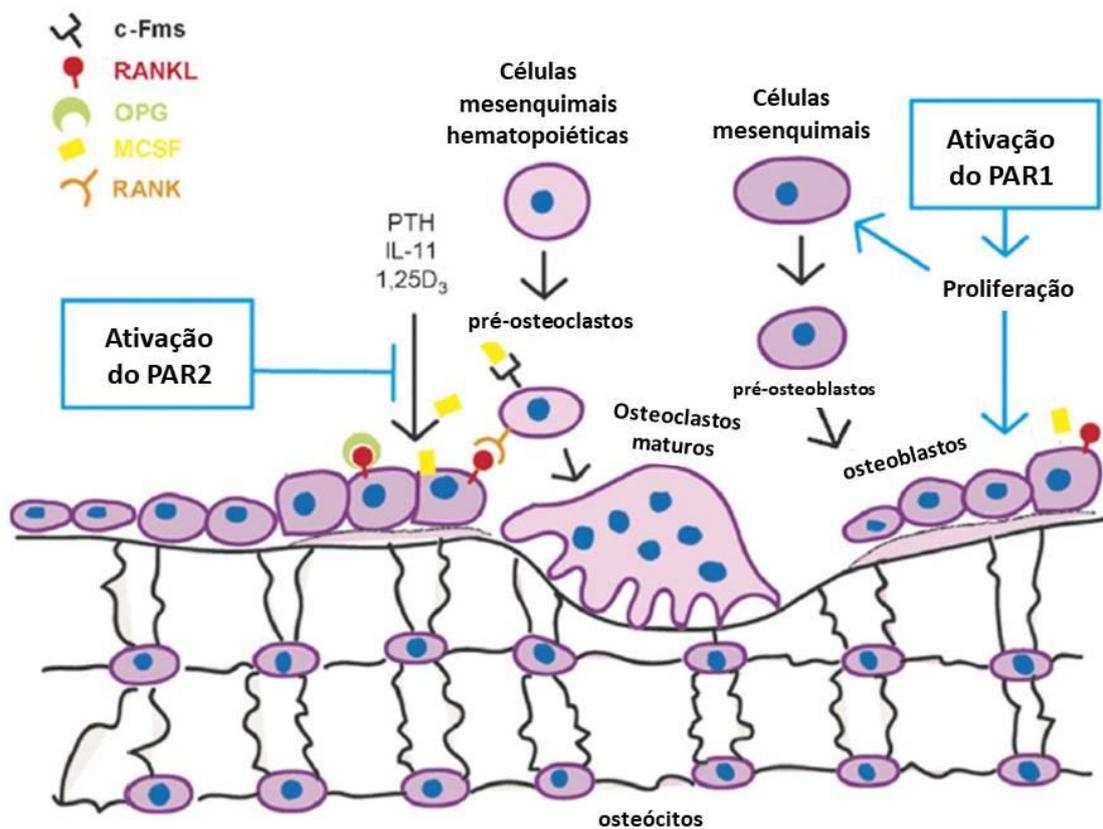
Em 2014, foi demonstrado que o parstatin, um peptídeo de 41 aminoácidos liberado após a ativação do PAR1, exerce um potencial papel anti-inflamatório, pois sua presença está associada com um menor infiltrado de células inflamatórias, menor atividade de mieloperoxidase e menores níveis de mediadores pró-inflamatórios em tecidos gengivais de ratos submetidos à doença periodontal experimental (Spolidorio et al., 2014).

Neste mesmo contexto, outro estudo do mesmo grupo demonstrou que a terapia periodontal resulta em um aumento duas vezes maior da expressão de PAR1 em células epiteliais e células imunes do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica, sugerindo um possível papel protetor do PAR1 durante a fase de reparo periodontal após terapia (da Silva et al., 2014). Acredita-se que o aumento da expressão do PAR1 após a terapia periodontal esteja associado à presença abundante de seu ativador, a trombina, durante a fase de cicatrização.

2.3.2.1 PAR1 e a regeneração e homeostase do tecido ósseo

Estudos têm demonstrado que a trombina via ativação do PAR1 regula vários aspectos da função dos osteoblastos e reparo ósseo (Mackie et al., 2008; Sato et al. 2016). De fato, tem sido mostrado que tanto o PAR1 quanto o PAR2 podem desempenhar importantes papéis na homeostase do tecido ósseo (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Efeito dos PARs na homeostase do tecido ósseo



Fonte: Figura modificada de Mackie et al., (2008)

Abraham e Mackie (1999) verificaram em pré-osteoblastos de camundongos que a ativação do PAR1 pela trombina resulta no aumento da sua taxa de proliferação. Além disso, os autores observaram que o tratamento com anticorpos do PAR1 impediu esse efeito, indicando que a ação foi mediada especificamente pelo PAR1. Na análise de ALP deste estudo, viu-se que nos osteoblastos mais imaturos, a ativação do PAR1 estimulou ALP, sugerindo assim um aumento na diferenciação osteoblástica destas células.

Em um modelo de reparo ósseo em camundongos PAR1(-/-), Song et al. (2005a) mostraram que o PAR1 atua sobre a proliferação de células mesenquimais da medula óssea e está relacionado com o aumento da formação óssea e menor quantidade de osteoclastos, desempenhando um papel importante principalmente nos estágios iniciais da reparação óssea. Com uma metodologia parecida, Sato et al. (2016) demonstraram que a ativação do PAR1 através da trombina regula diversas funções em osteoblastos de tecidos submetidos à fratura, desempenhando papel essencial na indução da inflamação e reparação óssea. A inflamação desempenha papel crucial no reparo ósseo (Sato et al., 2016). Na fase inflamatória, o hematoma presente na fratura contém células mesenquimais indiferenciadas, as quais têm alto potencial osteogênico (Sato et al., 2016). Além disso, membros da família do TGF- β , e fatores angiogênicos estão aumentados nessas áreas, atuando ativamente na cascata do reparo ósseo (Song et al., 2005a).

Usando um modelo com camundongos PAR1 (-/-), Pagel et al., (2009) avaliaram o efeito da ativação do PAR1 pela trombina e pelo seu peptídeo agonista seletivo na expressão de alguns fatores de crescimento em osteoblastos obtidos da calvária. Neste estudo, esses autores encontraram que a ativação do PAR1 resultou no aumento da expressão gênica de TGF- β , FGF-1, FGF-2 e CTGF em osteoblastos, também sugerindo que o PAR1 pode ter papel importante nos primeiros estágios da regeneração óssea através da modulação da função osteoblástica.

Em um estudo com células do ligamento periodontal, Arayatrakoolikit et al. (2008) avaliaram o efeito da ativação do PAR1 pela trombina e seu peptídeo agonista na expressão gênica e proteica de OPG e RANKL. Neste estudo, esses autores observaram que a ativação do PAR1 estimula a síntese de OPG através de um mecanismo pós transcricional, pela via de sinalização fosfatidylinositol 3-quinase/mTOR. Ainda, a ativação do PAR1 aumentou a proporção de OPG sobre

RANKL, sugerindo assim um possível papel do PAR1 na inibição da osteoclastogênese e reabsorção óssea.

Corroborando com esses achados, Kanno et al. (2016) descobriram que a ativação de PAR1 em células monocíticas pela plasmina pode diminuir a osteoclastogênese inflamatória induzida por LPS através da inativação da via de sinalização intracelular fator nuclear kappa beta (NF-kB), podendo representar uma nova abordagem terapêutica à perda óssea causada por doenças inflamatórias.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito da ativação do PAR1 sobre as atividades osteogênica e cementogênica de CMLP.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1:

O primeiro objetivo específico deste estudo foi avaliar o efeito da ativação do PAR1 sobre a formação de matriz mineralizada, concentração de cálcio e atividade de ALP por CMLP.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

O segundo objetivo específico deste estudo foi avaliar o efeito da ativação do PAR1 sobre a proliferação de CMLP.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3:

O terceiro objetivo específico deste estudo foi avaliar o efeito da ativação do PAR1 sobre a expressão dos fatores osteogênicos e cementogênicos OPN, OC, OPG, RANKL, Runx2, CEMP1 e CAP por CMLP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados 3 pacientes jovens que passaram por atendimento na clínica da disciplina de cirurgia dentro do ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). A doação dos dentes pelos pacientes foi feita mediante assinatura de formulário específico devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (Protocolo 803.811) (Anexo A e B).

Os critérios de inclusão foram: Pacientes entre 18 a 25 anos idades, sistemicamente saudáveis e terceiros molares hígidos. Foram excluídos os pacientes que apresentassem doença periodontal, pacientes com algum comprometimento sistêmico, como diabetes mellitus, terceiros molares em processo de rizogênese incompleto, terceiros molares com processo inflamatório pericoronário e terceiros molares não totalmente hígidos.

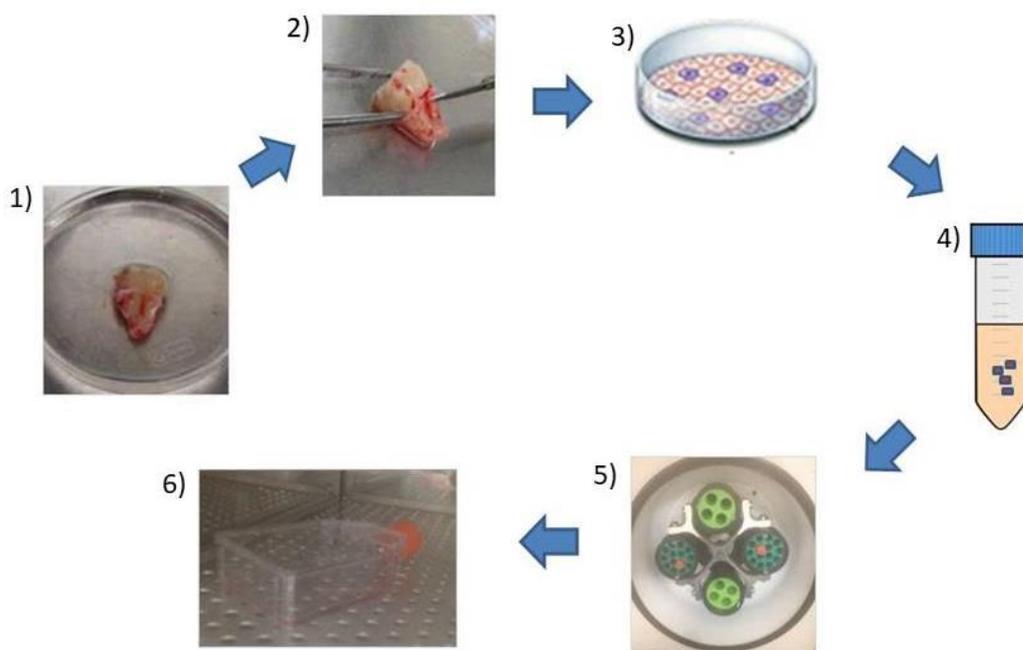
Após a extração dos dentes selecionados, as células do ligamento periodontal foram coletadas e submetidas à cultura, conforme descrito a seguir.

4.2 CULTURA CELULAR

Após a lavagem com Tampão fosfato-salino (PBS) dos terceiros molares selecionados e recém-extraídos, os espécimes foram transportados em meio MEM (α -MEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) até o laboratório de cultura de células. Sob condições assépticas, os dentes tiveram primeiramente o tecido gengival aderido removido com uma cureta. O tecido do ligamento periodontal foi obtido por meio de raspagem no terço médio da raiz, como descrito por Somerman et al., (1988), evitando assim a eventual contaminação com células do tecido gengival ou pulpar. Os tecidos coletados foram então fragmentados em espécimes de 1 milímetro (mm) de espessura aproximadamente com auxílio de um bisturi. Após a fragmentação, seguiu-se a centrifugação em 1000 rotações por minuto (rpm)/ 5 minutos (min)/ temperatura ambiente (TA). Seguidamente, os espécimes foram depositados em frascos para cultura de 25 centímetros (cm)² imersa em α -MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100

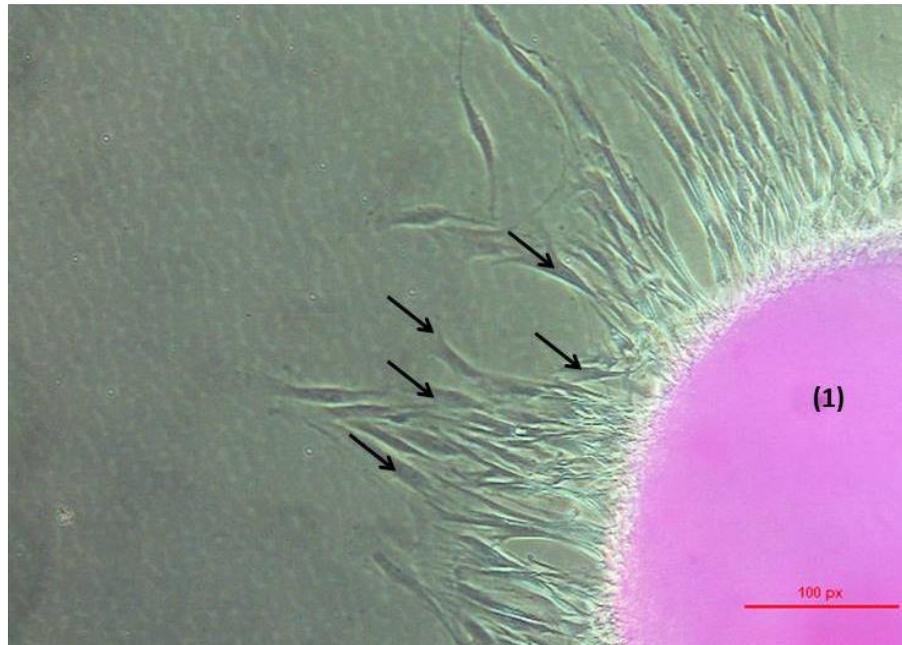
microgramas (μg)/ mililitros (mL) de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 0,5 miligramas (mg)/mL de anfotericina B (MC) (todos os reagentes provenientes de Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO_2 e 100% de umidade (Figura 4.1). Aproximadamente 5-10 dias após as células migrarem dos tecidos (Figura 4.2) e atingirem a confluência adequada (80%-90%) (Figura 4.3), os tecidos foram delicadamente removidos, as células foram coletadas e submetidas à nova cultura em frascos de 150 cm^2 . As células mesenquimais do ligamento periodontal apresentaram um formato fusiforme. Células obtidas entre a 3–7 passagem foram utilizadas nos experimentos. Foram utilizadas células de 3 pacientes diferentes, sendo cada preparo de um único molar.

Figura 4.1 – Ilustração dos passos realizados para obtenção das células do ligamento periodontal



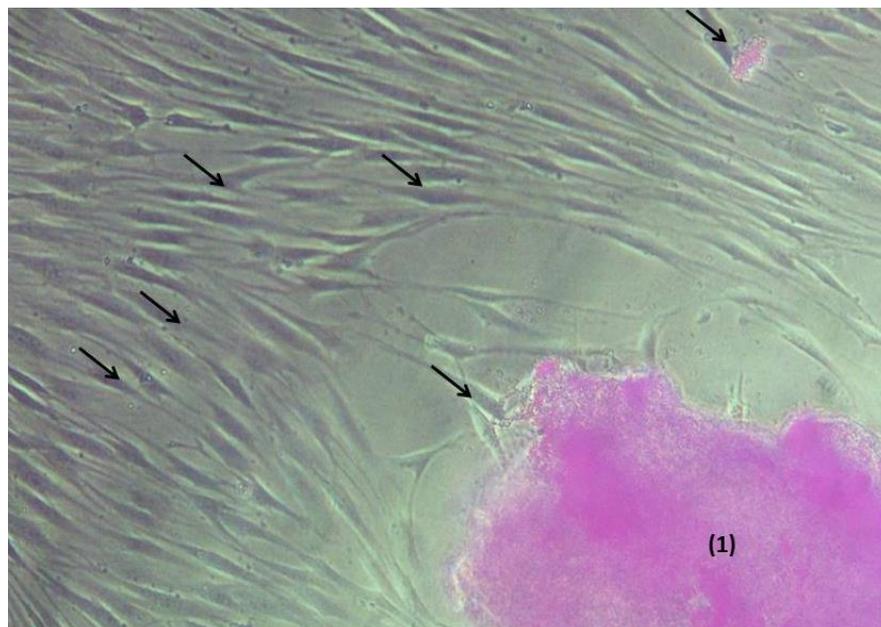
- 1) Lavagem dos terceiros molares com PBS;
- 2) Obtenção do tecido do ligamento periodontal através da raspagem no terço médio da raiz;
- 3) Tecidos coletados foram fragmentados em espécimes de 1 mm de espessura aproximadamente;
- 4) Espécimes foram transportados para um tubo plástico tipo falcon com meio de cultura;
- 5) Centrifugação à 1000 rpm;
- 6) Espécimes imersos em meio de cultura transportados para uma garrafa de cultura e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO_2 e 100% de umidade.

Figura 4.2 – Células do ligamento periodontal migrando do espécime após 10 dias de cultura. Fotomicrografia obtida através de um microscópio invertido (100x)



(1): Espécime de aproximadamente 1 mm do ligamento periodontal; Setas: Setas indicam as células do ligamento periodontal.

Figura 4.3 – Células do ligamento periodontal atingindo 80%-90% de confluência após 14 dias de cultura. Fotomicrografia obtida através de um microscópio invertido (100x)



(1): Espécime de aproximadamente 1 mm do ligamento periodontal; Setas: Setas indicam as células do ligamento periodontal.

4.3 CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a identificação do fenótipo característico de células mesenquimais, em um *pool* de células obtidas de 3 pacientes diferentes, aproximadamente 5×10^5 células isoladas do ligamento periodontal foram lavadas em PBS e incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: CD14-FITC, CD90-FITC (eBioscience, San Diego, CA), CD34-FITC (Biolegend, USA), CD31-PE, CD-44- PE (eBioscience, San Diego, CA) e CD146-PE (Biolegend, USA) por 30 minutos a 4°C. A suspensão de células foi então lavada duas vezes com PBS e analisada com o citômetro de fluxo FACSort (Becton Dickinson). Um total de 5–10.000 eventos foi examinado usando-se um comprimento de onda de 488 nanômetros (nm). Os eventos registrados foram analisados usando-se o software Cell Quest (Becton Dickinson). Os resultados foram expressos como % de células positivas.

4.4 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Para avaliação da capacidade de diferenciação das CMLP, as CMLP de 3 pacientes diferentes foram semeadas separadamente em placas de 24 poços a uma densidade de 25.000 células/cm². O meio de cultura celular foi substituído por meio clonogênico, MC (α -MEM/10% SBF) ou por meio osteogênico MO (MC acrescido de 1 μ M de dexametasona - Invitrogen, 10mM de β -glicerofosfato – Sigma-Aldrich e 50 μ g/ml de ácido ascórbico – Sigma-Aldrich). Após 7 e 14 dias, tempo suficiente para que ocorra a diferenciação osteogênica, a linhagem osteogênica das células foi confirmada pela marcação positiva com vermelho de alizarina (descrição detalhada deste método segue mais adiante).

4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

As CMLP de 3 pacientes diferentes foram semeadas separadamente em placas de 24 poços como descrito acima. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram previamente testadas em um piloto (Arayatrakoollikit et al. 2008). Sendo assim, células em MC ou MO foram estimuladas com 0,1 Unidades (U)/mL de trombina por períodos experimentais distintos com base na análise a ser realizada. Para comprovar se o efeito induzido pela trombina foi especificamente mediado pelo PAR1, as culturas foram pré-tratadas com antagonista do PAR1 (FR 171113 -100 nanomolares (nM)) (Tocris Bioscience Inc, Bristol, UK) por 30 min antes do estímulo com a trombina. Adicionalmente, as células foram expostas ao peptídeo sintético agonista de PAR1, SFLLRN (100nM) (Peptides International Inc., Louisville, KY, USA) somente. Como controle da reação, células cultivadas sem a adição de trombina, sem adição de agonistas de PAR1 e sem adição de antagonistas de PAR1 também foram utilizadas. O meio de cultura e as células foram coletados para análises posteriores.

4.6 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO POR COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA

A mineralização *in vitro* foi analisada aos 7 e 14 dias nas diferentes condições experimentais por marcação com vermelho de alizarina. Células de 3 pacientes diferentes foram plaqueadas separadamente. Para a coloração com vermelho de alizarina, as células foram fixadas com etanol a 70% por 60 min a -20°C. Então, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e coradas com solução de vermelho de alizarina 40 micromolar (mM) (Sigma) por 10 min a temperatura ambiente (TA). O valor de pH para a solução foi ajustado a 4.2 com 25% de hidróxido de amônia anteriormente à coloração. Após a coloração, o excesso de corante foi lavado com água destilada e as imagens digitais dos depósitos minerais foram obtidas com auxílio de uma câmera fotográfica profissional. Para a quantificação dos depósitos de cálcio, foi utilizado o método descrito por Gregory et

al. (2004), com alíquotas (150 mL) do sobrenadante lidas em triplicata ao comprimento de onda de 405 nm e 550 nm em espectrofotômetro (Epoch, Bioteck Instruments, Winooski, Vermont, USA).

4.7 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM SOBRENADANTE

A análise de concentração de cálcio em sobrenadante foi realizada nas diferentes condições experimentais aos 2, 7 e 14 dias de experimento. Células de 3 pacientes diferentes foram plaqueadas separadamente. Ao fim de cada tempo experimental, o sobrenadante foi coletado, transferido para tubos do tipo eppendorf e armazenado a -80°C . A concentração de cálcio no sobrenadante foi estimada pelo Kit de Detecção de Cálcio adquirido da empresa Abcam (Cambridge, UK, ab102505) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de 3 pacientes diferentes foram lidas em triplicata ao comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Epoch, Bioteck Instruments, Winooski, Vermont, USA).

4.8 ENSAIO DE ATIVIDADE DA ALP

A atividade de ALP foi analisada aos 2, 7 e 14 dias de experimento com o uso de kits comercialmente disponíveis pela Abcam (Cambridge, UK, ab83369). Brevemente, poços em duplicata contendo amostras separadas de 3 pacientes diferentes foram lavados duas vezes com PBS e uma solução de p-nitrofenil fosfato foi adicionada (400 mL/poço). Após 10 min de incubação a 37°C , a conversão de p-nitrofenil fosfato em p-nitrofenol pela ALP celular foi interrompida com uma quantidade equivalente de 3N NaOH e então, a absorbância foi mensurada a 450 nm em espectrofotômetro (Epoch, Bioteck Instruments, Winooski, Vermont, USA). A atividade específica de ALP foi expressa em absorbância de p-nitrofenol (OD; 405 nm)/absorbância de WST-1 (OD; 450 nm), o qual pode ser traduzido pela atividade de ALP/ células viáveis.

4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

A proliferação celular aos 2 e 4 dias foi medida utilizando o kit Quick Cell Proliferation Assay (ab65473, Abcam, Cambridge, MA) de acordo com as instruções do fabricante. Este ensaio baseia-se na clivagem do sal de tetrazólio WST-1 em formazano por desidrogenases mitocondriais celulares. A proliferação celular é acompanhada por um aumento da atividade das desidrogenases mitocondriais, o que conduz a um aumento na conversão do sal de tetrazólio, WST-1, em formazano. Resumidamente, as células de 3 pacientes diferentes foram plaqueadas (1×10^5 células) separadamente. Após tratamento com trombina, agonista do PAR-1, ou antagonista do PAR-1+Trombina adicionou-se solução de WST-1 de sal de tetrazólio a cada poço e deixou-se a reação ocorrer por 4 horas. A densidade óptica (formação de formazano) foi medida em duplicata a 440 nm com um comprimento de onda de referência de 650 nm utilizando um leitor de microplacas de precisão (Epoch, Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA).

4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE OPG, RANKL, OC, RUNX2, CEMP1 e CAP ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

A expressão gênica de OPG, RANKL, OC, Runx2, CEMP1 e CAP nas CMLP foi avaliada pelo qPCR nas amostras coletadas aos 2, 7 e 14 dias após cada um dos 4 tratamentos propostos (trombina, agonista do PAR1, antagonista do PAR1 + trombina, controle) . Células de 3 pacientes diferentes foram semeadas separadamente.

O RNA total (tRNA) foi obtido pela homogeneização das amostras em Trizol (isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol- Invitrogen Brasil LTDA (1mL/100µL de amostra)). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 5 min a TA e, então, centrifugadas a 12000 g (15 min, 4°C- Eppendorf Centrifuge 5417 R – Eppendorf, Califórnia, EUA). Posteriormente, 0,8mL da fase superior foram transferidos para um novo tubo (Eppendorf) no qual foram adicionados 0,2mL de

clorofórmio. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão, os tubos foram deixados em repouso por 2-3 min a TA, e posteriormente centrifugados a 12000 g (15 min a 4°C). A fase aquosa sobrenadante (\approx 600 μ L) foi, então, separada e armazenada em um novo tubo.

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

Para a lavagem do tRNA, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 100% (1 mL/mL de Trizol) e posteriormente centrifugado a 7600 g (5 min, 4°C). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 75 % (diluído em água tratada com dietil-pirocarborato (DEPC) 0,01 % e inativada em autoclave). Posteriormente, foi realizada nova centrifugação a 7600 g (5 min, 4°C), sendo os sobrenadantes novamente desprezados. Os tubos foram ainda deixados por 10 min a TA para total secagem do *pellet*, dando-se início à digestão das amostras com DNase I.

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

Para a re-extração do tRNA foram adicionados 50 μ L de água DEPC inativa 0,01% às amostras previamente submetidas ao ensaio de digestão do DNA. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L da mistura fenol saturado em tampão (Invitrogen Brasil LTDA) / clorofórmio 1:1 e, após agitação por inversão, foram incubados por 2-3 min a TA; por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000 g (15 min a 4°C). A seguir, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e a esta foram adicionados 200 μ L de isopropanol 100% (para nova precipitação do RNA). Após agitação por 15 segundos e incubação por 10 min a TA, as amostras foram centrifugadas a 12000 g (10 min a 4°C), sendo o sobrenadante,

então, descartado (vertido). Posteriormente, foram adicionados 500 µL de etanol 100% (para lavagem do *pellet*), as amostras centrifugadas a 7600 g, (5min, 4°C) e o sobrenadante foi novamente descartado (vertido). Foram adicionados então, 500 µL de etanol 75% (para lavagem do *pellet*) precedendo nova centrifugação a 7600 g, (5min, 4°C), bem como nova remoção do sobrenadante, adicionando-se por fim 500 µL de etanol 75% e congelando-se as amostras a -20°C.

Para a quantificação do tRNA, as amostras contendo etanol 75% foram centrifugadas e o *pellet* de tRNA foi seco. Posteriormente, o *pellet* de tRNA foi ressuspenso em volume adequado (≈ 20-30 µL) de água DEPC inativa 0,01%. As absorbâncias foram então medidas a 260 nm em espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer – Eppendorf, Califórnia, EUA), sendo as concentrações de tRNA calculadas considerando a relação 1 AU = 40 µg/ mL, conforme a fórmula: RNA µg/ mL = Abs X Fator de diluição X 40

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

Cuidadosamente, 4 µg de tRNA (amostra) foram avolumados para 10 µL de H₂O DEPC inativa 0,01%. Esta solução foi então aquecida a 65°C por 5 min, seguida por choque térmico em gelo. A esta solução foram adicionados 10 µL de um mix contendo 1 µL de oligo dT (0,5 µg/ µL – Invitrogen Brasil LTDA); 1 µL da mistura de trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTPs), a saber – 10 mM de dATP, 10 mM de dTTP, 10 mM de dCTP e 10 mM de dGTP – Invitrogen Brasil LTDA; 4 µL de tampão de reação (5 x first strand buffer), 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase OUT (40 U/ µL) e, por último, 1 µL da enzima Superscript II (200 U/ µL). A fim de assegurar a ausência de DNA na amostra foram utilizados controles negativo da reação RT, consistindo de “*pool*” de RNAs contendo todos os reagentes citados anteriormente com omissão da *Superscript II*.

A mistura foi posteriormente homogeneizada e incubada a 42°C durante 50 min em banho-maria, sendo posteriormente incubada a 70°C durante 15 min para inativação da enzima. As amostras foram, então, mantidas a -20°C até serem submetidas ao qPCR.

A reação qPCR foi realizada em um volume final de 12,5 µL contendo 1 µL de cDNA (transcrito anteriormente), 0,5 µL do oligonucleotídeo sense (10⁻⁵ M), 0,5 µL do oligonucleotídeo antisense (10⁻⁵ M); 4,25 µL de água DEPC e por fim 6,25 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), o qual contém

Platinum® Taq DNA polimerase, corante SYBR® green I, TRIS-HCl, KCl, 6 mM MgCl₂, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 800 µM dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e agentes estabilizadores.

Os oligonucleotídeos para OPG, RANKL, OC, Runx2, CEMP1 e CAP foram extraídos do *GenBank* e foram desenhados com o auxílio do software Primer3. As sequências geradas no programa Primer3 também foram analisadas no *Blast* quanto à especificidade e tamanho do fragmento. Os números de acesso ao *GeneBank* das sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cDNA foram os seguintes: OPG, Hs00171068-m1; RANKL, Hs00243519-m1; OC, Hs00609452_g1; RUNX2, NM-004348; CEMP1, Hs04185363_s1; CAP, Hs00171965_m1 e GAPDH, a qual foi utilizada como gene constitutivo, NM_002046 (Tabela 1).

As reações de qPCR foram realizadas em triplicada em placas de 96-poços utilizando-se um termociclador nas seguintes condições: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 15s a 95°C e 60°C por 2 min. Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o equipamento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Foi determinado para cada amostra o primeiro ponto abaixo do corte fixo do produto de PCR (termed cycle threshold, Ct). As alterações na expressão do gene alvo foram calculadas usando $2^{-\Delta Ct}$, onde ΔCt da amostra experimental (Ct gene alvo/Ct GAPDH) foi dividido pelo da amostra controle (Ct gene alvo/ Ct GAPDH). Os experimentos contendo células de 3 pacientes diferentes foram apresentados em expressão gênica relativa (RQ) e foram repetidos três vezes.

Tabela 4.1 – Sequência dos primers utilizados para amplificação do cDNA

Gene	Sequência (Forward e Reverse)	GenBank No.	Tamanho do fragmento (bp)
PAR1 (R)	59-AAATGACCGGGGATCTAAGGTGGCA-39	NM_001992.3	90
PAR1 (F)	59-AGTCTGTGCGGCCCGCTGTT-39		
GAPDH (R)	59-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-39	NM_002046	189
GAPDH (F)	59-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-39		
RANKL (R)	5'-GAAGGGTTGGACACCTGAA TGC-3'	Hs00243519-m1	67
RANKL (F)	5'-5'-CACACCTCACCATCAATGCT GC-3',		
OPG (R)	5'GACATCTTTTGC AAACCGTGT3'	NM_057149.1	146
OPG (F)	5'CCCATCGGGTTC CCATAAAGTC3'		
OC (R)	5'GGTGCCATAGATGCGCTTG3'	NM_013414.1	172
OC (F)	5'GGTGCCATAGATGCGCTTG3'		
Runx2 (R)	5'GGGACCATTGGGA ACTGATAGG3'	NM-004348	199
Runx2 (F)	5'ATCCAGCCACCTTCACTTACACC3'		
CEMP-1 (R)	5'-CCCCATTAGTGTCATCCTGC-3	NC_000016.10	109
CEMP-1 (F)	5'-ATGGGCACATCAAGCAVCTGA-3'		
CAP (R)	5'-AAGCGTACCATAGCAATAGCAAGA-3'	Hs00171965_m1	160
CAP (F)	5'-GTGAGGAGGACGGCACCAA-3'		

4.11 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE RUNX2, OPG, OC E OPN.

Nas amostras obtidas dos meios de cultura (MC e MO) após os tratamentos propostos (trombina, agonista do PAR1, antagonista do PAR1 + trombina, controle), os níveis de OPG, OPN, OC e RUNX2 foram avaliados por meio do uso de kits ELISA comercialmente disponíveis (MyBioSource.com, GenWay Biotech). Para este ensaio, amostras separadas de 3 pacientes diferentes foram utilizadas para os experimentos. As reações foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em picogramas (pg)/ml.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

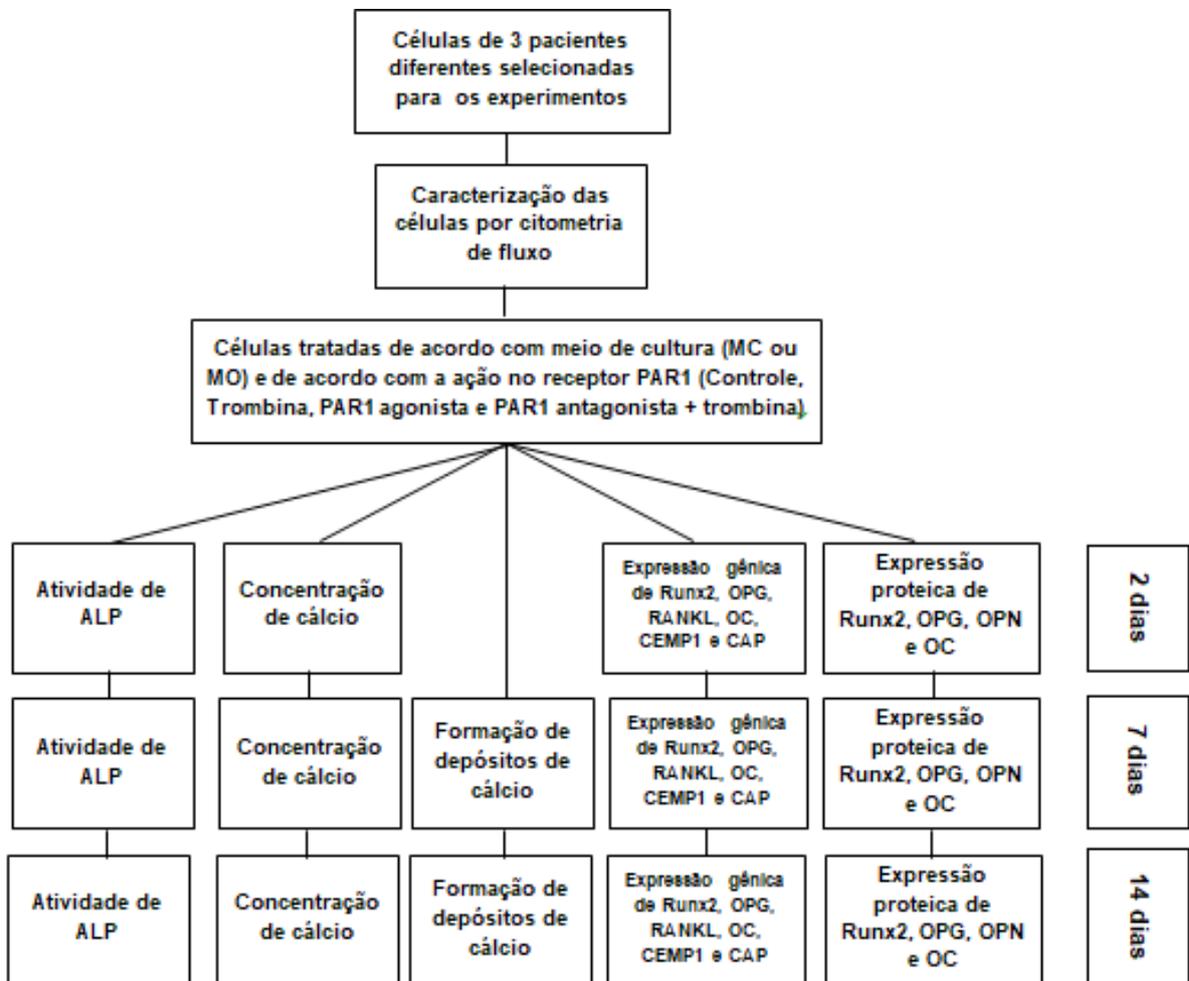
A análise estatística do presente estudo foi realizada com auxílio do programa GraphPadPrism 5.0.

Primeiramente, todos os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste One-Way ANOVA com post hoc Tukey foi utilizado para dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal Wallis com post hoc Duncan foi utilizado. O nível de significância de 5% foi utilizado para todas as análises.

5 RESULTADOS

Para os experimentos realizados neste estudo, CMLP foram obtidas de terceiros molares hígidos de 3 pacientes jovens e saudáveis, 2 mulheres e 1 homem (idade: $20,33 \pm 2,40$), que procuravam por atendimento na clínica de pós-graduação da cirurgia na FOUSP. A figura 5.1 ilustra as etapas e experimentos realizados.

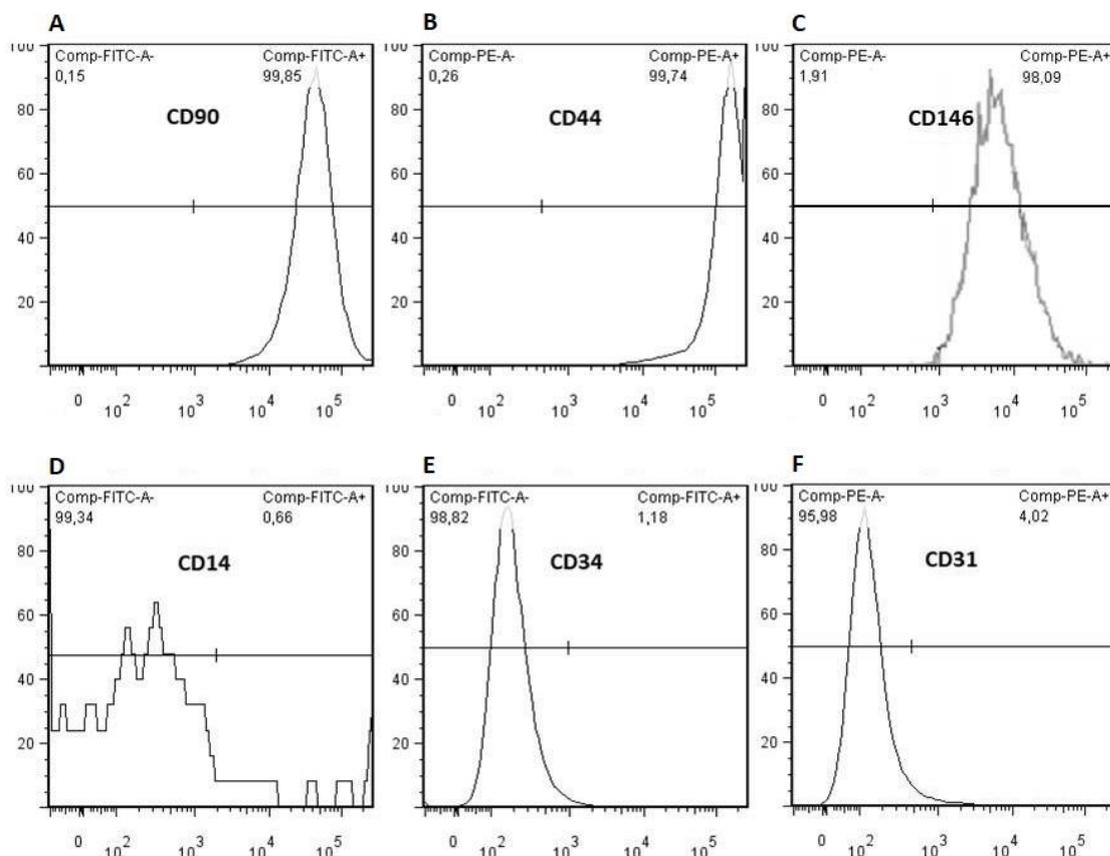
Figura 5.1 – Fluxograma do estudo



5.1 PERFIL CARACTERÍSTICO DAS CMLP

Os marcadores de superfície celular foram analisados através da citometria de fluxo (Figura 5.2). As células foram positivas para CD90 (99,85%), CD44 (99,75%) e CD146 (98,09%), e negativas para CD14 (0,66%), CD34 (1,18%) e CD31 (4,02%).

Figura 5.2 – Caracterização das células através da citometria de fluxo

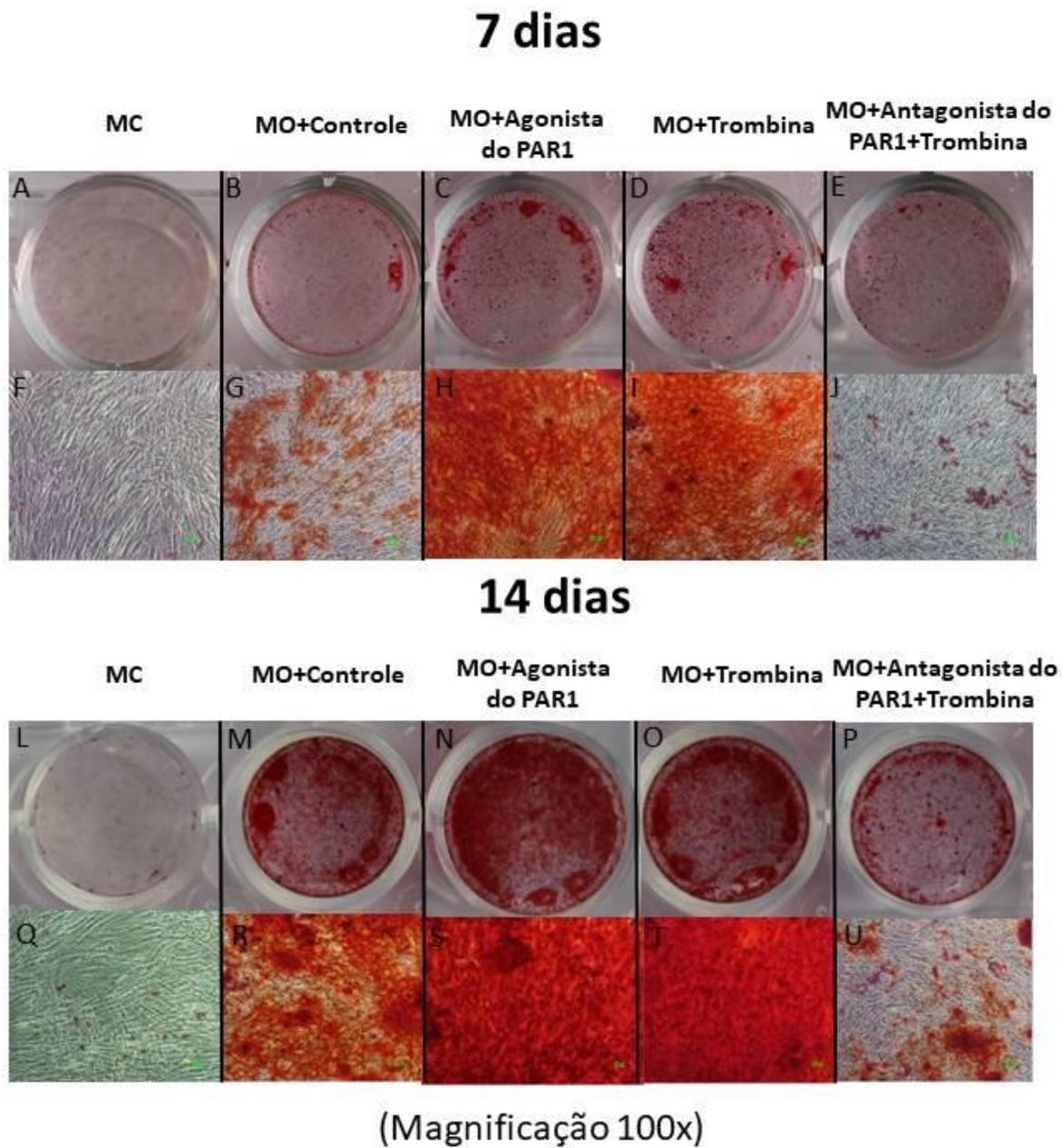


A: Marcação para CD90; B: Marcação para CD44; C: Marcação para CD146; D: Marcação para CD14; E: Marcação para CD34; F: Marcação para CD31.

5.2 A ATIVAÇÃO DO PAR1 LEVA À MAIOR DEPOSIÇÃO DE CÁLCIO EM CMLP

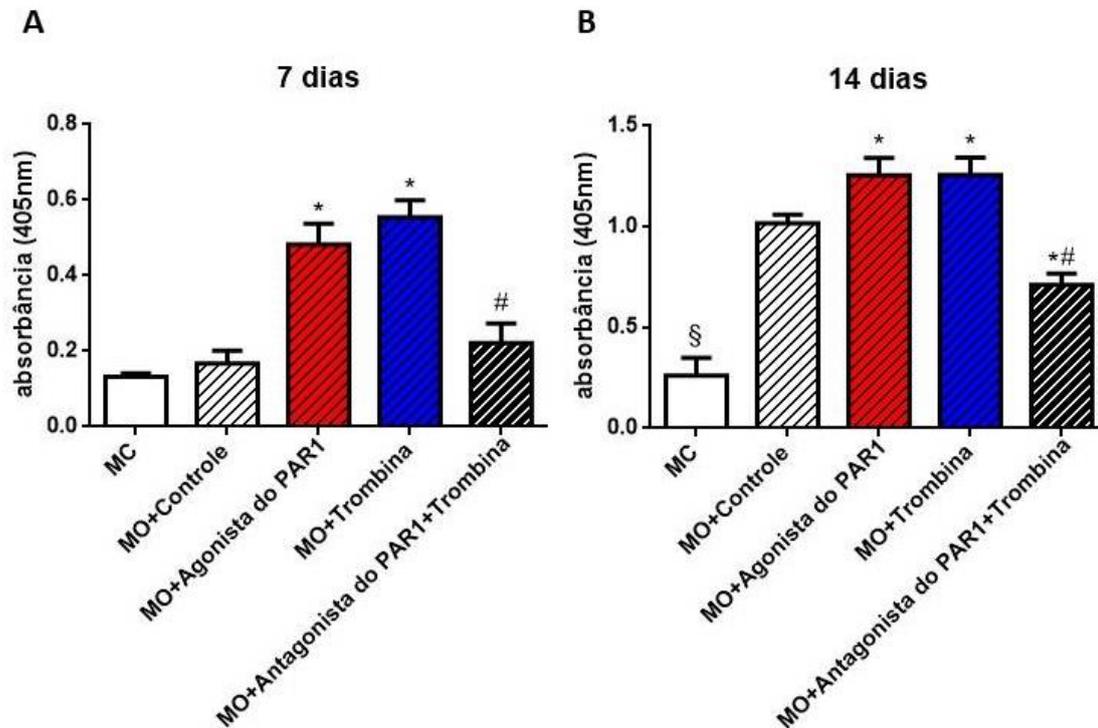
A formação de depósitos de cálcio foi avaliada através da coloração com vermelho de alizarina aos 7 e 14 dias (Figura 5.3 e 5.4). De uma maneira geral, uma maior formação de depósitos de cálcio foi observada nos grupos com MO em comparação com o MC. Após 7 dias, o tratamento com a trombina e o peptídeo agonista do PAR1 levaram a um aumento significativo na formação de depósitos de cálcio em comparação com o MO+Controle ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com o antagonista do PAR1 impediu a ação da trombina, ($p < 0,05$), sugerindo que o aumento na formação de depósitos de cálcio pela trombina foi mediado especificamente pelo receptor PAR1. Aos 14 dias, com exceção do MC, todos os grupos apresentaram níveis elevados de coloração com vermelho de alizarina. Assim como observado aos 7 dias, a ativação do PAR1 pela trombina e seu peptídeo agonista aumentou a formação de depósitos de cálcio quando comparados ao MO+Controle ($p < 0,05$), enquanto o tratamento com o antagonista do PAR1+trombina diminuiu significativamente a formação de depósitos mineralizados ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos MO+Controle, MO+Trombina e MO+Agonista do PAR1 (Figura 5.3 e 5.4).

Figura 5.3 – Efeitos do PAR1 na formação de depósitos de cálcio após 7 e 14 dias de experimento



A-J e L-U) Efeitos do PAR1 na formação de depósitos de cálcio pela coloração de vermelho de alizarina após 7 e 14 dias (A-E e L-P: zero de magnificação, F-J e Q-U: Magnificação 100x).

Figura 5.4 – Análise quantitativa do ensaio do vermelho de alizarina após 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão em média e desvio padrão (DP); n = 3 pacientes



A e B) Análise quantitativa da formação de depósitos de cálcio após 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão em média e SD; n = 3 pacientes diferentes.

*: Diferença significativa quando comparado com o grupo MO+Controle ($p < 0,05$).

#: Diferença significativa quando comparado com o grupo MO+Trombina ($p < 0,05$).

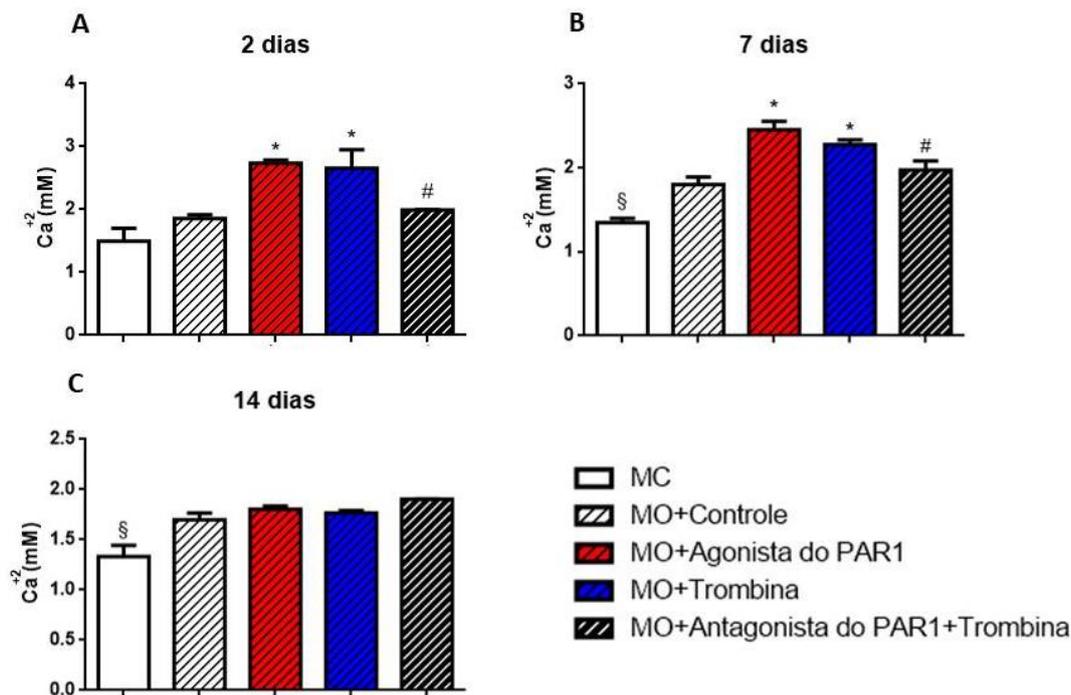
§: Diferença significativa quando comparado aos grupos tratados com MO ($p < 0,05$).

5.3 ATIVAÇÃO DO PAR1 AUMENTOU A CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM CMLP

A concentração de cálcio em sobrenadante foi avaliada após 2, 7 e 14 dias de experimento (Figura 5.5). Corroborando com os achados do ensaio de depósito de cálcio, aos 2 e 7 dias, os tratamentos com agonista do PAR1 e a trombina resultaram de formas similares em um aumento significativo na concentração de cálcio quando comparados com MC e o MO+Controle ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com o antagonista do PAR1 impediu o aumento da concentração de cálcio pela ação da trombina, sugerindo que a ação da trombina foi mediada especificamente pela ativação do PAR1. ($p < 0,05$). Após 14 dias, não houve diferença

significativa entre os grupos tratados com MO, enquanto a menor concentração de cálcio foi demonstrada no MC.

Figura 5.5 – Análise de concentração de cálcio após 2, 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



A: Análise de concentração de cálcio aos 2 dias ; B: Análise de concentração de cálcio aos 7 dias; C: Análise de concentração de cálcio aos 14 dias.

*: Diferença significativa quando comparado com o grupo MO+Controle ($p < 0,05$).

#: Diferença significativa quando comparada com o grupo MO+Trombina ($p < 0,05$).

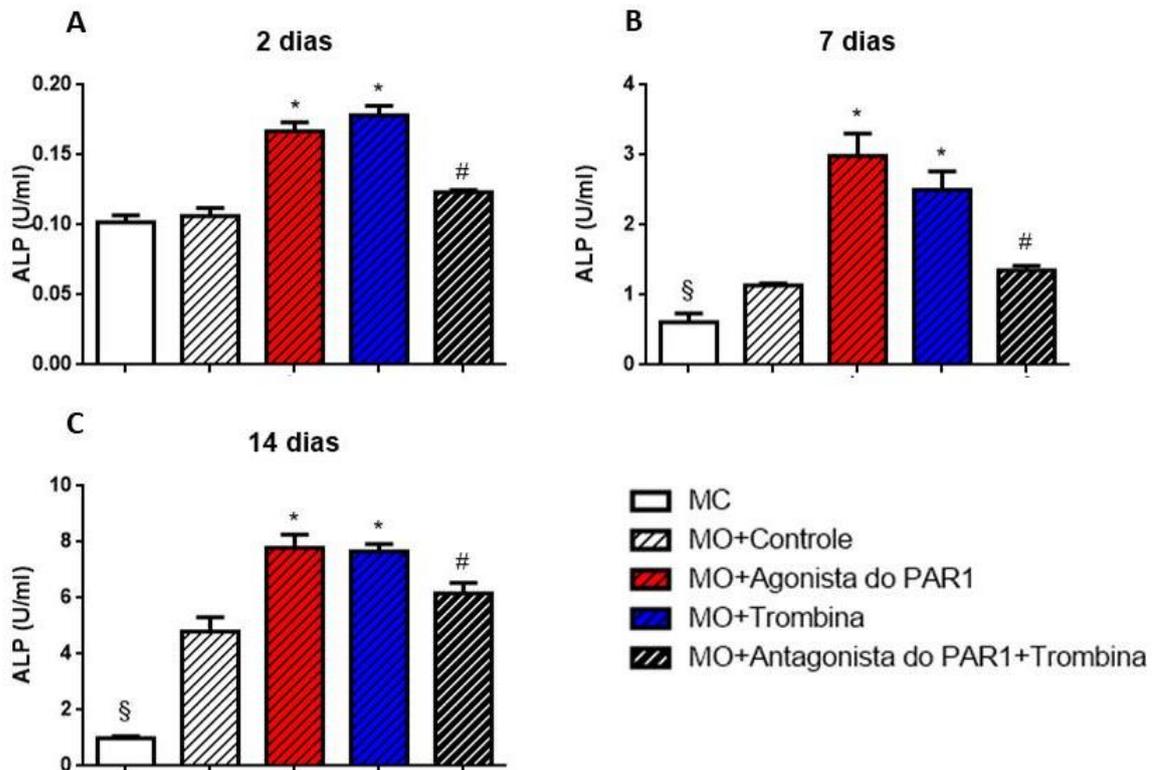
§: Diferença significativa quando comparada aos grupos tratados com MO ($p < 0,05$).

5.4 EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NA ATIVIDADE DE ALP

A atividade da ALP foi avaliada aos 2, 7 e 14 dias (Figura 5.6). Em todos os tempos experimentais, os tratamentos com o agonista do PAR1 e a trombina resultaram de formas similares no aumento da atividade de ALP em comparação com o grupo MO+Controle ($p < 0,05$). Além disso, o bloqueio do receptor pelo seu antagonista impediu a ação da trombina, sugerindo que a ação foi mediada pelo

PAR1 ($p < 0,05$). Aos 7 e 14 dias, observou-se uma menor atividade de ALP no grupo MC em comparação com os grupos tratados com MO ($p < 0,05$).

Figura 5.6 – Análise de atividade de ALP após 2, 7 e 14 dias de experimento. Os dados estão apresentados em média e DP; $n = 3$ pacientes



A: Análise da atividade de ALP aos 2 dias ; B: Análise da atividade de ALP aos 7 dias; C: Análise da atividade de ALP aos 14 dias.

*: Diferença significativa quando comparado com o grupo MO+Controle ($p < 0,05$).

#: Diferença significativa quando comparado com o grupo MO+Trombina ($p < 0,05$).

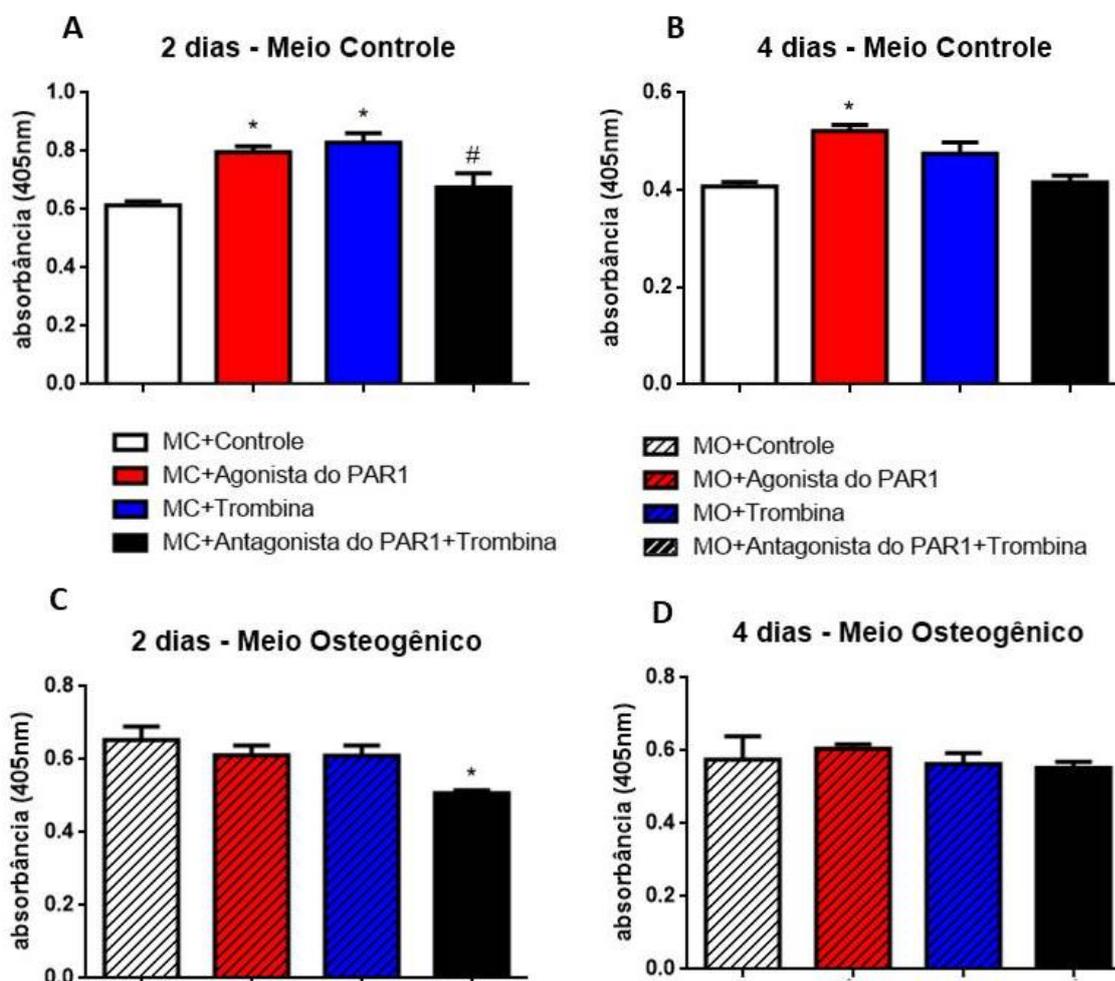
§: Diferença significativa quando comparado aos grupos tratados com MO ($p < 0,05$).

5.5 EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi avaliada em 2 e 4 dias (Figura 5.7). A ativação do PAR1 através do agonista do PAR1 e da trombina aumentou de forma similar a taxa de proliferação celular, aos 2 dias, no MC. Além disso, o bloqueio do PAR1 impediu a ação trombina, indicando que a ação foi mediada especificamente pelo receptor PAR1. Aos 4 dias, no meio controle, a ativação do PAR1 pelo peptídeo agonista específico aumentou a proliferação celular quando comparado com o controle

($p < 0,05$). Com relação ao MO, o bloqueio do PAR1 diminuiu a taxa de proliferação celular em comparação com o controle, aos 2 dias (Figura 5.7). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos aos 4 dias, no MO.

Figura 5.7 – Análise de proliferação celular após 2 e 4 dias de experimento. Os dados estão apresentados em média e DP; $n = 3$ pacientes



A: Análise de proliferação dos grupos em MC aos 2 dias; B: Análise de proliferação dos grupos em MC aos 4 dias; C: Análise de proliferação dos grupos em MO aos 2 dias; D: Análise de proliferação dos grupos em MO aos 4 dias.

*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle ($p < 0,05$).

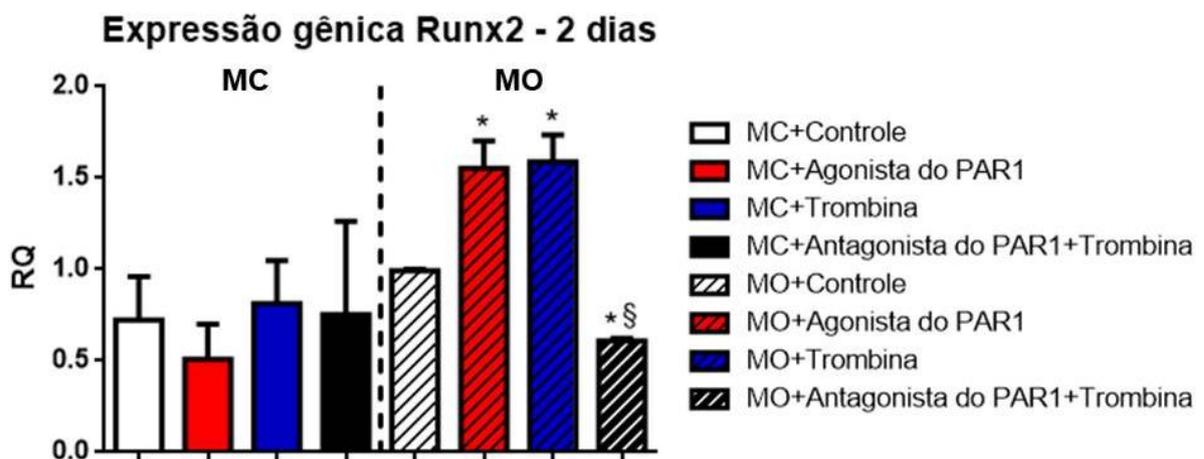
#: Diferença significativa quando comparada com o grupo Trombina ($p < 0,05$).

5.6 EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES OSTEOGÊNICOS E CEMENTOGÊNICOS

Neste estudo, as expressões dos fatores osteogênicos (Runx2, OPG, OC e RANKL) e cementogênicos (CEMP1 e CAP) foram avaliadas por qPCR. Nesse experimento, as células foram tratadas com MC e MO na presença de trombina, agonista específico do PAR1 e antagonista do PAR1+trombina, nos tempos 2, 7 e 14 dias.

Aos 2 dias, os resultados demonstraram que os tratamentos com trombina e agonista do PAR1 estimularam o aumento significativo da expressão gênica de Runx2 no MO ($p < 0,05$) (Figura 5.8). Além disso, o bloqueio do PAR1 com o seu antagonista específico impediu esta ação, sugerindo que a ação da trombina foi mediada especificamente pelo PAR1 ($p < 0,05$). Aos 7 dias, no MC, o mesmo padrão foi observado (Figura 5.9). Nenhuma diferença significativa foi observada nos outros tempos experimentais (Figura 5.10).

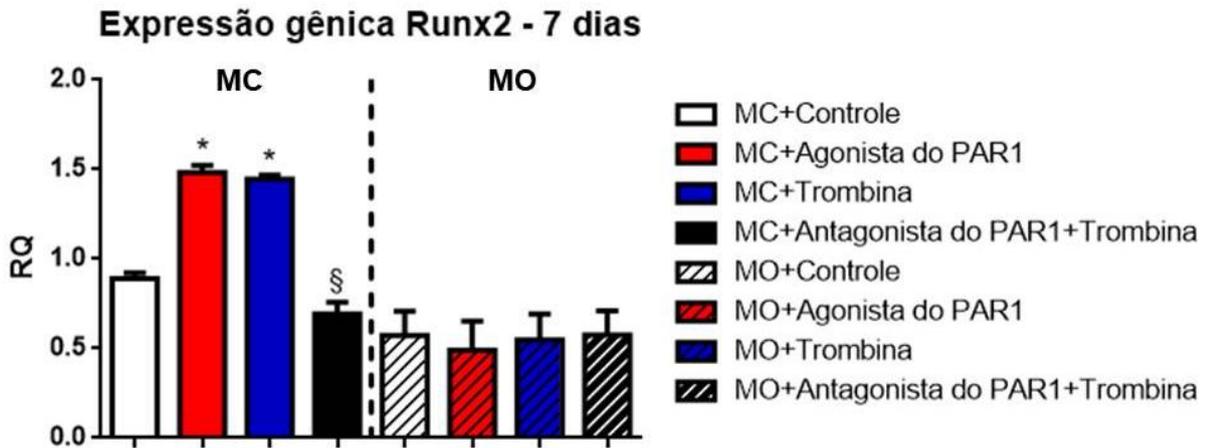
Figura 5.8 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de Runx2 aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

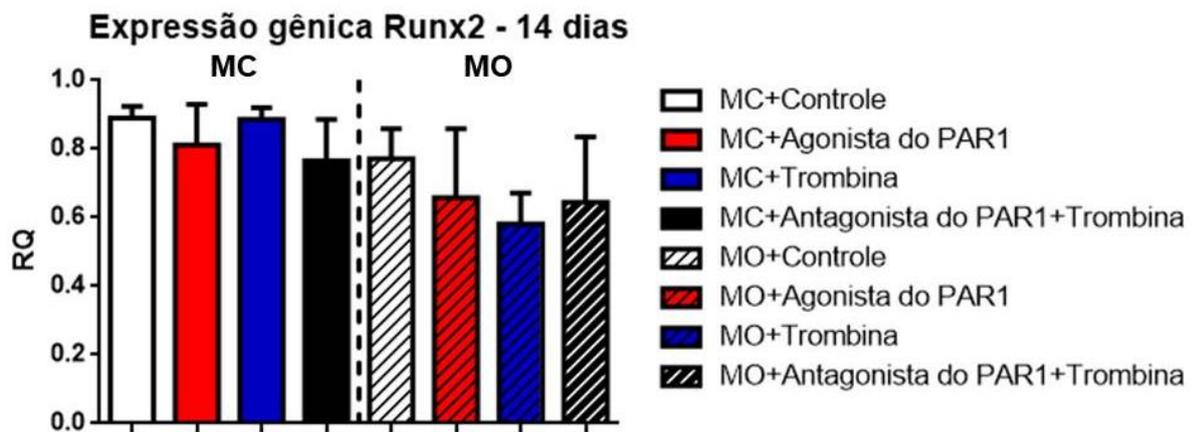
Figura 5.9 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de Runx2 aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Figura 5.10 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de Runx2 aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



Em relação à expressão gênica de OPG, aos 7 dias, no MC, a ativação do PAR1 pela trombina e agonista PAR1 levaram ao aumento da expressão de OPG em comparação com o controle ($p < 0,05$), enquanto o tratamento com antagonista do PAR1 impediu esse efeito ($p < 0,05$) (Figura 5.12). Não foram encontradas diferenças significativas nos outros tempos experimentais (Figuras 5.11 e 5.13).

Figura 5.11 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OPG aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; $n = 3$ pacientes

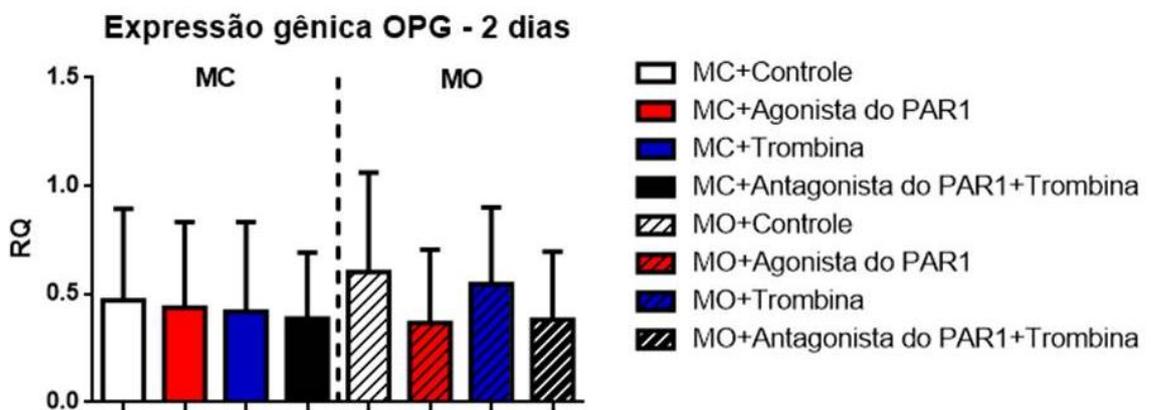
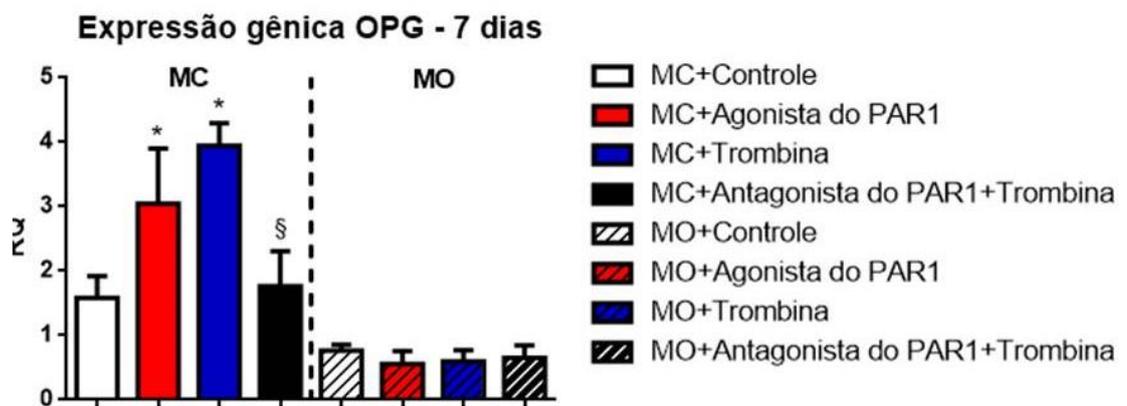


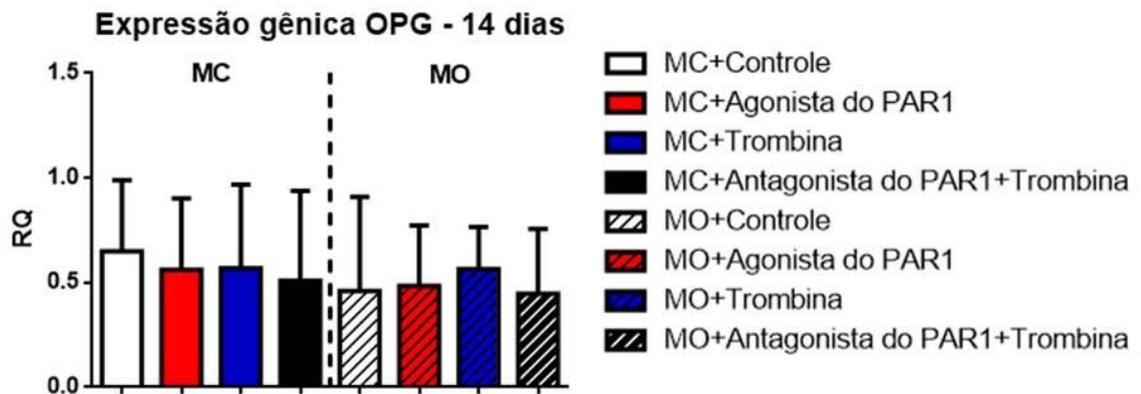
Figura 5.12 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OPG aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; $n = 3$ pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

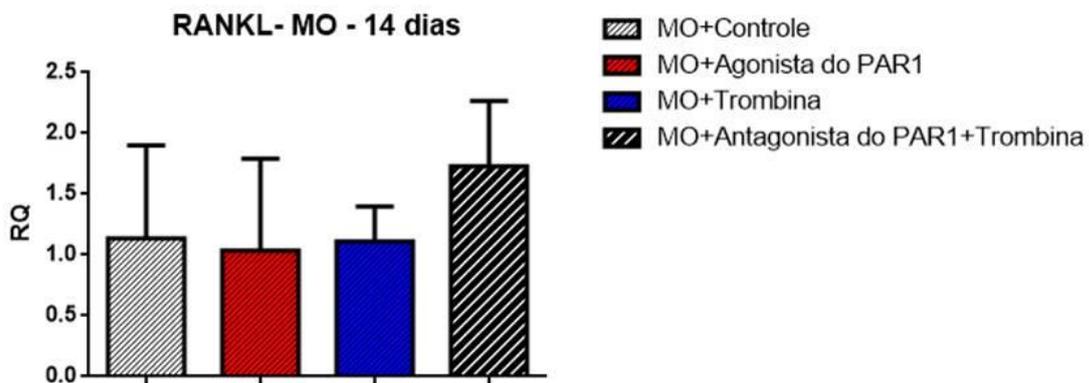
§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Figura 5.13 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OPG aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



Expressão gênica significativa de RANKL foi observada apenas aos 14 dias, no MO, no entanto, sem diferença estatística entre os tratamentos (Figura 5.14).

Figura 5.14 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de RANKL aos 14 dias, no meio osteogênico. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



A ativação do PAR1 não alterou significativamente a expressão gênica de OC em nenhum dos tempos experimentais e meios de cultura (Figuras 5.15, 5.16 e 5.17).

Figura 5.15 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OC aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

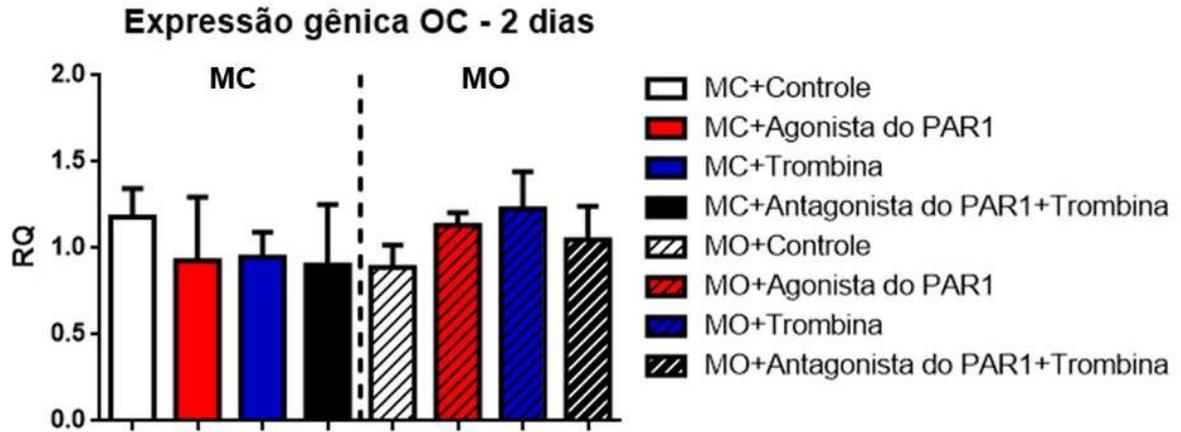


Figura 5.16 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OC aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

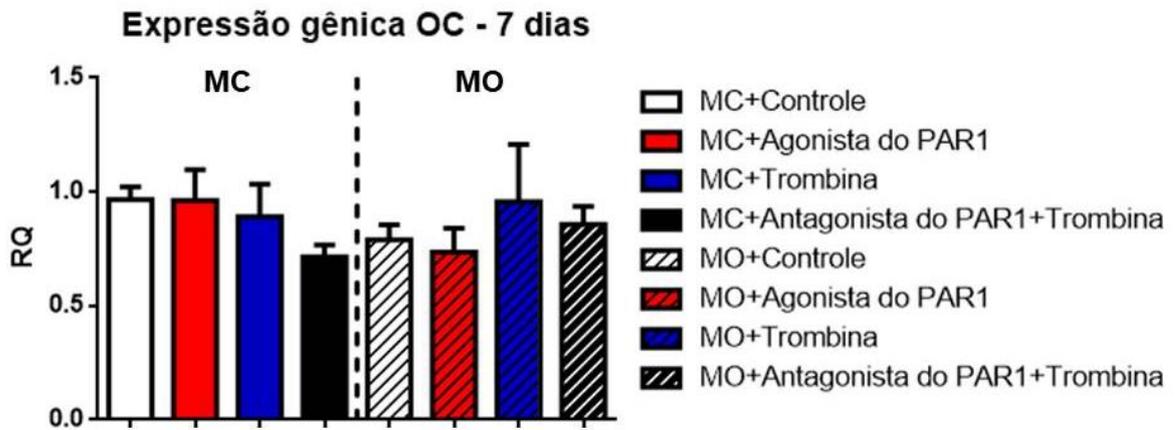
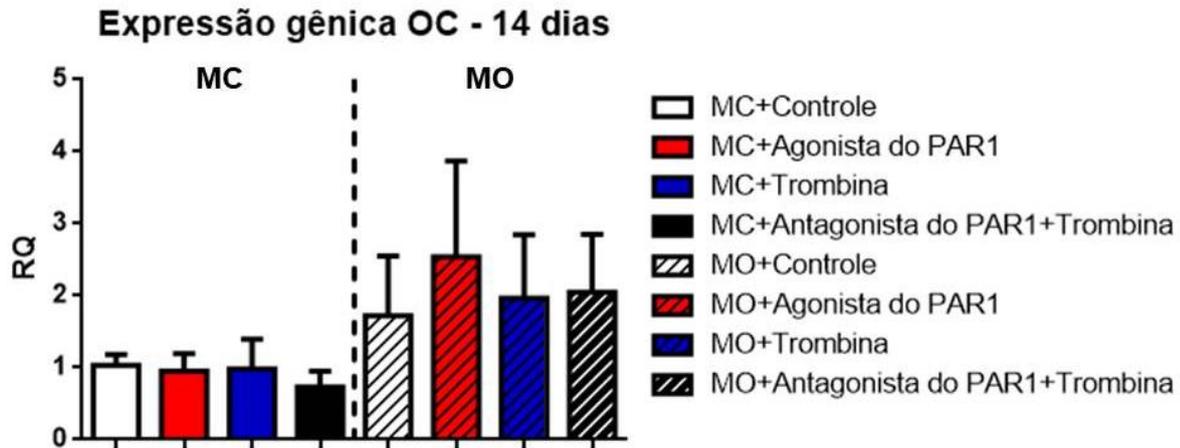
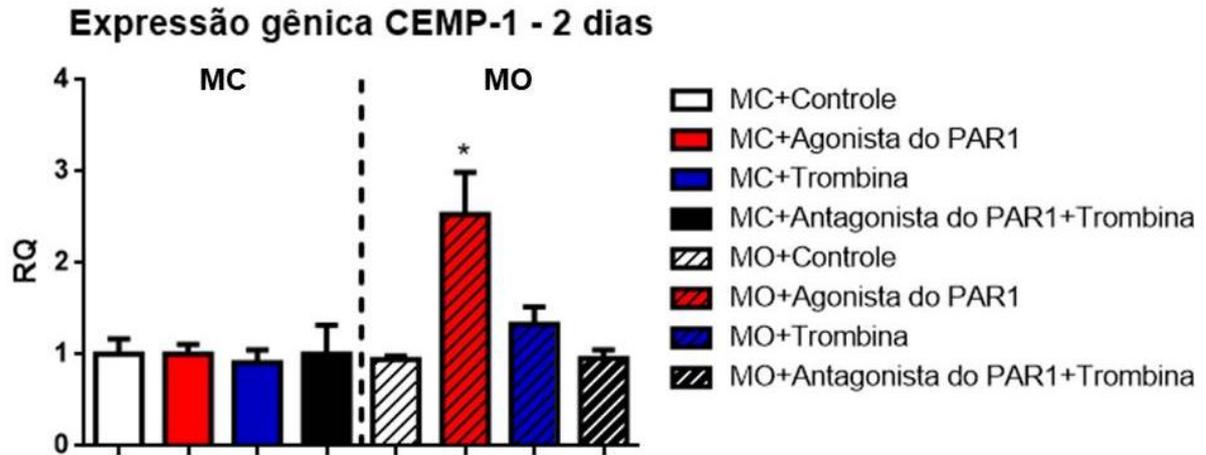


Figura 5.17 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de OC aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



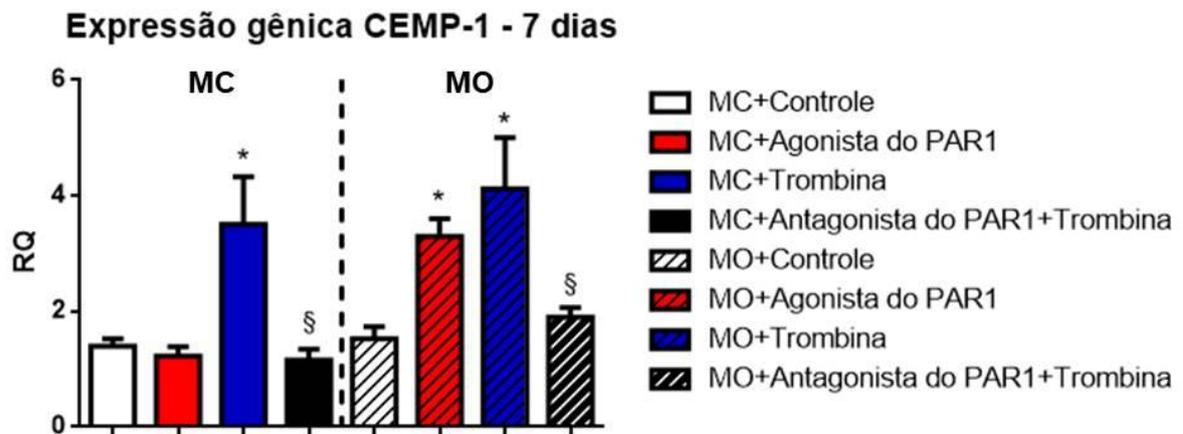
Na análise da expressão dos fatores cementogênicos, aos 2 dias, no MO, apenas a ativação do PAR1 pelo agonista específico aumentou a expressão gênica de CEMP1 ($p < 0,05$) (Figura 5.18). Além disso, a ativação do PAR1 aumentou a expressão gênica de CEMP1, aos 7 dias ($p < 0,05$), enquanto o bloqueio do PAR1 impediu este efeito ($p < 0,05$) (Figura 5.19). Aos 14 dias, o tratamento com a trombina aumentou a expressão de CEMP-1 em comparação com o controle, e esse efeito não foi afetado pelo tratamento com o antagonista do PAR1, sugerindo que neste tempo específico, esse efeito não foi mediado pelo PAR1 ($p < 0,05$) (Figura 5.20).

Figura 5.18 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CEMP1 aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

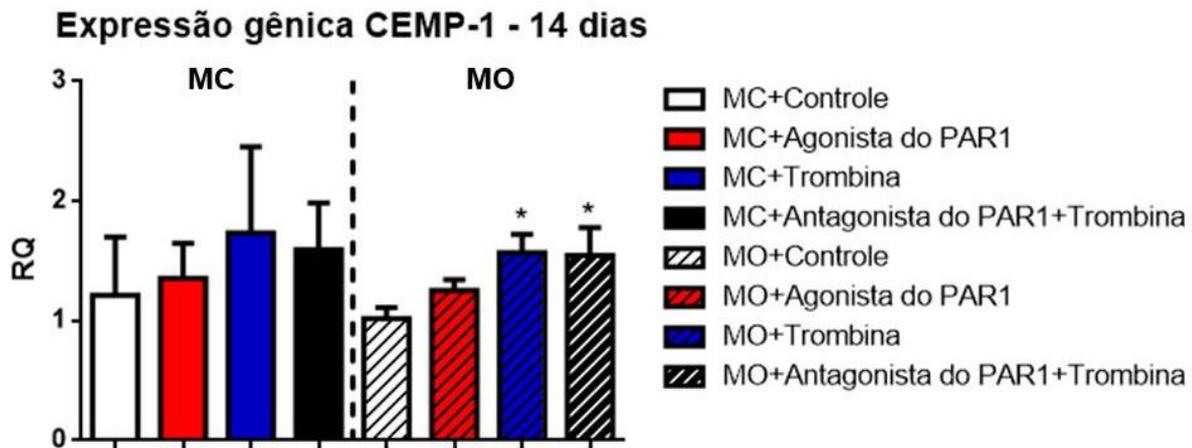
Figura 5.19 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CEMP1 aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Figura 5.20 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CEMP1 aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

A ativação do PAR1 não alterou a expressão gênica de CAP em nenhum dos tempos experimentais e meios de cultura (Figuras 5.21, 5.22 e 5.23).

Figura 5.21 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CAP aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

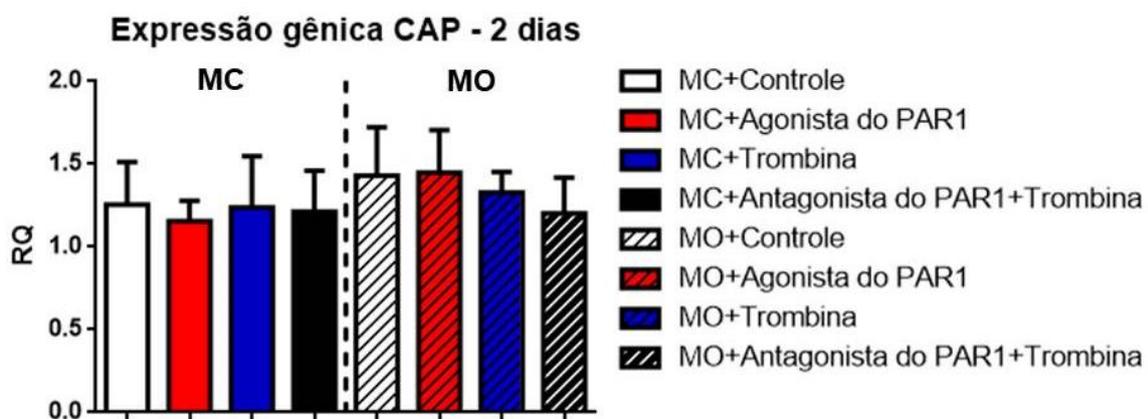


Figura 5.22 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CAP aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

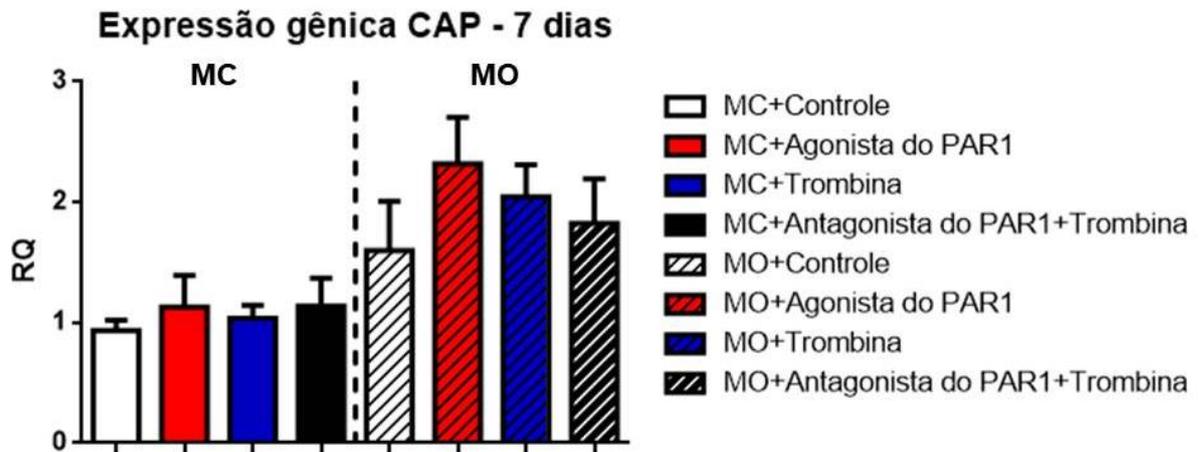
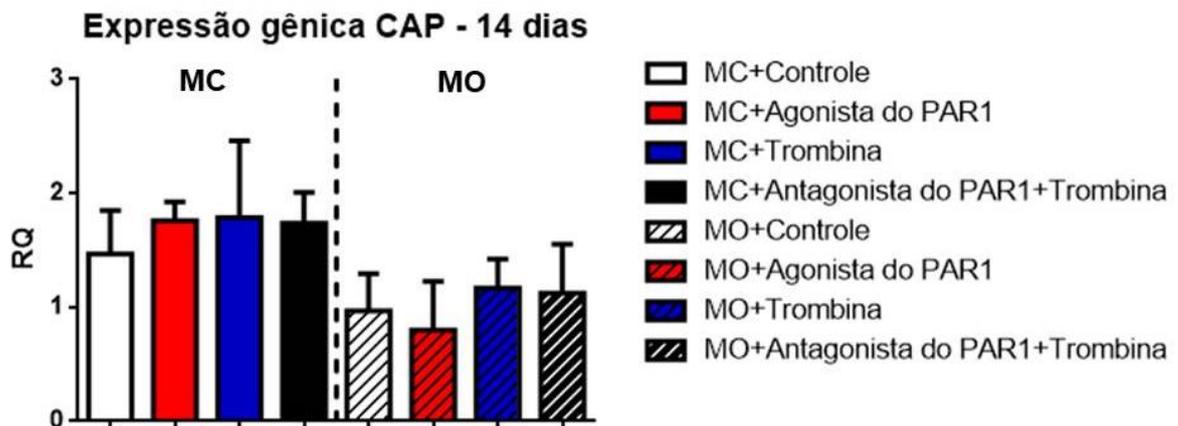


Figura 5.23 – Efeito da ativação do PAR1 na expressão gênica de CAP aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

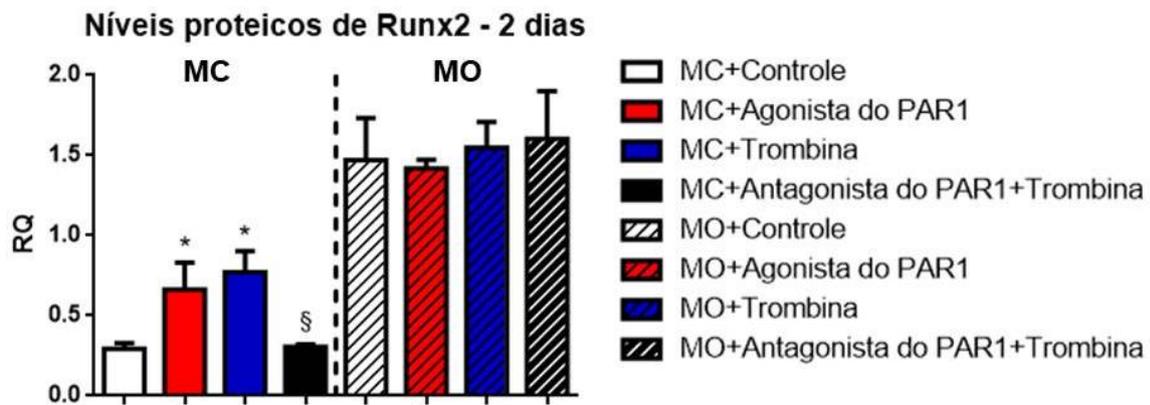


5.7 EFEITO DA ATIVAÇÃO DO PAR1 NOS NÍVEIS PROTEICOS DE FATORES OSTEOGÊNICOS

Aos 2 dias, no MC, a ativação do PAR1 pela trombina e agonista do PAR1 levaram a um aumento nos níveis proteicos de Runx2 ($p < 0,05$) (Figura 5.24). Ainda, neste mesmo tempo experimental, o bloqueio do receptor impediu essa ação da

trombina ($p < 0,05$). Aos 14 dias, no MO, o mesmo padrão foi observado (Figura 5.26). Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos outros tempos experimentais e meios de cultura (Figura 5.25).

Figura 5.24 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de Runx2 aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; $n = 3$ pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Figura 5.25 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de Runx2 aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; $n = 3$ pacientes

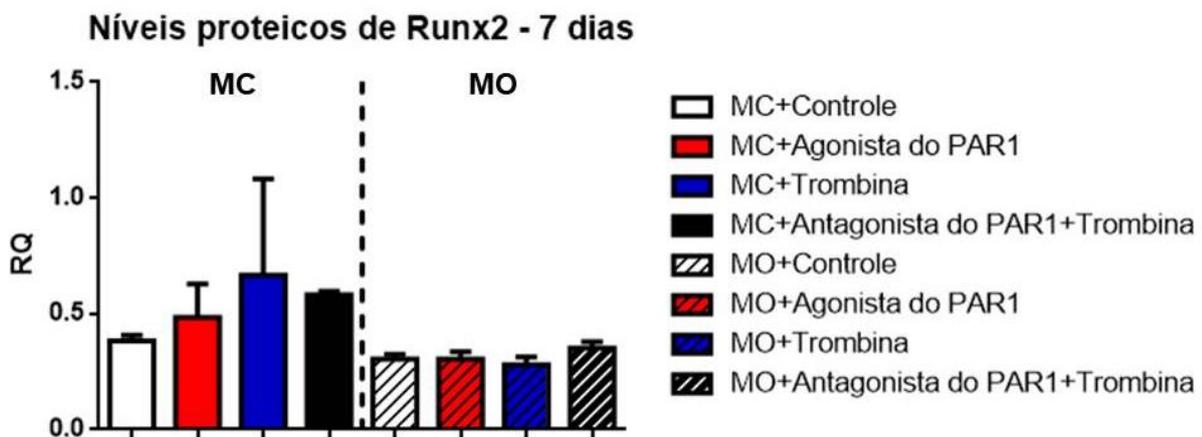
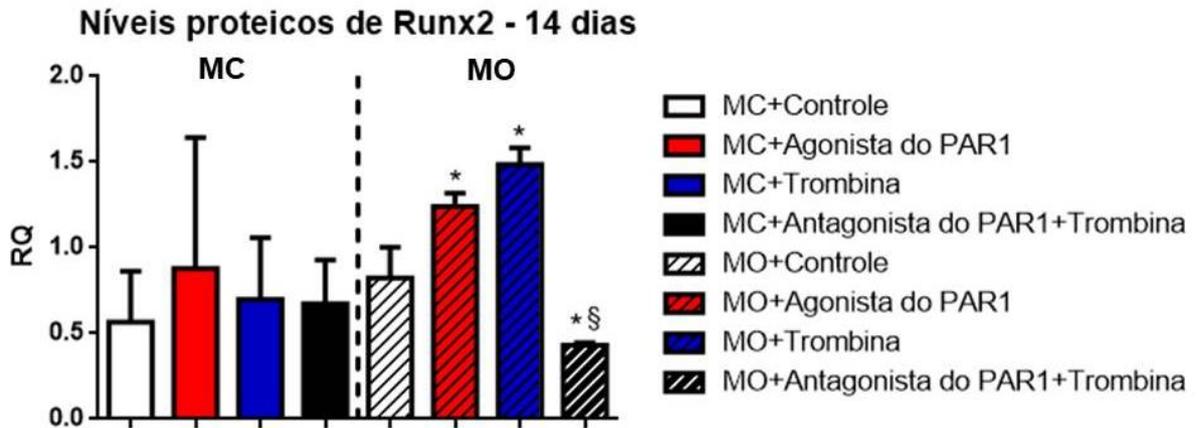


Figura 5.26 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de Runx2 aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

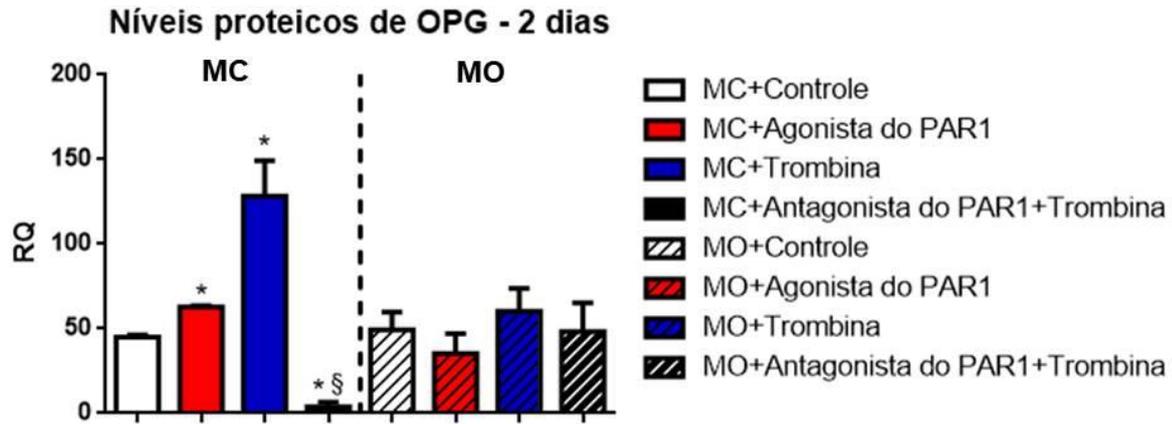


*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Em relação ao efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG, aos 2 dias, no MC, a ativação do receptor elevou os níveis de OPG em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto o seu bloqueio impediu este efeito ($p < 0,05$) (Figura 5.27). Aos 7 dias, no MO, o tratamento com a trombina aumentou profundamente os níveis de OPG em comparação com todos os grupos ($p < 0,05$), enquanto o bloqueio do PAR1 com o seu antagonista específico diminuiu significativamente este efeito ($p < 0,05$) (Figura 5.28). Além disso, após 14 dias, no MC, o tratamento com a trombina e o antagonista do PAR1 aumentou os níveis de OPG em comparação com os grupos controle e agonista do PAR1 ($p < 0,05$) (Figura 5.29). Não foram encontradas diferenças significativas nos outros tempos experimentais.

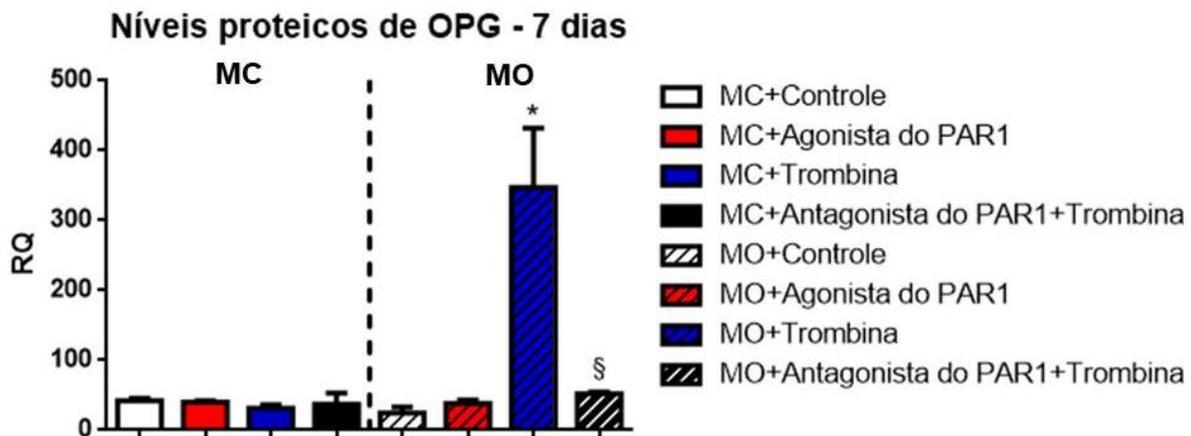
Figura 5.27 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

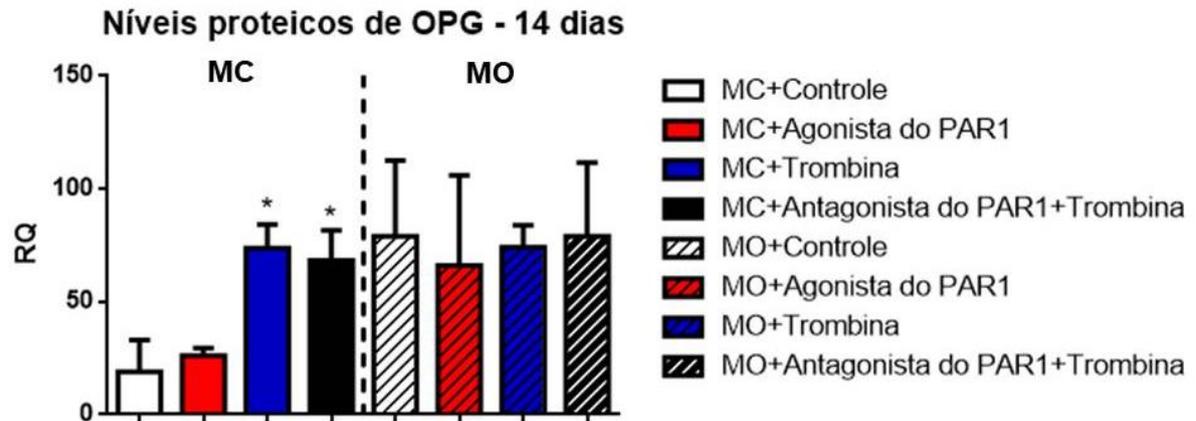
Figura 5.28 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

§: Diferença significativa quando comparado com o grupo Trombina do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Figura 5.29 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPG aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



*: Diferença significativa quando comparado com o grupo Controle do mesmo tempo experimental e meio de cultura ($p < 0,05$).

Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamentos nos diferentes tempos experimentais avaliados em relação aos níveis proteicos de OC e OPN (Figuras 5.30 a 5.35).

Figura 5.30 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OC aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

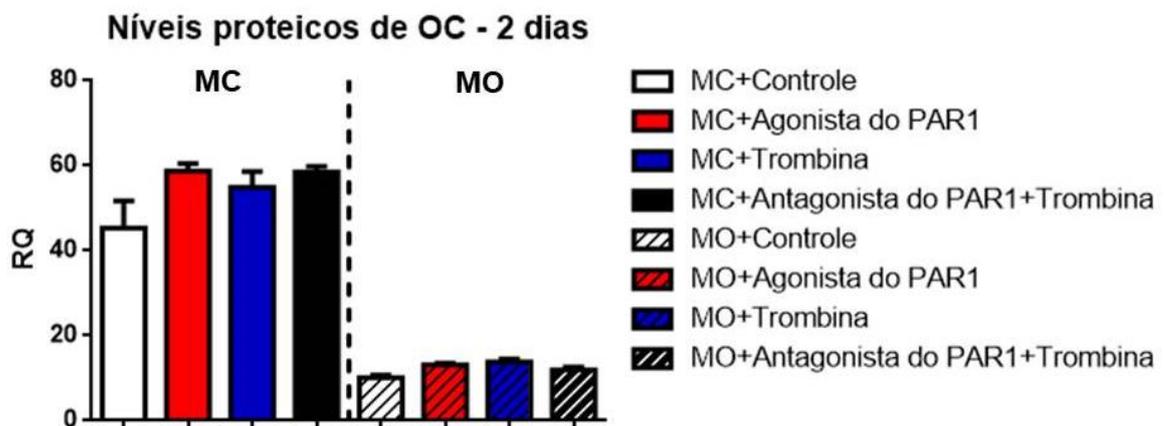


Figura 5.31 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OC aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

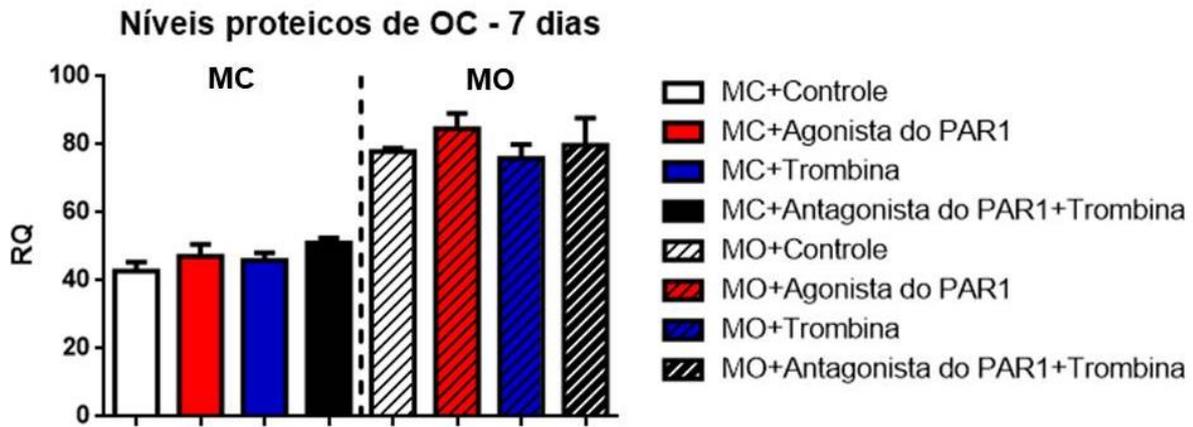


Figura 5.32 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OC aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

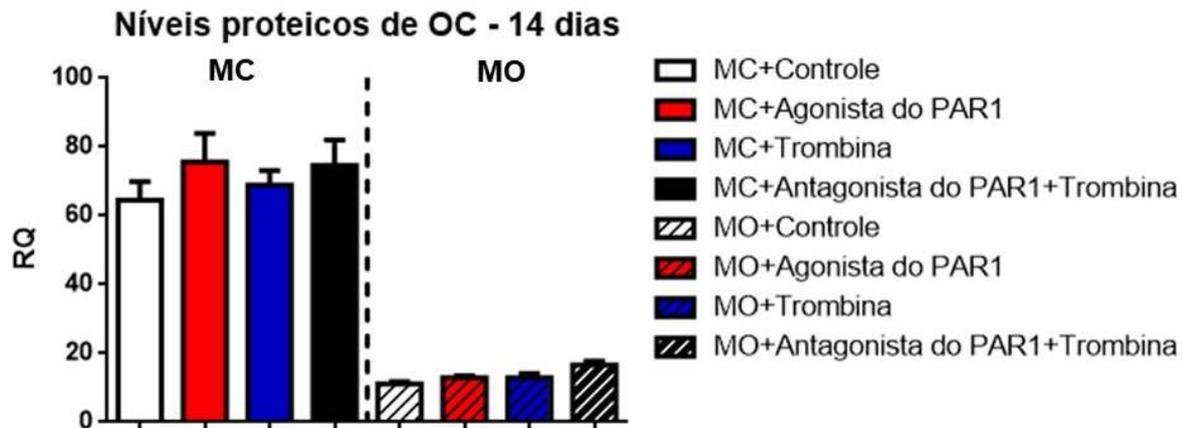


Figura 5.33 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPN aos 2 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

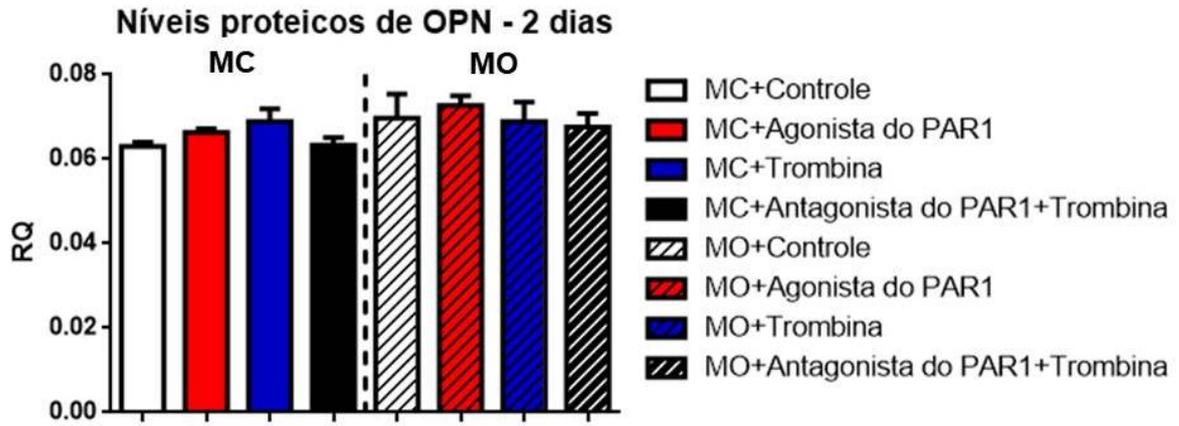


Figura 5.34 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPN aos 7 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes

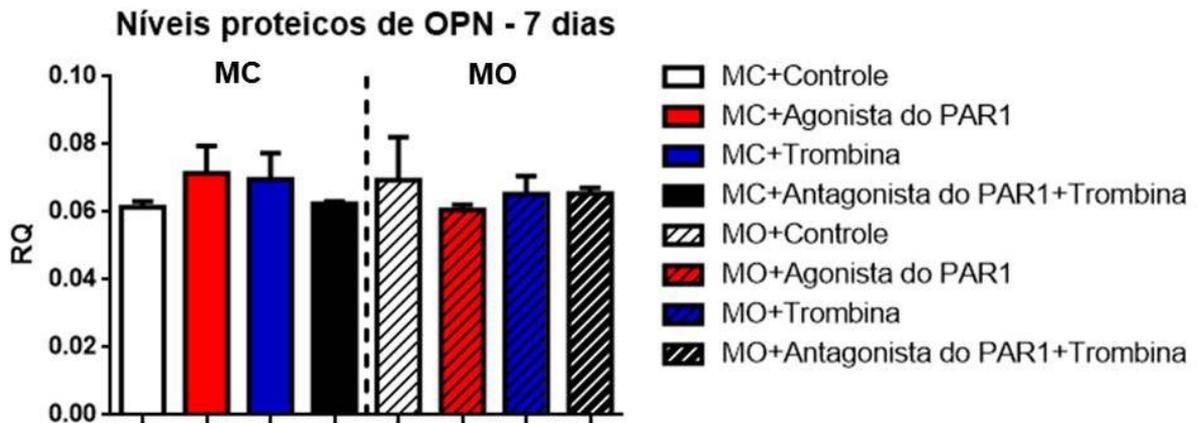
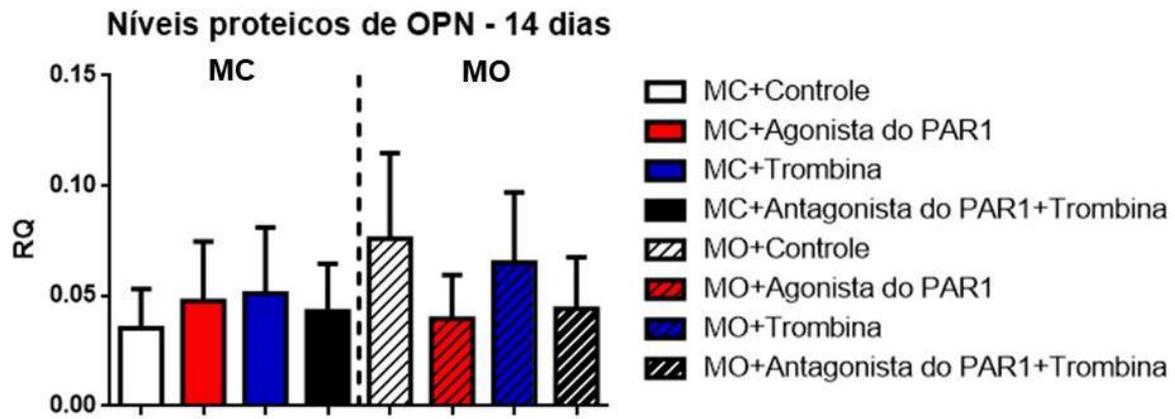


Figura 5.35 – Efeito da ativação do PAR1 nos níveis proteicos de OPN aos 14 dias. Os valores estão apresentados em média e DP; n = 3 pacientes



6 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo indicam pela primeira vez que a ativação do PAR1 pela trombina e seu agonista específico aumentam a atividade osteogênica e cementogênica em CMLP, resultando em maior formação de depósitos de cálcio, atividade de ALP, proliferação celular e expressão de fatores osteogênicos e cementogênicos.

Inicialmente, células obtidas do ligamento periodontal de três doadores foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que as células eram positivas para CD146, CD90 e CD 44, e ao mesmo tempo negativas para CD 14, 31 e 34, sendo estes dados compatíveis com a literatura para caracterização de CMLP (Choi et al., 2015). De fato, o CD146, o qual foi positivo em 98,08% das células, é o marcador mais importante para a caracterização destas células, sendo utilizado em ensaios de seleção de células mesenquimais.

A ativação do PAR1 pela trombina e seu peptídeo agonista específico aumentou a formação de depósitos de cálcio aos 7 e 14 dias e a concentração de cálcio aos 2 e 7 dias, sugerindo que em CMLP, o receptor desempenha um papel importante no processo de mineralização. Além disso, o bloqueio do PAR1 diminuiu a formação de depósitos de cálcio, indicando que o aumento nos depósitos de cálcio observado no tratamento com a trombina foi mediado especificamente pelo PAR1. Corroborando com esses achados, a literatura mostra um papel importante do PAR1 no metabolismo e reparo ósseo (Song et al., 2005; Mackie et al., 2008; Pagel et al., 2009; Sato et al., 2016). Ainda, em um estudo sobre reparo ósseo em camundongos PAR1 (-/-) foi mostrada uma maior formação óssea em camundongos PAR1+/+ em comparação com camundongos PAR1-/-, aos 9 dias após a lesão óssea criada cirurgicamente, indicando que o PAR1 desempenha um papel importante no reparo ósseo (Song et al., 2005).

Curiosamente, o bloqueio do PAR1 com seu antagonista reduziu a mineralização *in vitro* até mesmo em comparação com o controle osteogênico, sugerindo assim a presença de algum ativador endógeno do PAR1 durante o processo de diferenciação e mineralização, e ainda, que o PAR1 desempenha um papel fundamental nesses dois processos. Durante a formação e reparo ósseo *in vivo*, alguns ativadores do PAR1 podem estar presentes, como a plasmina, trombina

e as MMPs (Mackie et al., 2008). Demonstrou-se que a MMP-13 é expressa por células mesenquimais humanas durante a diferenciação osteogênica (Ozeki et al., 2016), desempenhando papel importante na diferenciação osteoblástica, bem como na formação e reparo do osso alveolar. Além disso, da Silva et al. (2014) mostraram que após o tratamento periodontal em pacientes com periodontite crônica, o aumento da expressão de MMP-13 está associada ao aumento da expressão de PAR1 no fluido gengival. Sendo assim, os dados de mineralização do presente estudo sugerem que algum ativador endógeno do PAR1, possivelmente a MMP-13 produzida pelas CMLP durante o processo de mineralização, pode desempenhar um papel importante na mineralização e diferenciação dessas células através da ativação do PAR1.

A ALP é conhecida como um marcador da diferenciação de osteoblastos (Lian et al., 2004). No presente estudo, os tratamentos com trombina e o peptídeo ativador do PAR1 aumentaram a atividade de ALP em comparação ao controle, enquanto o bloqueio do PAR1 diminuiu a atividade de ALP em comparação com o tratamento com apenas a trombina, sugerindo assim que esses efeitos foram especificamente mediados pelo PAR1. Corroborando com estes achados, em pré-osteoblastos de camundongos, Abraham e Mackie (1999) encontraram em uma análise de diferentes populações celulares que em células mais imaturas, os tratamentos com a trombina e peptídeo ativador do PAR1 aumentaram a atividade da ALP. Uma possibilidade levantada por esses autores foi que a trombina via ativação do PAR1 pode estimular diretamente a diferenciação de células precursoras de osteoblastos. Além disso, outra possibilidade foi que a ativação do PAR1 pode aumentar a proliferação de um subgrupo de células que exibem um fenótipo semelhante com os osteoblastos, gerando um número maior de células para o processo de diferenciação. Por outro lado, a ativação do PAR1 também foi implicada na inibição da atividade da ALP em pré-osteoblastos mais maduros (Abraham; Mackie, 1999; Song et al., 2005b) e a principal razão é que nesse tipo de células, a ativação do PAR1 estimula a proliferação (Abraham; Mackie, 1999; Song et al., 2005b), e durante esse processo, sabe-se que a diferenciação osteoblástica é inibida, resultando assim na redução da atividade de ALP (Stein; Lian, 1993).

Estudos demonstraram que a trombina possui ação mitogênica (Coughlin; 1999, 2000). De fato, a trombina via ativação do PAR1 pode aumentar a proliferação de vários tipos de células, como osteoblastos (Abraham; Mackie, 1999; Song et al.,

2005b), células estromais da medula óssea (Song et al., 2005), fibroblastos (Yang et al. 2016), condrócitos (Kirilak et al., 2006) e astrócitos (Wang et al., 2002). Corroborando com esses achados, no presente estudo, a trombina e o agonista do PAR1 aumentaram a proliferação das CMLP em comparação ao controle e ao tratamento com o antagonista do PAR1. No MO, a ativação do PAR1 não teve efeito sobre a proliferação celular, o que pode ser explicado pelo fato de que o processo de diferenciação pode inibir a proliferação celular (Abraham; Mackie, 1999).

No presente estudo, a ativação do PAR1 pela trombina e agonista do PAR1 aumentou a expressão gênica de Runx2 em 2 e 7 dias, enquanto o bloqueio do PAR1 impediu esse efeito. Com relação aos níveis proteicos de Runx2, resultados semelhantes foram observados em 2 e 14 dias. Em conjunto, estes achados indicam que o PAR1 desempenha um papel fundamental na expressão do Runx2. Uma vez que o Runx2 está envolvido na diferenciação de osteoblastos, regulação osteogênica e na formação óssea (Xu et al., 2015), esses dados corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de mineralização. Além disso, embora diferenças significativas entre os grupos tenham sido encontradas apenas em alguns momentos, esses dados não são surpreendentes, uma vez que a expressão de Runx2 difere durante a diferenciação osteogênica de acordo com a regulação do microambiente osteogênico (Lee et al., 1999). Sendo assim, sugere-se que a ativação do PAR1 pode ter evidenciado os picos da expressão do Runx2 durante o processo de diferenciação osteogênica.

A OPG é uma proteína que atua como um falso receptor para o RANKL, impedindo a ativação de osteoclastos (Simonet et al., 1997). O desequilíbrio do sistema OPG/RANKL está associado à destruição tecidual em diversas patologias, assim como a periodontite (Bostanci et al., 2007). Neste estudo, a ativação do PAR1 pela trombina e seu agonista aumentou a expressão gênica de OPG aos 7 dias. Além disso, esses mesmos tratamentos levaram a um aumento dos níveis proteicos de OPG em 2 dias, enquanto o bloqueio do PAR1 impediu este efeito. Estes dados sugerem que PAR1 desempenha um papel na síntese de OPG em CMLP. Além disso, uma vez que a ativação do PAR1 aumentou a expressão de OPG, mas não teve efeito sobre o RANKL, esses achados indicam que o PAR1 pode aumentar a proporção de OPG sobre o RANKL, o que poderia reduzir a reabsorção óssea. Resultados similares foram encontrados por Arayatrakoolikit et al. (2008), quais mostraram que esses mesmos tratamentos em células do ligamento periodontal

poderiam aumentar a proporção de OPG para RANKL, em 2 dias. Curiosamente, em nosso estudo, aos 7 dias, a trombina induziu uma alta síntese de OPG, enquanto o tratamento com o antagonista do PAR1 impediu esse efeito, sugerindo que a ação foi especificamente mediada pelo PAR1. No entanto, ao mesmo tempo, o peptídeo agonista do PAR1 não teve efeito. Este fato pode ser explicado pela forma de ativação do receptor, diferentemente do agonista do PAR1, a trombina ativa o PAR1 através da clivagem proteolítica, sendo considerado o mais potente ativador do PAR1 (Holleberg et al., 2014). Por esta razão, neste momento específico, possivelmente uma maior concentração do agonista poderia ser necessária para obter os resultados encontrados no tratamento com trombina (Holleberg et al., 2014). Aos 14 dias, outro achado interessante foi que o antagonista do PAR1 não impediu um aumento na expressão de OPG causado pelo tratamento com a trombina, sugerindo que esse aumento tardio não foi especificamente mediado pelo PAR1.

Diferenças entre a expressão genética e níveis proteicos foram encontradas. No entanto, esses achados não são surpreendentes, uma vez que por muitas razões, como por exemplo, regulação pós-transcricional e diferenças na estabilidade do RNA e da proteína, a correlação entre os mesmos pode ser de apenas 40%, dependendo do sistema envolvido (Vogel; Marcotte, 2012).

A ativação do PAR1 não teve efeito sobre a expressão gênica de OC e níveis proteicos de OC e OPN. Altos níveis de OPN e OC são encontrados em osteoblastos nos estágios tardios da formação e remodelação óssea (Ram et al., 2015). Desta forma, nossos resultados sugerem que, em CMLP, a ativação do PAR1 não exerce um papel nesses processos, atuando principalmente no aumento da atividade osteogênica através do aumento da proliferação e diferenciação das células mesenquimais.

A cementogênese é considerada o processo mais importante da regeneração periodontal (Cortellini; Tonetti, 2015). Em nosso estudo, a ativação do PAR1 aumentou a expressão gênica de CEMP1, proteína que atua regulando a diferenciação cementoblástica e formação de matrix de cimento (Bermúdez et al., 2015). Por outro lado, nossos resultados indicam que a ativação do PAR1 não tem efeito na expressão gênica de CAP. O CAP atua nos estágios finais da cementogênese, principalmente no recrutamento de cementoblastos e adesão dos mesmos na raiz do dente (Barkana et al., 2000), sendo assim, nossos resultados

sugerem que o PAR1 pode atuar nos primeiros estágios da cementogênese, mais especificamente na diferenciação cementoblástica, podendo não ter ação nos estágios mais tardios deste processo.

Por fim, conclui-se que a ativação do PAR1 aumenta a atividade osteogênica e cementogênica em CMLP, tendo potencial para aumentar a regeneração do periodonto em terapias futuras, possivelmente através da liberação do peptídeo ativador do PAR1 em scaffolds ou membranas aplicadas em defeitos periodontais.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, a ativação do PAR1 aumenta as atividades osteogênica e cementogênica de CMLP.

A ativação do PAR1 aumenta a formação de depósitos de cálcio, concentração de cálcio, atividade de ALP, proliferação celular e expressão de Runx2, OPG e CEMP1.

REFERÊNCIAS¹

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

Afzal F, Polak J, Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J Pathol.* 2004 Apr;202(4):503-10.

American Academy of Periodontology, Subcommittee to Revise the Glossary of Periodontic Terms. *Glossary of Periodontal Terms*, ed 4 Chicago: American Academy of Periodontology, 2001.

Arayatrakoollikit U, Pavasant P, Yongchaitrakul T. Thrombin induces osteoprotegerin synthesis via phosphatidylinositol 3'-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2008 Oct;43(5):537-43.

Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000.* 2015 Feb;67(1):211-33.

Aukhil I. Biology of tooth-cell adhesion. *Dent Clin North Am.* 1991 Jul;35(3):459-67.

Austin KM, Covic L, Kuliopulos A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood.* 2013 Jan 17;121(3):431-9. doi: 10.1182/blood-2012-09-355958.

Barkana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces in vitro. *J Dent Res.* 2000 Jul;79(7):1482-8.

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

Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006;40:29-49.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Belibasakis GN, Bostanci N, Reddi D. Regulation of protease-activated receptor-2 expression in gingival fibroblasts and Jurkat T cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Biol Int*. 2010 Feb 5;34(3):287-92.

Beresford JN, Gallagher JA, Gowen M, Couch M, Poser J, Wood DD, Russell RG. The effects of monocyte-conditioned medium and interleukin 1 on the synthesis of collagenous and non-collagenous proteins by mouse bone and human bone cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Sep 7;801(1):58-65.

Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0127286.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*. 2007 May;34(5):370-6.

Caton JG, Zander HA. The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. *J Periodontol*. 1979 Sep;50(9):462-6.

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

Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Mar;21(3):103-8.

Collen D. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001:1-9.

Cortellini P, Tonetti MS. Clinical concepts for regenerative therapy in intrabony defects. *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):282-307.

Coughlin SR. Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):353-6.

Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):258-64.

da Silva HA, Euzebio Alves VT, Spolidório LC, César Neto JB, Eichler RS, de Carvalho MH, Holzhausen M. Expression of protease activated receptor-1 in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Dec;85(12):1763-9.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2003 May;51(5):633-41.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):C1429-52.

Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, An Y, Zhang C, Wang S. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells*. 2010 Oct;28(10):1829-38.

Eley BM, Cox SW. Cathepsin B/L-, elastase-, trypsin-, and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid: a comparison of levels before and after periodontal surgery in chronic periodontitis patients. *J Periodontol*. 1992 May;63(5):412-7.

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

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

Giannobile WV, Al-Shammari KF, Sarment DP. Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontol 2000*. 2003;31:125-34.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004 Jun 1;329(1):77-84.

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

Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Surgical and nonsurgical periodontal therapy Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):218-31.

Hollenberg MD, Mihara K, Polley D, Suen JY, Han A, Fairlie DP, Ramachandran R. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. *Br J Pharmacol*. 2014 Mar;171(5):1180-94.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Mar;100 Suppl 1:177-80.

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

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

Holzhausen M, Balejo RD, Lara GM, Cortelli SC, Saad WA, Cortelli JR. Nafamostat mesilate, a potent tryptase inhibitor, modulates periodontitis in rats. *Clin Oral Investig*. 2011 Dec;15(6):967-73.

Horie M, Yamaguchi Y, Saito A, Nagase T, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Forrest AR, Hayashizaki Y, Suzutani T, Kappert K, Micke P, Ohshima M. Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified DLX5 and RUNX2 long variant as novel regulators involved in periodontitis. *Sci Rep*. 2016 Sep 20;6:33666.

Hou L, Howells GL, Kapas S, Macey MG. The protease-activated receptors and their cellular expression and function in blood-related cells. *Br J Haematol*. 1998 Apr;101(1):1-9.

Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis*. 2017 Jun 21. doi: 10.1111/odi.12703. [Epub ahead of print]

Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis*. 2006 Jul;12(4):358-63.

Jaffré F, Friedman AE, Hu Z, Mackman N, Blaxall BC. β -adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via matrix metalloproteinase 13 in cardiac cells. *Circulation*. 2012 Jun 19;125(24):2993-3003.

Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Kuretake H, Ikeda K, Matsuo O. uPA Attenuated LPS-induced Inflammatory Osteoclastogenesis through the Plasmin/PAR-1/Ca(2+)/CaMKK/AMPK Axis. *Int J Biol Sci*. 2016 Jan 1;12(1):63-71.

Kirilak Y, Pavlos NJ, Willers CR, Han R, Feng H, Xu J, Asokanathan N, Stewart GA, Henry P, Wood D, Zheng MH. Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. *Int J Mol Med*. 2006 Apr;17(4):551-8.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-76.

Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004;14(1-2):1-41.

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

Lindhe J, Socransky SS, Nyman S, Haffajee A, Westfelt E. "Critical probing depths" in periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1982 Jul;9(4):323-36.

Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 2008 Apr;26(4):1065-73.

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

Mackie EJ, Loh LH, Sivagurunathan S, Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Wong D, Georgy SR, Pagel CN. Protease-activated receptors in the musculoskeletal system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1169-84.

Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24;112(47):14452-9.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2001 Jun;53(2):245-82.

Nakamura M, Slots J. Salivary enzymes. Origin and relationship to periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1983 Nov;18(6):559-69.

Naldini A, Bernini C, Pucci A, Carraro F. Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2005 Sep;78(3):736-44.

Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Apr 19;(2):CD001724.

Ohuchi N, Hayashi K, Iwamoto K, Koike K, Kizawa Y, Nukaga M, Kakegawa T, Murakami H. Thrombin-stimulated proliferation is mediated by endothelin-1 in cultured rat gingival fibroblasts. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010 Aug;24(4):501-8.

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

Ozeki N, Mogi M, Hase N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Nakata K. Polyphosphate-induced matrix metalloproteinase-13 is required for osteoblast-like cell differentiation in human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Biosci Trends.* 2016 Nov 15;10(5):365-371.

O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene.* 2001 Mar 26;20(13):1570-81.

Pagel CN, Song SJ, Loh LH, Tudor EM, Murray-Rust TA, Pike RN, Mackie EJ. Thrombin-stimulated growth factor and cytokine expression in osteoblasts is mediated by protease-activated receptor-1 and prostanoids. *Bone.* 2009 May;44(5):813-21.

Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:74-87.

Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):2005-9.

Qian H, Zhao Y, Peng Y, Han C, Li S, Huo N, Ding Y, Duan Y, Xiong L, Sang H. Activation of cannabinoid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2010 Aug;45(4):504-11.

Ram VS, Parthiban, Sudhakar U, Mithradas N, Prabhakar R. Bonebiomarkers in periodontal disease: a review article. *J Clin Diagn Res*. 2015 Jan;9(1):ZE07-10.

Ramachandran R, Altier C, Oikonomopoulou K, Hollenberg MD. Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling. *Pharmacol Rev*. 2016 Oct;68(4):1110-1142.

Reddy MS, Aichelmann-Reidy ME, Avila-Ortiz G, Klokkevold PR, Murphy KG, Rosen PS, Schallhorn RG, Sculean A, Wang HL. Periodontal regeneration – furcation defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015 Feb;86(2 Suppl):S131-3.

Rohani MG, DiJulio DH, An JY, Hacker BM, Dale BA, Chung WO. PAR1- and PAR2-induced innate immune markers are negatively regulated by PI3K/Akt signaling pathway in oral keratinocytes. *BMC Immunol*. 2010 Oct 28;11:53.

Rømer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Danø K. Plasminogen and wound healing. *Nat Med*. 1996 Jul;2(7):725.

Rovai ES, Holzhausen M. The Role of Proteinase-Activated Receptors 1 and 2 in the Regulation of Periodontal Tissue Metabolism and Disease. *J Immunol Res*. 2017;2017:5193572.

Sato N, Ichikawa J, Wako M, Ohba T, Saito M, Sato H, Koyama K, Hagino T, Schoenecker JG, Ando T, Haro H. Thrombin induced by the extrinsic pathway and PAR-1 regulated inflammation at the site of fracture repair. *Bone*. 2016 Feb;83:23-34.

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

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.

Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res*. 1988 Jan;67(1):66-70.

Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol*. 1990;35(3):241-7.

Song SJ, Pagel CN, Campbell TM, Pike RN, Mackie EJ. The role of protease-activated receptor-1 in bone healing. *Am J Pathol*. 2005 Mar;166(3):857-68.

Song SJ, Pagel CN, Pike RN, Mackie EJ. Studies on the receptors mediating responses of osteoblasts to thrombin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005b Jan;37(1):206-13.

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

Spolidorio LC, Lucas PD, Steffens JP, da Silva HA, Alves VT, Spolidorio DM, Holzhausen M. Influence of parstatin on experimental periodontal disease and repair in rats. *J Periodontol*. 2014 Sep;85(9):1266-74.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*. 1993 Aug;14(4):424-42.

Sulniute R, Lindh T, Wilczynska M, Li J, Ny T. Plasmin is essential in preventing periodontitis in mice. *Am J Pathol*. 2011 Aug;179(2):819-28.

Tanaka N, Morita T, Nezu A, Tanimura A, Mizoguchi I, Tojyo Y. Signaling mechanisms involved in protease-activated receptor-1-mediated interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Nov;311(2):778-86.

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.

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

Uehara A, Naito M, Imamura T, Potempa J, Travis J, Nakayama K, Takada H. Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Microbiol*. 2008 Apr;57(Pt 4):500-7.

Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am*. 2010 Jan;54(1):73-92.

Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):227-32.

Wang H, Uhl JJ, Stricker R, Reiser G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Nov;283(5):C1351-64.

Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int*. 1986 Dec;39(6):382-5.

Wong DM, Tam V, Lam R, Walsh KA, Tatarczuch L, Pagel CN, Reynolds EC, O'Brien-Simpson NM, Mackie EJ, Pike RN. Protease-activated receptor 2 has pivotal roles in cellular mechanisms involved in experimental periodontitis. *Infect Immun*. 2010 Feb;78(2):629-38.

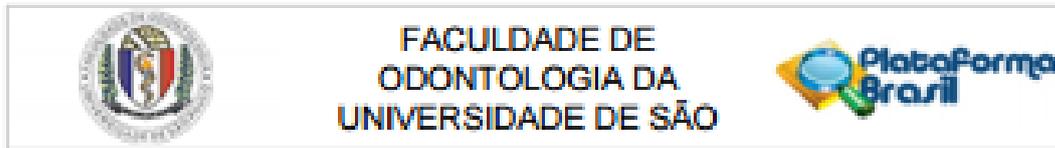
Wu YC, Lin LK, Song CJ, Su YX, Tu YK. Comparisons of periodontal regenerative therapies: A meta-analysis on the long-term efficacy. *J Clin Periodontol*. 2017 May;44(5):511-519.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000 Aug;21(4):393-411.

Yang CC, Hsiao LD, Yang CM, Lin CC. Thrombin Enhanced Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Migration of SK-N-SH Cells via PAR-1, c-Src, PYK2, EGFR, Erk1/2 and AP-1. *Mol Neurobiol.* 2017 Jul;54(5):3476-3491.

Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res.* 2015 Dec 15;7(12):2527-35.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Marinella Hobhausen Caldeira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34651214.8.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 803.811

Data da Relatoria: 24/09/2014

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

No presente estudo é estabelecida a hipótese de que a ativação do PAR1 em células do ligamento periodontal pode levar ao aumento da atividade osteogênica. Desta forma, o objetivo principal do presente estudo será avaliar o efeito da ativação do PAR1 através de trombina sobre a diferenciação osteogênica das células do ligamento. Além disso, serão avaliados os efeitos da ativação do PAR1 sobre a expressão gênica e proteica de fosfatase alcalina (ALP), osteopontina, osteocalcina, RANKL, OPG e runt-related transcription factor-2 (RUNX2) e expressão proteica de IL-10 e TGF-β1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2237
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7900 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 8824/11

O benefício será colaborar no desenvolvimento científico na área da periodontia através de se melhor conhecer o mecanismo de ativação do PAR1 nas células dos tecidos periodontais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta-se bem delineada, com objetivos e metodologia bem descritos. Atende aos termos de apresentação obrigatória e o cronograma é compatível com a apreciação ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada consta

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SÃO PAULO, 24 de Setembro de 2014

Assinado por:

Maria Gabriela Hays Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7900

Fax: (11)3091-7814

E-mail: ceplo@usp.br

ANEXO B – Termo de consentimento

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

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

Responsável pelo projeto: Profa Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

Fone:(11)3091 7833

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

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

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

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

RISCOS E BENEFÍCIOS: O risco envolvido a você paciente que aceite participar desta pesquisa é mínimo, porque todo o procedimento de raspagem será feito após

o dente ser extraído. Esta pesquisa irá colaborar no desenvolvimento da área da periodontia através do melhor entendimento do mecanismo do PAR1 nas células da gengiva.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. **Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.**

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada na Disciplina da Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

A participação neste estudo não acarretará ao participante nenhum custo extra ao já incluído após ter-se transportado até o ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para realização das extrações dos dentes, as quais já foram previamente agendadas pela equipe da disciplina de cirurgia.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e mudar minha decisão se assim o desejar.

Em caso de dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Av. Professor Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária – São Paulo, SP.

Telefone (11) 3091-7960 ou pelo email cepfo@usp.br

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

Assinatura do Pesquisador Responsável: