



MAYRA LAINO ALBIERO

**“Efeito do lipopolissacarídeo bacteriano  
sobre as propriedades biológicas das  
células mesenquimais indiferenciadas do  
ligamento periodontal de humanos”**

PIRACICABA 2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MAYRA LAINO ALBIERO

**“Efeito do lipopolissacarídeo bacteriano sobre  
as propriedades biológicas das células  
mesenquimais indiferenciadas do ligamento  
periodontal de humanos”**

Orientador (a): Profa. Dra. Karina Gonzáles Silvério Ruiz

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
APRESENTADA À FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA  
UNICAMP, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRA EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
NA ÁREA DE PERIODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação  
defendida pela aluna, e orientada pela Profa. Dra.  
Karina Gonzáles Silvério Ruiz

---

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

AL14e Albiero, Mayra Laino, 1988-  
O efeito do lipopolissacarídeo bacteriano sobre as propriedades biológicas das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos / Mayra Laino Albiero. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Karina Gonzales Silvério Ruiz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Inflamação. 2. Biologia celular. 3. Células mesenquimais estromais. 4. Regeneração. 5. Receptores Toll-like. I. Ruiz, Karina Gonzales Silverio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** The effect of bacterial lipopolysaccharide on the biological properties of mesenchymal stem cells from human periodontal ligament

**Palavras-chave em Inglês:**

Inflammation

Cell biology

Mesenchymal stromal cells

Regeneration

Toll-Like receptors

**Área de concentração:** Periodontia

**Titulação:** Mestra em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Karina Gonzales Silvério Ruiz [Orientador]

Bruna Rabelo Amorim

Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes

**Data da defesa:** 05-03-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 05 de Março de 2013, considerou a candidata MAYRA LAINO ALBIERO aprovada.

Handwritten signature of Karina Gonzales Silverio Ruiz in blue ink.

---

Profa. Dra. KARINA GONZALES SILVERIO RUIZ

Handwritten signature of Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes in blue ink.

---

Profa. Dra. THAISÂNGELA RODRIGUES LOPES E SILVA GOMES

Handwritten signature of Bruna Rabelo Amorim in blue ink.

---

Profa. Dra. BRUNA RABELO AMORIM

Dedico este trabalho aos meus pais José Urbano e Maria Teresa, à minha irmã Thays e ao Wellington por serem o maior exemplo de amor em minha vida, pelo apoio e incentivo, por todos os investimentos e por confiarem na minha escolha e no meu trabalho.

Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Especialmente a Deus por guiar os meus passos, me dar forças para suportar os momentos mais difíceis, paciência e sabedoria para entender que tudo tem o seu momento certo de acontecer, por iluminar o meu caminho e cuidar de todos aqueles que amo... "O que nós somos é o presente de Deus a nós. O que nós nos tornamos é nosso presente a Ele."

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, onde pude adquirir, desde a minha graduação, todo o conhecimento que possuo.

À FAPESP, pelo apoio na realização deste trabalho por meio da bolsa de mestrado.

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação, e ao Prof. Dr. Márcio de Moraes, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À professora Dra. Karina Gonzáles Silvério Ruiz, exemplo de conduta profissional, que desde o começo da minha iniciação científica me incentivou e confiou em meu trabalho. Obrigado pelos ensinamentos científicos e clínicos, pela disponibilidade e atenção com que sempre me acolheu em todos os momentos, e por me ensinar a ser uma profissional mais competente e segura.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior que me abriu as portas da área da Periodontia, e me deu a oportunidade de conhecer melhor a ciência, possibilitando meu desenvolvimento e aprendizado durante a iniciação científica.

Aos demais professores da periodontia Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, e Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum que direta ou indiretamente contribuíram para meu aprendizado.

À banca de qualificação Prof. Dra. Denise Andia, Profa. Dra. Luciane Martins, Prof. Dr. Renato Casarin que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho. Obrigada pela ajuda e considerações.

À Mariana Fugolin, Eliete Lima e Regina Caetano pela competência, dedicação e disponibilidade em ajudar sempre que necessário, com certeza, vocês fazem diferença na área de Periodontia.

À Profa. Dra. Thaisângela Rodrigues, que foi essencial para o meu amadurecimento e que tornou possível a realização da minha iniciação científica, com toda a sua paciência e disponibilidade me ajudou a ser uma pessoa melhor. Obrigada por aceitar participar da minha banca da defesa.

À Profa. Dra. Bruna Rabelo Amorim, por nunca ter tido receio de compartilhar e ensinar. Obrigada por ter me ajudado na realização deste trabalho e por estar na minha banca da defesa.

Aos futuros, atuais e ex-companheiros de pós-graduação Ana Paula Giorgetti, Tatiana Meulman, Mônica Corrêa, Mirella Lindoso, Hugo do Vale, Lucas Queiróz, Lucas Moura, Ana Regina Moreira, Camila Camarinha, Tiago Tarbes, Viviene Barbosa, Maria Alice Palma e Isabela França, e em especial aos amigos Miki Saito e Tiago Taiete, todos vocês de alguma forma contribuíram para a minha formação, para que eu me tornasse uma pessoa e uma profissional melhor, disposta a ajudar e dar o melhor de mim sempre. Obrigada pela boa convivência, desejo muito sucesso a todos.

Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram a seguir meu caminho com empenho e dedicação.

À mais que amiga Ana Paula A. Ayres, por todos esses anos de convívio, pela ajuda, pelas risadas e palavras de conforto nos momentos difíceis. Não tenho palavras para descrever o amor e gratidão que sinto por você.

À minha amiga-irmã Maria Carolina Marquezin, pelo ombro amigo, pela presença constante e por estar sempre disposta ajudar a qualquer mínimo sinal de dificuldade. Você é umas das melhores pessoas que já conheci.

À querida Marcela S. Freitas, amiga de longa data. Nossos momentos de descontração, risos e desabafos vão ficar pra sempre no meu coração. Desejo muito sucesso na sua nova etapa!

À família que Piracicaba me deu, Bruna Sanches, Marcela Bazana, Patrícia Rodrigues e Vanessa Amaral. Vocês são muito importantes na minha vida, me mantêm com os pés no chão na minha caminhada e me dão coragem para seguir em frente. As amizades, quando são verdadeiras, percorrem distâncias.

À minha irmã Thays Laino Albiero, sinto sua falta todos os dias. A saudade de momentos só nossos chega a doer, mas sei que esse é só o início do caminho que estamos trilhando e tenho muito orgulho da sua garra e dedicação. Obrigada por tudo mesmo, amo você.

Ao meu maior amigo, parceiro e amor Wellington Rocha, não há palavras neste mundo que descrevam o que você significa na minha vida. Se não fosse o seu apoio eu não estaria finalizando esta etapa e ampliando meus horizontes. Obrigada por compreender meus anseios, incentivar meus sonhos e mais ainda, me ajudar a torná-los realidade. A sua paciência, carinho e amor me dão forças para seguir adiante. A vida é muito melhor com você ao meu lado.

Aos meus amados pais, José Urbano Albiero Júnior e Maria Teresa Laino Albiero, maiores entusiastas do meu trabalho, maiores incentivadores do meu aprimoramento. Procuo entre as palavras àquela que gostaria que seus corações ouvissem, e só encontro um simples e sincero obrigada. Obrigada por não medirem esforços para que eu pudesse trilhar um novo caminho. Vocês me mostraram a possibilidade até mesmo no impossível, alimentaram meus sonhos e me ampararam nas quedas. Vocês são o meu alicerce, meu tudo. Amo muito vocês.

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

*Augusto Cury*

"Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode não ser o bastante. Dê o melhor de você assim mesmo. Veja você que, no final das contas, é tudo entre VOCÊ e DEUS. Nunca foi entre você e os outros."

*Madre Teresa de Calcutá*

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a exposição das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal (PDLMSCs) ao lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e da *Escherichia coli* (Ec), levaria a alterações biológicas que comprometessem as propriedades relacionadas ao fenótipo mesenquimal indiferenciado. Para testar essa hipótese, inicialmente foi verificado se as cinco populações de células mesenquimais indiferenciadas purificadas para o antígeno de superfície CD105 (células CD105<sup>+</sup>) expressavam os receptores *Toll-like 2* e 4 (TLR2 e 4). Em seguida, as células foram cultivadas na presença do LPS da Pg e da Ec, e avaliadas quanto a sua viabilidade e proliferação pelo ensaio do MTS, expressão dos genes para citocinas inflamatórias *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8* e *TNF- $\alpha$*  (técnica do PCRq), imunomarcação para STRO-1 e expressão do gene identificador de pluripotencialidade - Oct-4, e capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblástica através dos ensaios para identificação de nódulos minerais e expressão dos genes para *RUNX2*, *ALP* e *OCN*. Os resultados mostraram que todas as populações celulares apresentaram fenótipo mesenquimal indiferenciado com marcação positiva para STRO-1, além de se mostrarem positivas para os receptores TLR2 e 4. O ensaio de MTS revelou que a exposição às três concentrações de LPS da Pg e da Ec (100 ng, 1  $\mu$ g e 10  $\mu$ g/ml) não comprometeu a viabilidade celular, mantendo todas as populações de PDLMSCs proliferativas ao longo dos 10 dias de cultivo. Em paralelo, verificou-se que LPS da Pg não alterou os níveis de RNAm para citocinas estudadas enquanto que, o LPS da Ec promoveu um aumento significativo na expressão de *IL-6* e *IL-8*, quando aplicado nas concentrações de 100 ng e 1  $\mu$ g/ml. Adicionalmente, os resultados revelaram que a exposição celular aos LPS bacterianos, ambos na concentração de 1 $\mu$ g/ml, não alterou o fenótipo mesenquimal indiferenciado destas populações, uma vez que a expressão do gene *OCT-4* e a marcação positiva para STRO-1 mantiveram-se semelhantes à células do grupo controle. Além disso, as células mantiveram a

capacidade de diferenciação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico, confirmado pela produção de nódulos minerais (ensaio de vermelho de alizarina) e expressão dos genes para *RUNX-2*, *ALP* e *OCN* semelhante ao grupo controle (células cultivadas em meio osteogênico). Somente foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de nódulos minerais quando as células foram cultivadas na presença de  $1\mu\text{g/ml}$  do LPS de *Ec*. Contudo, esse aumento da matriz mineral não está relacionado ao aumento nos níveis de RNAm para os genes relacionados ao fenótipo osteogênico comparado ao grupo controle. Dentro das condições experimentais avaliadas, concluí-se que a exposição das PDLMSCs ao LPS da *Porphyromonas gingivalis* e da *Escherichia coli* não alterou as propriedades biológicas destas células, mantendo assim, as características que conferem a estas a condição de mesenquimal indiferenciada.

**Palavras-chave:** células mesenquimais indiferenciadas, ligamento periodontal, regeneração periodontal, Lipopolissacarídeos (LPS), *Toll-like receptors* (TLR), *Porphyromonas gingivalis*

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate if the exposure of mesenchymal stem cells of the periodontal ligament (PDLMSCs) to lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Escherichia coli* (Ec), would lead to biological changes that compromised the properties related to undifferentiated mesenchymal phenotype. To test this hypothesis, initially it was checked whether the five populations of mesenchymal stem cells purified by surface antigen CD105 (CD105<sup>+</sup> cells) expressed the Toll-like receptors 2 and 4 (TRL2 and 4). Then, cells were cultured in the presence of LPS from Pg and Ec, and evaluated for viability and proliferation by the MTS assay, expression of proinflammatory cytokines *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8* and *TNF- $\alpha$*  (PCRq technique), immunostaining for STRO-1 and *OCT-4* gene expression, an identifier of pluripotency, and osteoblast/cementoblastic differentiation capacity through assays to identify minerals nodules, as well as the gene expression of *RUNX2*, *ALP* and *OCN*. All these assays were carried out also in the presence of LPS from *Escherichia coli* (Ec), which is not considered a periodontal pathogen. The results showed that all cell populations with undifferentiated mesenchymal phenotype had positive staining for STRO-1, and also showed to be positive for the receptors TLR2 and 4. The MTS assay revealed that exposure to the three concentrations of Pg and Ec LPS (100 ng, 1 $\mu$ g and 10 $\mu$ g/ml) did not affect cell viability, keeping all PDLMSCs populations proliferative over 10 days of culture. In parallel, it was found that the LPS Pg did not alter mRNA levels for the cytokines studied, while the Ec LPS caused a significant increase in *IL-6* and *IL-8*, when applied concentrations of 100ng/ml and 1 $\mu$ g/ml. Additionally, the results revealed that cellular exposure to both LPS in the concentration of 1 $\mu$ g/ml, did not alter the undifferentiated mesenchymal phenotype of these populations, since the expression of gene *OCT-4* and positive STRO-1 staining remained similar to cells in the control group. In addition, these cells retained their ability to differentiate into osteoblastic/cementoblastic phenotype confirmed by production of mineral nodules (alizarin red assay) and expression of the genes for *RUNX-2*, *ALP* and *OCN* similar to cells control group (cultured in

osteogenic medium only). It was only observed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the production of mineral nodules when cells were cultured in the presence of  $1\mu\text{g/ml}$  Ec LPS. However, this increase in the mineral matrix it is not related to increased levels of mRNA for genes related to osteogenic phenotype compared to the control group. Within the experimental conditions, it can be concluded that exposure of PDLMSCs to LPS of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* did not alter the biological properties of these cells thereby, maintaining the characteristics that confer to these cells the condition of mesenchymal stem cells.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, periodontal ligament, periodontal regeneration, Lipopolysaccharides (LPS), Toll-like receptors (TLR), *Porphyromonas gingivalis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – Fosfatase alcalina

AR-S – Alizarina Red (ensaio de mineralização)

AS – células-tronco adultas

BMMSC – célula-tronco mesenquimais de medula-óssea

DPSC - célula-tronco da polpa dental

DFPC – célula progenitoras do folículo dental

ES – células-tronco embrionárias

Ec – *Escherichia coli*

HSC – células-tronco hematopoiéticas

LPS - lipopolissacarídeos

MSC – células-tronco mesenquimais

OCN – osteocalcina

PDL – células do ligamento periodontal

PDLMSCs - células-tronco do ligamento periodontal

Pg – *Porphyromonas gingivalis*

SCAP - células-tronco da papila apical

SHED - células-tronco de dentes decíduos exfoliados

TLR – receptores *Toll-like*

UCB – sangue de cordão umbilical

VK – von Kossa (ensaio de mineralização)

## **SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>5</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal inflamatória caracteriza-se pela destruição dos tecidos que suportam os dentes, os quais incluem ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar, e está entre as mais prevalentes doenças infecciosas, constituindo-se na principal causa da perda dental com implicações significativas na saúde pública (Desvarieux *et al.*, 2003; Elter *et al.*, 2003). A raspagem e alisamento da superfície radicular (terapia mecânica) é a forma de terapia mais comumente empregada no tratamento da doença periodontal. O objetivo da terapia mecânica é remover cálculo e depósitos bacterianos sobre a superfície radicular, assim como o cemento dental contaminado pelas bactérias e seus produtos (Aleo *et al.*, 1975; Nishimine & O'Leary, 1979; Bartold *et al.*, 2000). Os efeitos clínicos da terapia mecânica estão, de forma geral, bem documentados e, em combinação com uma boa higiene oral, resultam na diminuição da profundidade de sondagem das bolsas periodontais e na estabilização das medidas do nível clínico de inserção, particularmente em bolsas periodontais profundas (Kaldahl *et al.*, 1993).

Histologicamente, independente do tipo de abordagem utilizada para a descontaminação mecânica da superfície radicular, o tecido epitelial prolifera de forma mais rápida do que os tecidos mesenquimais envolvidos (ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar) o que resulta em um padrão de cura do tipo reparação (epitélio juncional longo), não ocorrendo a regeneração dos tecidos periodontais perdidos em função da doença (Polimeni *et al.*, 2006). Desta forma, o maior desafio da terapia periodontal contemporânea tem sido o restabelecimento do ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar perdidos durante o processo da doença periodontal inflamatória.

Clinicamente, diferentes modalidades terapêuticas têm sido utilizadas visando a regeneração dos tecidos periodontais de suporte perdidos. Entre estas se destacam técnicas de enxertos ósseos de diferentes origens, moléculas bioativas (como fatores de crescimento e proteínas derivadas da matriz do esmalte) e a regeneração tecidual guiada (GTR). Entretanto, os resultados clínicos

obtidos são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo (formação de ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular) destas técnicas tem se revelado limitado (Egelberg, 1987; Jepsen *et al.*, 2002; Trombelli *et al.*, 2002; Villar & Cochran, 2010). Alguns fatores tais como, o padrão de higiene oral, as características morfológicas dos defeitos periodontais, condições sistêmicas e comportamentais (diabetes e tabagismo) relacionados ao paciente têm sido considerados como fatores que influenciam na cicatrização dos tecidos periodontais (Polimeni *et al.*, 2006).

Atualmente, sabe-se que o sucesso da regeneração dos tecidos periodontais depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes das matrizes teciduais. Recentemente, estudos mostraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010) e de decíduos (Silvério *et al.*, 2010) abrigam populações celulares com características de células mesenquimais indiferenciadas (células tronco adultas). Essas células tem sido caracterizadas por meio da expressão de marcadores de superfície específicos para células de origem mesenquimal indiferenciada (CD105, CD166, CD73 e STRO1) (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010), além de expressarem o gene para o Oct-4 (Oct-3, *POU5f1*), um fator de transcrição importante para a manutenção da pluripotencialidade e do estado celular indiferenciado (Kawanabe *et al.*, 2006; Silvério *et al.*, 2010; Kelliner & Kikyo, 2010). Em condições apropriadas de cultura, essas células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal têm se mostrado capazes de diferenciarem em um fenótipo osteoblástico/cementoblástico, adipogênico e condrogênico (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010), além de apresentarem *in vivo* formação ectópica de uma estrutura tecidual semelhante ao cemento dental e ligamento periodontal (Seo *et al.*, 2004).

Do ponto de vista dos tecidos periodontais remanescentes, tem sido sugerido que as estruturas periodontais remanescentes, expostas ao processo inflamatório crônico, teriam a sua habilidade para promover a regeneração tecidual comprometida (Polimeni *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010). Uma das hipóteses baseia-se no fato das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal sofrerem alterações fenotípicas quando expostas ao ambiente da doença periodontal, principalmente, devido à ação das toxinas bacterianas e das citocinas inflamatórias, comprometendo assim, as suas propriedades biológicas. Embora não existam evidências científicas que sustentem esta hipótese, estudos na área médica mostraram que em modelo animal, na presença de um processo inflamatório crônico cerebral induzido pela injeção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ ), as propriedades proliferativa, migratória e a plasticidade das células-tronco da zona subventricular são significativamente comprometidas (Pluchino *et al.*, 2008).

Em relação à doença periodontal, a *Porphyromonas gingivalis* tem sido considerada um dos principais patógenos associados ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal inflamatória crônica (periodontite) (Socransky & Haffajee, 1992). A *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias gram-negativas tal como, a *Escherichia coli* (considerada como não-periodontopatógeno), apresentam em suas paredes celulares um fator de virulência denominado lipopolissacarídeo (LPS) (Holt *et al.*, 1999). Esse LPS quando em contato com células do sistema imunológico do hospedeiro, bem como com fibroblastos gengivais, induzem uma resposta imune-inflamatória, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais são mediadas pelos receptores do tipo *Toll-like* (TLR2 e TLR4) (Jones *et al.*, 2010). Até o momento, pouca informação encontra-se disponível sobre o efeito dos LPS bacterianos sobre as células mesenquimais indiferenciadas. Recentemente, Mo *et al.* (2008), observaram *in vitro* uma alteração no padrão de diferenciação osteogênica, quando células mesenquimais indiferenciadas isoladas da medula óssea de indivíduos saudáveis foram expostas ao LPS da *Escherichia coli*.

Desta maneira, o presente estudo foi realizado com o objetivo de tentar compreender o impacto da exposição das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal aos LPS da *Porphyromonas gingivalis* e da *Escherichia coli* nas suas propriedades relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Células mesenquimais indiferenciadas e seu papel na regeneração periodontal

A regeneração periodontal completa é um processo extremamente complexo, pois necessita de neoformação óssea, do ligamento periodontal e do cimento radicular. Para que esta regeneração seja bem sucedida, é necessária a formação de um selamento epitelial funcional, novas fibras de tecido conjuntivo inseridos na raiz, novo cimento acelular na superfície da raiz, além do restabelecimento da altura do osso alveolar, tornando a regeneração do periodonto uma das situações mais complexas e únicas do corpo humano (Bartold *et al.*, 2000; Polimeni *et al.*, 2006).

De acordo com o estudo de Melcher (1976), o tipo celular que povoa a ferida cirúrgica periodontal durante os estágios iniciais de cicatrização é crítico para determinar se esta cicatrização ocorrerá por reparo ou regeneração. Estudos realizados na década de 80 mostraram que, dos quatro tipos teciduais (osso alveolar, tecido conjuntivo gengival, epitélio e ligamento periodontal) que circundam o defeito periodontal, somente as células provenientes do ligamento periodontal remanescente são capazes de promover a formação de uma nova inserção conjuntiva sobre uma superfície radicular desprovida de ligamento periodontal (Karring *et al.* 1980; Nyman *et al.*, 1980; Karring *et al.*, 1985; Buser *et al.*, 1990). Ao mesmo tempo, esses estudos mostraram que histologicamente, o tecido epitelial prolifera a uma taxa mais rápida do que os tecidos mesenquimais subjacentes (ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular), promovendo uma cicatrização da ferida periodontal por reparo e não regeneração verdadeira dos tecidos, já que há a formação de epitélio juncional longo (Karring *et al.* 1980; Nyman *et al.*, 1980; Bowers *et al.*, 1982; Karring *et al.*, 1985; Egelberg, 1987).

Atualmente, uma ampla variedade de terapias regenerativas têm sido propostas, visando promover a regeneração dos tecidos periodontais de suporte.

Entre estas se destacam técnicas de enxertos ou substitutos ósseos, moléculas bioativas (como fatores de crescimento e proteínas derivadas da matriz do esmalte), a regeneração tecidual guiada (GTR) e a associação destas terapias. Entretanto, os resultados clínicos obtidos são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo (formação de ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular) destas técnicas tem se revelado limitado (Egelberg, 1987; Jepsen *et al.*, 2002; Trombelli *et al.*, 2002; Villar & Cochran, 2010).

Essa limitação das técnicas regenerativas em promover a regeneração dos tecidos periodontais em toda a extensão do defeito pode ser uma consequência da pobre capacidade inata dos tecidos periodontais danificados em se regenerar (Trombelli, 2005; Polimeni *et al.*, 2006; Villar & Cochran, 2010; Reynolds *et al.*, 2010). Dentro desse contexto, os estudos atuais vêm sendo direcionados no sentido de tentar compreender os eventos celulares e moleculares envolvidos na formação e regeneração dos tecidos periodontais, e abordagens baseadas na engenharia de tecidos têm surgido como potenciais alternativas aos tratamentos convencionais.

Nesse sentido, vários estudos têm sido conduzidos para melhor compreensão das propriedades do ligamento periodontal. Baseado em suas características, o ligamento periodontal é um tecido conjuntivo que circunda a raiz dental e seu papel primário é a manutenção do dente no alvéolo, proporcionando ancoragem e suporte ao dente em função, dispersando as forças associadas à mastigação, além de reconstruir a estrutura periodontal em resposta à injúria, à periodontite e a movimentos decorrentes do tratamento ortodôntico. A população celular do PDL é heterogênea, consistindo em duas grandes linhagens mesenquimais: a fibroblástica e a de tecidos mineralizantes, divididos nos subgrupos osteoblásticos e cementoblásticos (Gottlow *et al.*, 1984; McCulloch & Bordin, 1991; Pitaru *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997).

Devido à sua taxa metabólica e de *turnover* ser uma das mais altas do organismo, pesquisadores hipotetizaram que uma população celular altamente

regenerativa estaria presente no PDL (McCulloch & Bordin 1991; Ramakrishnan *et al.* 1995; Coura *et al.*, 2008). Este conceito de que células-tronco poderiam residir nos tecidos periodontais foi primeiramente proposto há mais de vinte anos por Melcher (1985).

Por suas funções, é necessário que o PDL contenha células-tronco pluripotentes como fonte de reconstrução do tecido periodontal. Acredita-se que a regeneração possa ser obtida com sucesso se houver a migração das células-tronco do ligamento periodontal, e que estas células possam se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, sintetizando matriz extracelular consistente com os tecidos periodontais (Karring *et al.*, 1993; Becker & Becker, 1999; Bartold *et al.*, 2000; Isaka *et al.*, 2001; Bartold & Narayanan, 2006).

A presença de células-tronco nos tecidos periodontais tem sido desde então, repetidamente mencionada na literatura. A evidência mais incontestável de que estas células estão presentes em meio ao tecido periodontal foi apresentada por McCulloch e colaboradores (1987), que identificaram uma pequena população de células progenitoras adjacente aos vasos sanguíneos no interior do ligamento periodontal.

De forma geral, as células-tronco são caracterizadas pela sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicarem-se, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, mais interessante ainda, sua capacidade de diferenciarem-se em diversos tipos celulares (Lemischka, 2005). Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (Blau *et al.*, 2001; Fodor, 2003).

Baseados na sua origem existem dois tipos principais de células-tronco: células-tronco embrionárias (ES) e células-tronco adultas (AS). Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco na vida pós-natal, a medula óssea foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco

hematopoiéticas (*hematopoietic stem cells – HSC*), quanto de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells – MSC*).

Friedenstein *et al.* (1968, 1987) foram o primeiro grupo a identificar uma população celular semelhante a fibroblastos, que era aderente, clonogênica e com capacidade de auto-renovação na medula óssea, denominadas células-tronco estromais da medula óssea (*bone marrow stromal stem cells – BMSCs*).

Devido a algumas limitações na obtenção das BMSCs, incluindo a dor, morbidade e baixo número de células após a coleta, fontes alternativas de MSCs têm sido procuradas. MSCs derivadas de tecido adiposo obtidas por lipoaspiração (Zuk *et al.*, 2001, Mizuno *et al.*, 2002) e populações de MSC provenientes de sangue de cordão umbilical (UCB), já foram isoladas e caracterizadas (Mareschi *et al.*, 2001). Sendo assim, as MSCs podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo e fornecem suporte estrutural, além de regular a passagem de células através dos tecidos.

Segundo a *International Society for Cellular Therapy*, são três os requisitos mínimos para que uma população de células possa ser classificada como MSC. A primeira é que MSCs da medula óssea são isoladas de uma população de células mononucleares que possuem a capacidade de aderência seletiva à superfície do plástico, quando cultivada *ex vivo*. A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR (marcadores de células hematopoiéticas) não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso (Horwitz *et al.*, 2005).

Portanto, as MSCs devem ser capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e *in vivo*. Em adição à identificação das MSCs baseadas em suas características morfológicas ou fenotípicas, a habilidade de células clonais expandidas em formar estes três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar MSCs genuínas e distingui-las de pré-

osteoblastos, pré-adipócitos ou pré-condrócitos, que dão origem a somente um tipo celular (Bydlowski *et al.*, 2009).

Células-tronco mesenquimais, embora possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias apresentam grandes vantagens, levando-se em conta a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de proliferação em cultura, além de não serem imunogênicas, podendo ser, teoricamente, empregadas em transplantes alogênicos (Bobis *et al.*, 2006). Além disso, estudos têm mostrado que as células mesenquimais adultas são capazes de expressar fatores de transcrição tais como, Oct-4, NANOG e SSAE 3/4, que conferem a estas o seu estado de indiferenciação e pluripotencialidade (Schöler *et al.*, 1991; Baksh *et al.*, 2004; Kolf *et al.*, 2007).

A procura por células semelhantes à células mesenquimais indiferenciadas em tecidos específicos levou à descoberta de uma variedade de células-tronco em quase todos os órgãos e tecidos do corpo nas últimas décadas (revisado por Baksh *et al.*, 2004; Porada *et al.*, 2006; Kolf *et al.*, 2007).

Dentre estes, o tecido dental proporcionou uma grande variedade de células mesenquimais indiferenciadas, incluindo células-tronco da polpa dental (DPSCs) (Gronthos *et al.*, 2000), células-tronco de dentes decíduos exfoliados (SHEDs) (Miura *et al.*, 2003), células do ligamento periodontal de dentes permanentes (PDLSCs) (Seo *et al.*, 2004) e decíduos (Silvério *et al.*, 2010), células-tronco progenitoras do folículo dental (DFPCs) (Morsczech *et al.*, 2005), e células-tronco da papila apical (SCAPs) (Sonoyama *et al.*, 2006,2008).

Durante a caracterização destas novas populações de células indiferenciadas provenientes de tecidos dentais, alguns aspectos de suas propriedades foram comparados às BMMSCs. Uma destas propriedades caracteriza-se na capacidade das células provenientes dos tecidos dentais expressarem marcadores de superfície específicos para células indiferenciadas de origem mesenquimal tais como, Stro-1, CD73, CD90, CD105, CD146, além de se apresentarem negativas para CD14 (monócito/macrófago), CD34 (células progenitoras hematopoiéticas/endotélio), CD45 (antígeno leucocitário comum) e

HLA-DR (Gronthos *et al.*, 2003; Shi & Gronthos, 2003; Shi *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006; Battula *et al.*, 2007; Greco *et al.*, 2007).

Estas populações (DPSC, PDLSC, SHEDs e BMSSSC) quando comparadas após expansão *ex vivo*, demonstraram um padrão de expressão semelhante para uma variedade de antígenos associados ao osso, dentina e cimento (BMPs, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, sialoproteína óssea) e fibroblastos (colágeno tipo III) (Gronthos *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Gronthos *et al.*, 2002; Batouli *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003; Gronthos *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003, Seo *et al.*, 2004), mostrando que as células-tronco dentais apresentam potencial de diferenciação múltipla, com capacidade de originar ao menos três linhagens: osteo/odontogênica, adipogênica, e neurogênica.

Ainda comparando as células mesenquimais dentais e as de medula óssea, estudos mostraram que algumas proteínas em comum são expressas, o que pode implicar na existência de vias de sinalização molecular semelhantes, regulando a formação da dentina, do cimento e do osso, por meio da atividade de importantes fatores de transcrição (Runx2, Msx1/2, Dlx1/2, e Pax6/9) e fatores de crescimento (BMP, FGF, TGF, e WNT) (Salazar-Ciudad & Jernval, 2002; Peters & Balling, 1999; Thesleff & Aberg, 1999). Entretanto, algumas diferenças foram notadas entre estas populações de células-tronco. Elas diferem significativamente na sua capacidade proliferativa e no potencial de desenvolvimento *in vitro* e, mais ainda, na sua capacidade de se desenvolver em tecidos distintos representante dos microambientes dos quais foram derivados *in vivo*.

Adicionalmente, o mesênquima dental é chamado ectomesênquima devido à sua precoce interação com a crista neural. Por esta perspectiva, células-tronco dentais ectomesenquimais podem possuir características diferenciadas, semelhantes às das células da crista neural (revisado por Huang *et al.*, 2009).

Semelhante às outras células tronco dentárias descritas acima, PDLSCs apresentam características osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas sob condições de cultura definidas (Gay *et al.*, 2007; Lindroos *et al.*, 2008; Xu *et*

*al.*, 2009). A comprovação de que o ligamento periodontal possuía células progenitoras foi confirmada Seo *et al.* (2004). Neste estudo, os autores demonstraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes contém uma peculiar população de células indiferenciadas (PDLSCs) (células-tronco), as quais apresentaram marcação positiva para Stro-1 e CD146, marcadores relacionados à células indiferenciadas, além de apresentarem capacidade de se diferenciar em células com fenótipo de cementoblastos e adipócitos *in vitro*. E que *in vivo* estas células foram capazes de se diferenciar em cementoblastos funcionais e de sintetizar fibras colágenas incorporadas em um tecido ectópico semelhante ao cimento, sugerindo o seu potencial em regenerar cimento e ligamento periodontal.

Mais recentemente, células indiferenciadas também foram isoladas do ligamento periodontal de dentes decíduos e estas demonstraram uma maior taxa proliferativa e maior expressão de genes adipogênicos que as células indiferenciadas do ligamento periodontal de dentes permanentes, sendo que ambas as populações demonstraram capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênicas e osteogênicas/cementogênicas. Deste modo, foi mostrado que PDL de dente decíduo possui uma população de células progenitoras multipotentes, que pode ser isolada e expandida *in vitro* (Silvério *et al.*, 2010).

Um grande desafio para a caracterização das PDLSC é a falta de marcadores específicos associados tanto ao ligamento periodontal quanto ao cimento. Devido à ausência de marcadores conhecidos, e como o ligamento periodontal compartilha algumas características morfológicas e funcionais com o tendão, como feixes de colágeno densos e habilidade de absorver forças mecânicas, Seo e colaboradores (2004) examinaram nas PDLSC a expressão de níveis de *SCLERAXIS*, um fator de transcrição específico para tendão. Eles observaram que PDLSCs expressaram níveis mais altos de *SCLERAXIS* quando comparados às BMMSCs.

Todas estas características vêm sendo confirmadas por outros estudos, que comprovaram a presença de células mesenquimais indiferenciadas

heterogêneas no ligamento periodontal isoladas de dentes extraídos e sua expressão de marcadores mesenquimais de superfície, como Stro-1, CD105, CD146, e CD166, além de sua pluripotencialidade (se diferenciar em adipócitos, células semelhantes a osteoblastos e cementoblastos *in vitro*) (Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007).

Pouco se sabe sobre o nicho das BMMSCs. Descobertas de estudos anteriores sugeriram que BMMSCs e MSC derivadas de tecido adiposo residem nas áreas perivasculares (Shi & Gronthos, 2003; Zannettino *et al.*, 2008). Imunohistoquímica para Stro-1/CD146/CD44 do ligamento periodontal de dentes sadios ou com doença periodontal mostrou que as MSC estão localizadas principalmente na região perivascular, com pequenos grupos de células na região extravascular (Chen *et al.*, 2006b), sugerindo que este possa ser o nicho destas células no ligamento periodontal.

Todos estes dados mostram que PDLSC representam uma população de células-tronco adultas única, que diferem das células mesenquimais derivadas da polpa e da medula óssea. Quando os tecidos periodontais são danificados como resultado do processo inflamatório, as células do ligamento periodontal são ativadas por mediadores solúveis (fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteínas estruturais) para promover reparo ou regeneração do tecido (Bartold *et al.*, 2000). Enquanto pouca regeneração do periodonto pode ser vista nas fases iniciais da doença periodontal, uma vez que a doença se estabelece a regeneração espontânea não mais ocorre sem alguma forma de intervenção terapêutica (Bartold *et al.*, 2000). O processo da regeneração periodontal envolve o recrutamento de população celulares indiferenciadas locais com a capacidade de se desenvolver tanto em células do ligamento periodontal quanto em cementoblastos, que se combinam para assegurar a ligação entre o cimento e o osso alveolar adjacente (Bartold & Narayanan, 1998).

A grande capacidade de potencial de diferenciação das MSCs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células,

através de administração dirigida ao local de interesse, em numerosas situações patológicas.

Alguns estudos desenvolveram transplante de células do PDL em combinação com carreadores e relataram sucesso na regeneração periodontal em modelos animais (Nakahara *et al.* 2004, Seo *et al.* 2004, Sonoyama *et al.* 2006, Liu *et al.* 2008, Iwata *et al.* 2009). Dentro desta linha, um estudo avaliou o uso do transplante autógeno de células do ligamento periodontal (PDLs), associado à regeneração tecidual guiada, verificando que a terapia celular favoreceu a regeneração periodontal (formação de novo osso e novo cemento com fibras inseridas) em defeitos de furca grau III em cães (Suaid *et al.*, 2012).

Baseado nos achados obtidos no campo da medicina, vários estudos na odontologia estão sendo delineados para identificar e caracterizar as populações de células-tronco derivadas de tecidos dentais, com o objetivo de promover abordagens regenerativas mais previsíveis para os tecidos perdidos por consequência de doença e/ou trauma (Seo *et al.*, 2004; Bartold *et al.*, 2006; Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002; Batouli *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005; Shi & Gronthos, 2001).

Neste sentido, a terapia regenerativa baseada em células-tronco ganhou atenção desde o isolamento de células mesenquimais indiferenciadas de vários tecidos. Tentativas de regenerar os tecidos periodontais tinham o enfoque quase que exclusivamente na regeneração do osso alveolar perdido, utilizando enxertos autógenos, alógenos e aloplásticos. No entanto, a maioria destes procedimentos tem demonstrado uma grande variabilidade em sua segurança, efetividade e estabilidade ao longo do tempo, e desse modo, sua efetividade na regeneração periodontal questionada (Bartold *et al.*, 2000).

Na tentativa de se obter um procedimento regenerativo efetivo, um relato de caso clínico demonstrou que a combinação de plasma rico em plaquetas (PRP) com BMMSCs autólogas expandidas em cultura propiciou uma melhor cicatrização de defeitos periodontais angulares (Yamada *et al.*, 2006b). No único estudo clínico humano relatado até o momento utilizando células progenitoras do

ligamento periodontal, defeitos periodontais infraósseos de três pacientes foram tratados com células progenitoras autólogas associadas ao material de enxerto ósseo, e foram monitorados dos 3 aos 72 meses. Os resultados deste estudo demonstraram que, dois dos três pacientes que se submeteram a avaliação cirúrgica da regeneração dos tecidos exibiram um ganho razoável de tecido saudável. O terceiro paciente avaliado apresentou redução na mobilidade dental, redução na profundidade de sondagem, um aumento na recessão gengival e uma melhora estável no nível clínico de inserção. O estudo concluiu que o uso de células progenitoras autólogas do ligamento periodontal pode ser eficaz e seguro no tratamento dos defeitos periodontais (Feng *et al.*, 2010).

Devido à heterogeneidade das PDLSCs em sua capacidade de proliferar e diferenciar-se em células que formam o tecido periodontal, são necessários mais estudos para investigar a forma como as células-tronco atuam no processo de regeneração (Silvério *et al.*, 2010).

A promessa da medicina regenerativa e curativa baseada em células-tronco e, particularmente, nas MSCs, depende criticamente da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam a diferenciação de uma determinada linhagem celular, e a deposição de componentes da matriz extracelular a fim de se direcionar a formação de tecidos específicos. Adicionalmente, há a necessidade de se compreender as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação deste tipo celular (MSCs).

Devido à complexidade de tecidos presentes no periodonto, a utilização de células mesenquimais indiferenciadas para a terapia celular, ou seja, inoculação de células na área a ser regenerada, parece ser uma alternativa muito interessante, uma vez que as mesmas são autorrenováveis, apresentam alta proliferação e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Elangovan *et al.*, 2009; Silvério *et al.*, 2010). No entanto, considerando o alto nível de organização do aparato de inserção do ligamento periodontal e a heterogeneidade de suas células, a identificação dos tipos celulares apropriados para a completa regeneração, permanece um dos

fatores chave na implementação de abordagens ideais para a regeneração periodontal.

Apesar do enorme número de dados em nível molecular e celular disponíveis, é evidente que questões fundamentais ainda precisam ser mais bem elucidadas antes que células progenitoras mesenquimais possam ser utilizadas para aplicações clínicas seguras e eficazes, tanto no âmbito das terapias celular quanto na genética.

## 2.2 Os componentes do processo inflamatório e seu efeito sobre as células mesenquimais indiferenciadas

### *2.2.1 A doença periodontal e a Porphyromonas gingivalis*

A doença periodontal é uma doença inflamatória, que se caracteriza pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes, incluindo o ligamento, cemento, osso alveolar e gengiva, sendo caracterizada por perda de inserção periodontal. O biofilme dental é um acúmulo de bactérias, nutrientes, células do hospedeiro e produtos metabólicos em um ambiente especializado (Costerton *et al.*, 1994). Este biofilme está envolto por uma matriz extracelular que fornece vantagens seletivas aos microrganismos que incluem uma grande barreira protetora contra antimicrobianos e agentes fagocíticos da resposta imune do hospedeiro, além de favorecer trocas genéticas (Gilbert *et al.*, 1993).

A doença periodontal se desenvolve como um resultado da contínua interação entre as células do hospedeiro e bactérias patogênicas subgengivais, como as gram-negativas anaeróbias (Darveau, 2009). Podemos considerar a etiologia da doença multifatorial, porém, o biofilme microbiano desempenha uma função essencial na etiopatogênese das infecções periodontais, sendo o fator etiológico primário de qualquer tipo de doença periodontal (Lamont & Jenkinson, 1998).

A cavidade oral humana hospeda grande quantidade e variedade de microrganismos, mais de 500 espécies de diferentes microrganismos já foram

isoladas e identificadas. Apesar deste grande número de espécies bacterianas identificadas no ambiente do sulco gengival e/ou bolsa periodontal, evidências revelam que o processo de destruição do periodonto envolve o estabelecimento e crescimento de algumas espécies bacterianas específicas. Nesse quadro, aparentemente alguns anaeróbios gram-negativos produtores de pigmento negro possuem um papel importante na etiopatogenia da doença periodontal (Socransky & Haffajee, 1992).

Dentre estas espécies, a bactéria anaeróbica *Porphyromonas gingivalis*, é reconhecidamente um dos patógenos de maior importância no desenvolvimento da doença periodontal (Holt *et al.*, 1999) e tem sido extensivamente estudada nos últimos anos, sendo uma bactéria oral gram-negativa, produtora de pigmentos negros, e comumente encontrada em bolsas periodontais profundas, especialmente em sítios com a doença ativa (van Winkelhoff *et al.*, 1988).

*P. gingivalis* apresenta componentes bioativos, tais como membrana citoplasmática, peptídeoglicanos, as proteínas da membrana externa, o LPS, cápsulas, e fímbrias em sua superfície celular (Offenbacher, 1996). Esta espécie está altamente associada com a forma crônica da doença periodontal, e pode ser detectada em até 85% dos sítios acometidos pela doença (Yang *et al.*, 2004). É frequentemente encontrada no sulco gengival de pacientes que apresentam condições clínicas saudáveis, porém os níveis de contaminação são bem maiores em sítios com doença periodontal crônica (Socransky & Haffajee, 2005). Van Winkelhoff *et al.* (2002) relataram que *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram significativamente mais prevalentes em pacientes com destruição periodontal, e que a presença *P. gingivalis* é a indicação mais forte para destruição periodontal, pois sua presença em uma bolsa periodontal pode prever progressão da doença (van Winkelhoff *et al.*, 2002), além disso, uma correlação positiva e significativa é encontrada entre os números de *P. gingivalis* e a profundidade da bolsa (Kawada *et al.*, 2004). Após o tratamento periodontal, uma redução do número de *P. gingivalis* está associada com a resolução da doença no local afetado (Haffajee *et al.*, 1997; Fujise *et al.*, 2002). Além disso, a inoculação experimental de *P. gingivalis*

em modelos animais induz uma resposta inflamatória e a perda óssea (Evans *et al.*, 1992, Hajishengallis *et al.*, 2011).

O LPS da *P. gingivalis*, um dos componentes de maior virulência da membrana externa destas bactérias gram-negativas, possuem múltiplas ações inflamatórias, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias, e estão envolvidos na destruição dos tecidos periodontais, incluindo osso alveolar, gengiva e ligamento periodontal (Hausmann *et al.*, 1972; Iino & Hopps, 1984; Slots & Genco, 1984; Millar *et al.*, 1986; Mayrand & Holt, 1988; Moore *et al.*, 1991; Socransky & Haffajee, 1992).

O LPS é uma combinação de lipídeo (lipídeo A) e polissacarídeo, sendo um componente exclusivo da membrana externa de bactérias gram-negativas (Morrison & Ryan, 1987; Rietschel *et al.*, 1994). A porção mais conservada da estrutura proteica é o lipídeo A. Esta endotoxina é um antígeno não específico que é pobremente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar a cascata do complemento (Schifferle *et al.*, 1993).

As células derivadas do ligamento periodontal não somente funcionam como células suporte dos tecidos periodontais como também produzem vários mediadores inflamatórios que reconhecem os componentes bacterianos como o LPS (Tamura *et al.*, 1992; Yamaji *et al.*, 1995). Sabe-se que estas citocinas desempenham um papel importante na patogênese da periodontite porque causam inflamação e destruição do tecido periodontal e reabsorção do osso alveolar por variados mecanismos biológicos. No entanto, o mecanismo exato da periodontite ainda permanece obscuro, e pouco se sabe sobre a cascata de sinalização da resposta do hospedeiro. Assim, o LPS da *P. gingivalis*, que é único devido às suas atividades endotóxicas, é um fator-chave no desenvolvimento da periodontite.

### 2.2.2 Os receptores Toll-like (TLRs)

LPS são importantes fatores de virulência dos periodontopatógenos. Sabe-se que eles interagem com os receptores do tipo *Toll-Like* e que estes são

expressos por inúmeros tipos celulares, inclusive células do ligamento periodontal (Mahanonda & Pichyangkul, 2007).

Receptores *Toll-like* em mamíferos foram identificados como uma família homóloga dos receptores da espécie *Drosophila* (Kopp & Medzhitov, 1999), e a família dos *Toll-like* está envolvida no reconhecimento dos componentes da parede celular bacteriana (Medzhitov *et al.*, 1997). Mais de dez membros da família TLR já foram identificados em humanos e camundongos. O interesse nestes receptores se intensificou desde a descoberta que estes receptores participam da sinalização intracelular iniciada por bactérias gram-negativas.

TLRs são proteínas transmembrana do tipo I e são compostos por repetições extracelulares ricas em leucinas (LRRs), domínios estes que são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), moléculas existentes em bactérias e vírus que estimulam a resposta inflamatória – LPS nas bactérias gram-negativas e flagelina e ácido lipoteicóico nas bactérias gram-positivas – além do domínio intracelular TIR (Toll/IL-1R), que é essencial para a sinalização *downstream*, ativando NF- $\kappa$ B e MAPK, que desencadeiam o processo inflamatório (Akira *et al.*, 2006).

Entre esses receptores, TLR2 e TLR4 funcionam como principais sensores inatos para os componentes da parede celular de bactérias gram-negativas, e podem ser muito importantes no progresso da periodontite (Mahanonda *et al.*, 2007; Gaddis *et al.*, 2009; Matera *et al.* 2009). Porém, já foi descrito que o reconhecimento da *P. gingivalis* ou seus componentes por células do hospedeiro pode ocorrer via TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9 e CD14 (Hajishengallis *et al.*, 2002a, b, 2006, 2008; Wang & Ohura, 2002; Nonnenmacher *et al.*, 2003; Darveau *et al.*, 2004; Nociti *et al.*, 2004; Kikkert *et al.*, 2007; Zhou & Amar, 2007; Gaddis *et al.*, 2009; Sahingur *et al.*, 2010).

A expressão de TLR2 e TLR4 foi confirmada em células humanas de PDL (Hatakeyama *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008, 2010), mas não se sabe exatamente como, e se, a ativação de TLR2 e/ou TLR4 está envolvido na sinalização desencadeada por bactérias periodontais gram-negativas, como *P.*

*gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tem sido relatado também que o TLR4 é essencial para a resposta ao LPS (Takeuchi *et al.*, 1999). Hatakeyama *et al.* (2003) demonstraram que os fibroblastos humanos gengivais e do ligamento periodontal expressam TLR4, e que quando este receptor foi bloqueado, houve uma significativa redução à resposta de ambas as células ao LPS bacteriano, sugerindo que LPS atua diretamente sobre estas células.

Outros achados sugerem que TLR4 é o receptor dominante para pelo menos alguns tipos de LPS, enquanto que TLR2 não é necessário para o reconhecimento de LPS. Tem-se sugerido que TLR2 medeia os sinais provenientes de outros componentes bacterianos, incluindo o ácido lipoteicóico, peptídeoglicano, e lipoproteínas/lipopeptídeos (Brightbill *et al.*, 1999; Hirschfeld *et al.*, 1999, 2001; Schwandner *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 1999). A partir destes resultados, pode-se sugerir que o TLR2 e TLR4 em fibroblastos gengivais reconhecem diferentes componentes da parede celular bacteriana: TLR2 medeia a resposta ao peptídeoglicano e lipoproteínas, enquanto TLR4 medeia a resposta a o LPS e ácido lipoteicóico. Porém, Hirschfeld *et al.* (2001) mostraram que o LPS da *P. gingivalis* não sinaliza por meio do TLR4, e que a sinalização via TLR2 e TLR4 diferiram quantitativamente e qualitativamente em macrófagos de ratos.

Portanto, torna-se importante o entendimento da relação TLR2 e TLR4 nas células periodontais. Mais estudos são necessários para elucidar as diferenças dentre estes receptores.

### 2.2.3 O efeito do LPS sobre diferentes tipos celulares

O LPS de bactérias gram-negativas é indicado como sendo um dos responsáveis pela indução da reabsorção óssea. O LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (*IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-8*), o fator de necrose tumoral (*TNF- $\alpha$* ), fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas por macrófagos e neutrófilos presentes em áreas infectadas por bactérias (Wilson *et*

*al.*, 1996; Lindemann *et al.*, 1988), e em fibroblastos do ligamento periodontal de ratos (Miyachi *et al.*, 2001), além de ativar plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. Estas citocinas são conhecidas como tendo um papel importante na patogênese da doença periodontal, porque causam inflamação e consequente destruição do tecido periodontal e reabsorção óssea, agindo de forma direta e indireta sobre os osteoclastos (Kobayashi *et al.*, 2000). Tem sido relatado que o LPS promove a indução de osteoclastos indiretamente através da ativação de receptores do tipo *Toll-like 4* (Hou *et al.*, 2000).

Estudo realizado por Wada *et al.* (2004), demonstrou que em fibroblastos de ligamento periodontal, o LPS é capaz de induzir o aumento de RNAm de osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do ligante kappaB fator nuclear (RANKL) devido aos estímulos de *IL-1 $\beta$*  ou *TNF- $\alpha$* , porém, estas células não são capazes de induzir osteoclastogênese. Resultados similares de aumento de RNAm de OPG e decréscimo de RNAm de RANKL foram observado em células de cementoblastos estimuladas com LPS de *P. gingivalis* (Nociti *et al.*, 2004).

O conceito de que a infecção com bactérias específicas é necessária para iniciar ou agravar a perda óssea associada à doença periodontal foi testada por Loomer e cols (1995) que avaliaram a diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos tratando-as com extratos bacterianos de periodontopatógenos ou não, e observou que há uma redução na osteogênese somente das células tratados com periodontopatógenos, e que o LPS nas concentrações de 1ug/ml e 10ug/ml induziu o mesmo efeito que o extrato bacteriano, sendo que não houve efeito detectável na concentração de 0.1mg/ml.

A bactéria viável pode interagir de maneira diferente com as células do ligamento periodontal ou com os fibroblastos gengivais se comparadas ao LPS somente, por isso um estudo de Scheres *et al.* (2011) avaliou a indução de citocinas nestas células na presença da *P. gingivalis* viável de pacientes com e sem doença periodontal. Os resultados mostraram um aumento na expressão de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-8* em ambos os grupos na presença de *P. gingivalis*, além de uma

maior expressão de *TLR1*, *TLR4*, *TLR7* e *CD14* nas células de pacientes com periodontite, com ou sem desafio microbiano. Outro grupo relatou que fibroblastos gengivais expressam TLR2 e 4, e que o estímulo com LPS da *P. gingivalis* elevou seus níveis de expressão (Tabeta *et al.*, 2000).

Do mesmo modo, outros estudos mostraram que LPS induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células dos tecidos orais e, além disso, que este LPS também inibe a diferenciação de células-tronco da polpa (Yamaji *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Nomiya *et al.*, 2007). Estudos tem mostrado que a exposição das células ao LPS bacteriano não interfere na proliferação e viabilidade das células pré-osteoblásticas (Kadono *et al.*, 1999), células mesenquimais de medula-óssea (Mo *et al.*, 2008), células mesenquimais de tecido adiposo (Hwa *et al.*, 2006) e células do ligamento periodontal (Jönsson *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2006).

Células do ligamento periodontal foram tratadas com LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*) com diferentes concentrações em tempos variados e pode-se verificar que mesmo após três semanas de exposição ao LPS bacteriano não houve mudança nas características destas células (Jönsson *et al.*, 2008). Da mesma forma, estas células não apresentaram mudanças morfológicas ou fisiológicas quando foram cocultivadas com *P. gingivalis* (Yamamoto *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que os LPS de endotoxinas bacterianas afetam especificamente a produção de citocinas e quimiocinas, enquanto não possuem qualquer efeito sobre as propriedades fisiológicas normais de células de PDL. Assim, as células PDL parecem preservar as suas propriedades estruturais e fisiológicas, isto é, a síntese do colágeno e proliferação, mesmo quando são expostas às endotoxinas bacterianas como LPS.

A partir destes relatos, é razoável supor que a eficácia das preparações de LPS de *P. gingivalis* na indução de uma resposta biológica depende da natureza das respostas e do tipo celular testados, da cepa de *P. gingivalis* utilizada, e, eventualmente, o método de preparação de LPS (Wang & Ohura, 2002).

#### 2.2.4 O efeito do processo inflamatório nas células mesenquimais indiferenciadas

O crescente interesse na utilização de MSCs como uma fonte de terapia celular direciona os novos estudos a tentar compreender o potencial impacto das toxinas bacterianas sobre o crescimento e diferenciação das MSCs, tornando esta uma preocupação crescente. A exposição a um ambiente enriquecido de endotoxinas pode afetar muitos aspectos das propriedades de MSCs tais como a auto-renovação, potencial de diferenciação, produção de citocinas e de compostos da matriz extracelular.

Estudo na área médica avaliou qual seria o resultado de episódios recorrentes de inflamação, como pode ser visto na esclerose múltipla recorrente-remittente, em modelo animal, induzido pela injeção de citocinas pró-inflamatórias ( $TNF-\alpha$  e interferon- $\gamma$ ), simulando um processo inflamatório crônico cerebral, e verificou que as propriedades proliferativa, migratória e a plasticidade das células-tronco da zona subventricular são significativamente comprometidas (Pluchino *et al.*, 2008).

Da mesma forma, o dano arterial constante (aterosclerose) provoca a libertação de citocinas, que por sua vez estimulam a libertação das células progenitoras endoteliais para a área de lesão. O reparo do endotélio danificado pelas células progenitoras completa o processo, evitando a invasão de mais células inflamatórias. A exposição continuada às citocinas e o avanço da idade podem esgotar o armazenamento de células progenitoras. Uma doença crônica pode consumir algumas das células de reparo que se originam a partir da medula óssea e que poderiam ser necessárias para prevenir a doença em outros órgãos (Goldschmidt-Clermont & Peterson, 2003).

Sendo a periodontite uma doença inflamatória crônica e a cavidade oral um ambiente microbiano complexo, uma profunda compreensão da diferenciação de MSCs no microambiente periodontal torna-se essencial e o controle da infecção durante a cicatrização, fundamental (Zhao *et al.*, 2008), uma vez que

alguns estudos sugerem que as células do ligamento periodontal podem alterar seu fenótipo em resposta à inflamação promovida por lipopolissacarídeos (Somerman *et al.*, 1990; Takashiba *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2006).

A presença do LPS bacteriano pode modificar o fenótipo das células do ligamento periodontal por meio da *IL-1 $\beta$* , modulando suas características, e tornando-as mais responsivas ao LPS, participando ativamente no processo de doença em detrimento das suas propriedades estruturais normais e funções, como as características de células semelhantes à osteoblastos (Agarwal *et al.*, 1998).

O melhor entendimento da interação entre as células-tronco e o sistema imune é fundamental, pois as respostas imunes devem ser notadas, como mostrado em estudos *in vivo* (Poncelet *et al.*, 2007), para que as MSC possam ser usadas em diversas aplicações clínicas, incluindo a regeneração periodontal. Mais estudos devem ser realizados para determinar se as PDLSCs alogênicas podem suprimir a rejeição do hospedeiro receptor a curto e longo prazo e para elucidar como estas células mesenquimais indiferenciadas se portam frente ao desafio bacteriano constante, como o de uma doença inflamatória crônica.

Desta forma, a compreensão da interação entre as células progenitoras que residem no ligamento periodontal e as toxinas bacterianas e citocinas inflamatórias torna-se fundamental uma vez que estas células são a principal fonte da regeneração periodontal.

### **3. PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a exposição das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos (PDLMSCs) ao lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e da *Eschechiria coli* (*Ec*), levaria a alterações que comprometessem as propriedades relacionadas ao fenótipo mesenquimal indiferenciado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolamento e caracterização das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos (PDLMSCs)

#### *4.1.1 Cultura de células*

Para a realização desse estudo foram utilizadas cinco populações de culturas primárias de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos. Para tal, foram selecionados cinco pacientes, com idades entre 19 a 22 anos, sistemicamente saudáveis, não fumantes, sem história de medicação nos últimos seis meses, e com indicação de extração dos seus terceiros molares inclusos (superiores e inferiores). Todos os voluntários selecionados estavam em tratamento nas clínicas de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, e receberam todas as orientações referentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da pesquisa, seguindo as recomendações da Resolução 196/96 do CNS. O protocolo adotado para sua obtenção e caracterização foi descrito por Silvério *et al* (2010). Brevemente, terceiros molares inclusos indicados para exodontia foram obtidos de cinco pacientes saudáveis. O ligamento periodontal do terço médio destes dentes foi gentilmente removido, digerido em uma solução de colagenase/dispase (Gibco BRL), e uma suspensão celular foi obtida “passando” as células através de um *cell strainer* de 100µm de diâmetro (BD Bioscience, Miami, FL, USA). Esta suspensão celular foi centrifugada, e o pellet celular obtido foi cultivado em meio de cultura padrão composto por DMEM, soro fetal bovino (FBS) a 10%, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), em condições ideais de cultura, a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub> e 98% de umidade até alcançar subconfluência.

#### 4.1.2 Separação magnética

Depois de alcançado a subconfluência (70-80% de confluência), as populações heterogêneas de células do ligamento periodontal foram purificadas para o antígeno de superfície CD105, utilizando a técnica de separação magnética (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, as células foram resuspendidas em 80 ml de tampão fosfato salino suplementado com 0,5% de FBS (Gibco BRL) e incubadas com 20µl do *microbead* CD105 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) por 15 minutos a uma temperatura de 6°C a 12°C. Então, as células foram lavadas duas vezes, resuspendidas em 500µl de 0,5% de FBS e aplicadas a uma coluna do tipo MS acoplada a um separador magnético (MACS *separator*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). As células que passaram diretamente pela coluna constituíram a fração CD105<sup>-</sup>, enquanto que, as células que permaneceram retidas no interior da coluna, constituíram a população marcada positivamente para o antígeno CD105. A coluna magnética foi lavada três vezes com solução de tampão fosfato salino a 0,5% de FBS, as células CD105<sup>+</sup> foram coletadas e a sua proporção em relação ao número inicial de células foi determinada, utilizando um hemocitômetro. Em seguida, essas células foram expandidas em meio de cultura padrão e, após alcançarem subconfluência, foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, utilizando-se como meio de congelamento o *Recovery™ Cell Culture Freezing Medium* (Gibco BRL). Somente as células entre a segunda e quinta passagem foram utilizadas para os experimentos.

#### 4.1.3 Imunofluorescência para STRO-1

O ensaio de imunofluorescência para STRO-1 foi realizado (tendo como objetivo confirmar o fenótipo mesenquimal indiferenciado das cinco populações de células CD105+). Para tanto, as células foram semeadas sobre lamínulas específicas para microscopia (13mm, Knittel® GmbH - Braunschweig, Germany) na concentração de 4x10<sup>4</sup> e mantidas em meio de cultura padrão por 24 horas.

Após esse período, as colônias celulares foram fixadas em 4% de paraformaldeído por 10 minutos à temperatura ambiente. Para prevenir ligação inespecífica, as células foram tratadas com 3% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) por 30 minutos, previamente à exposição do anticorpo monoclonal anti-STRO-1 humano (diluição de 1:50; Millipore, Billierica, MA, USA) por 1 hora. Em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG Alexa fluor 488* (diluição 1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 1h, e o núcleo foi corado com TO-PRO®-3 *iodide 642/661* (diluição 1:2000, Invitrogen) por 15 minutos. As lâminas foram montadas utilizando-se o Vectashield (Vector Laboratories) e visualizadas em seguida no microscópio confocal (Leica TCS SP5AOBS) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Como controle da reação, células CD105<sup>+</sup> não foram incubadas com o anticorpo primário, seguindo os demais passos de maneira semelhante.

#### 4.2 Avaliar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 pelas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal.

##### *4.2.1 Imunofluorescência para TLR2 e TLR4*

Após a caracterização do fenótipo mesenquimal indiferenciado, verificamos se as células CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> expressavam os receptores TLR2 e TLR4, os quais promovem o reconhecimento dos LPS bacterianos pela “célula-alvo” (Jones *et al.*, 2010). Para tal, as células foram semeadas sobre lamínulas específicas para microscopia (13mm, Knittel®) na concentração de 4x10<sup>4</sup> e mantidas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após esse período, a reação de imunofluorescência foi realizada como descrita no item 4.1.3, porém, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais mouse anti-TLR2 ou anti-TLR4 (1:50; Abcam, Cambridge, MA, USA).

##### *4.2.2 Ensaio de Western Blotting para TLR4*

O ensaio de Western Blotting foi realizado, tendo como objetivo confirmar a expressão do receptor TLR4 nas cinco populações de PDLMSCs. Brevemente, as células foram semeadas em pratos para cultura celular de 100mm e mantidas em meio padrão até atingirem 70-80% de confluência. Então, as proteínas celulares foram extraídas, utilizando-se o RIPA buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) suplementado com coquetel inibidor de protease (Sigma, P2714-1BTL), seguindo as especificações do fabricante. Todas as amostras de proteínas foram quantificadas pelo método de coloração de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Benicia, CA, USA) e realizada a leitura para absorvância a 595nm. Em seguida, foram carregadas 25ug de proteína de cada amostra para um gel SDS-PAGE de 10% para eletroforese, as quais foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Hybond ECL, Amersham BioSciences™, Piscataway, NJ, USA) a 4°C *overnight*. Para prevenir ligação inespecífica, a membrana foi incubada com 3% BSA diluído em TBS 0,02M por 1 hora em temperatura ambiente. Então, essa membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com o anticorpo anti-mouse TLR4 (1:1000, Abcam) seguida de lavagem e incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Anti-mouse 1:2500- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 2 horas. A membrana foi exposta a filmes radiográficos (Kodak, Rochester, NY, USA) usando reagente de detecção SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific), por 5 minutos.

#### 4.3 Preparação das soluções de LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*

Para iniciar os experimentos sob indução dos LPS bacterianos, estes foram preparados seguindo as especificações do fabricante quanto à diluição e armazenamento. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque (concentração de 1mg/ml) do LPS da *Porphyromonas gingivalis* (Invivogen, San Diego, CA, USA) e da *Escherichia coli* (Sigma). Para tal, ambos LPS bacterianos foram resuspendidos em 1ml de água esterilizada e livre de endotoxinas, e armazenados

em freezer a uma temperatura de -20°C. No momento da realização de cada experimento, as concentrações de 100ng/ml, 1 µg/ml e 10 µg/ml (Jönsson *et al.*, 2008; Krajewski *et al.*, 2009) foram obtidas por meio da diluição de cada LPS em DMEM a partir da solução estoque.

#### 4.4 Avaliação da viabilidade e da capacidade proliferativa das PDLMSCs expostas aos LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*

As cinco populações de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foram semeadas em placas de 96 poços, a uma concentração de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> ( $0,5 \times 10^4$  cél/poço), e mantidas em meio de cultura de padrão por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura padrão foi substituído por DMEM suplementado com 2% FBS e 1% de penicilina/estreptomicina, contendo os LPS da Pg e Ec nas concentrações de 0, 100ng/ml, 1 µg/ml e 10µg/ml. As células foram incubadas por 10 dias sendo os mesmos meios de cultura trocados a cada 3 dias. Ao final de cada período (dias 1, 3, 7 e 10), 20ul de CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent (Promega Co.,Ltd. Madison, WI, USA) foi adicionado em cada poço e as células incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 2 horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 490nm, sendo a absorbância correspondente ao reagente MTS tetrazolium que foi bio-reduzido em Formazan pelas células em proliferação. Desta maneira, em geral, quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis em proliferação por poço.

#### 4.5 Avaliar o efeito da exposição aos LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* na expressão dos genes para citocinas inflamatórias

As células mesenquimais indiferenciadas foram semeadas em pratos para cultivo celular (60x15 mm) a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/prato, e cultivadas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo o LPS da Pg e Ec nas concentrações de 0, 100ng/ml, 1µg/ml e 10µg/ml. Essas células foram mantidas nessas condições de cultura por 24 horas.

#### 4.5.1. Extração do RNA total

O RNA total foi isolado, utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS-Gibco BRL) em temperatura ambiente. Um mililitro do reagente Trizol® foi adicionado a cada prato de cultura sendo seu o conteúdo (células + reagente Trizol®) transferido para um tubo do tipo *ependorf* e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. A cada tubo *ependorf* foram adicionados 0,2ml de clorofórmio (Merck, Frankfurt, Alemanha), sendo estes agitados cuidadosamente em *vortex*, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 11500rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 0,5ml de isopropanol (Merck), sofrendo agitação em *vortex* e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente os tubos foram centrifugados a 11500rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 75% a 4°C, e seco a temperatura ambiente com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em água MiliQ livre de RNase e então, armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 1µl foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA das amostras, utilizando-se o NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA).

#### 4.5.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA), e 1µg da amostra foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para isto, as reações foram realizadas utilizando-se o kit *First-strand cDNA synthesis* (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20µl. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e então, por 60 minutos a 42°C. Concluído o segundo ciclo de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 99°C e então incubadas por 5 minutos a 4°C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas

concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl<sub>2</sub> (5mM), mistura de deoxinucleotídeos (1mM), *primers* randomizados - p[dN]6 (3,2mg), inibidor de Rnase (50U), e transcriptase reversa – AMV (20U). As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

#### 4.5.3. Desenho do primer

Os *primers* para *GAPDH* (gene de referência), e para a quantificação dos níveis de RNAm para *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8* e *TNF-α* foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar *primers* para o sistema o LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) – Tabela 1. A eficiência das reações para cada *primer* foi otimizada anteriormente ao início das reações de PCRq propriamente ditas.

#### 4.5.4. Reações de PCR quantitativo (PCRq)

As reações de PCRq foram realizadas com o sistema LightCycler 2.0 (Roche), utilizando-se o kit *FastStart DNA Master<sup>plus</sup> SYBR Green I* (Roche). O perfil das reações foi determinado seguindo a fórmula sugerida pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). *GAPDH* foi utilizado como o gene de referência (*housekeeping*) para a normalização dos valores.

### 4.6 Avaliar o efeito da exposição aos LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* no fenótipo mesenquimal das PDLMSCs

#### 4.6.1 Imunofluorescência para STRO-1

As células foram semeadas sobre lamínulas específicas para microscopia (13mm, Knittel®) na concentração de 4x10<sup>4</sup> e mantidas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído

por um novo meio contendo o LPS da Pg e Ec nas concentrações de 0 e 1 µg/ml, e as células foram mantidas por 24h nessas condições de cultura. Após esse período, as colônias celulares foram fixadas em 4% de paraformaldeído por 10 minutos à temperatura ambiente e toda reação de imunofluorescência foi realizada, seguindo o protocolo descrito no item 4.1.3.

#### *4.6.2 Expressão do gene para OCT-4*

As células mesenquimais indiferenciadas foram semeadas em pratos para cultivo celular (60x15mm) a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/prato, e cultivadas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo o LPS da Pg e Ec nas concentrações de 0 e 1 µg/ml, e mantidas por 24 horas. Ao final deste período, o RNA total de todos os grupos foi extraído pelo método do reagente Trizol<sup>®</sup> conforme descrito acima (item 4.5.1). Reações de PCRq foram realizadas para a quantificação dos níveis de RNAm para o gene *OCT-4* (Tabela 1). As reações de PCRq seguiram o protocolo descrito acima (item 4.5.2 ao 4.5.4).

### 4.7 Avaliar *in vitro* a capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblástica das PDLMSCs frente à presença dos LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*

#### *4.7.1 Ensaio de mineralização*

As cinco populações celulares foram semeadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) e cultivadas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após este período, o meio padrão foi substituído pelo meio osteogênico composto por DMEM suplementado com 10% de FBS, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato (βGP) e dexametasona ( $10^{-8}$ M), contendo ou não o LPS de Pg e Ec na concentração de 1 µg/ml. Então, estas células foram cultivadas por 21 dias para permitir a formação dos nódulos minerais, sendo que o mesmo meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Para a análise qualitativa da formação dos nódulos minerais, foi realizado o ensaio de von Kossa, no qual as células foram fixadas com etanol e coradas com  $\text{AgNO}_3$  para detectar fosfato nos nódulos mineralizados (Putschler, 1978).

Para análise quantitativa, a técnica de coloração por vermelho de alizarina (Sigma) foi utilizada (Gregory *et al.*, 2004). Para tal, as células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% gelado por 1 hora. O etanol foi aspirado e as células lavadas com água destilada para remover o etanol remanescente. A cada poço foi adicionada 1mL de uma solução de vermelho de alizarina 40 mM (pH 4,2) em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação. As células foram então lavadas cinco vezes com água, a fim de remover a solução de vermelho de alizarina, e 1 ml de PBS foi adicionado a cada poço por 15 minutos sob agitação, a fim de reduzir a coloração não específica. Para promover a descoloração dos nódulos, foi adicionado 1mL de uma solução de cloreto de cetilperidina a 10% (pH 7,0) por 15 minutos e as alíquotas (em triplicata) desta solução submetidas à análise em um leitor de placas utilizando-se um comprimento de onda de 562nm, baseado na leitura de uma curva padrão.

#### *4.7.2 Expressão de genes marcadores de diferenciação osteoblástica/cementoblástica*

As células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foram semeadas em pratos para cultura (60 x 15mm) a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/prato e cultivadas em meio de cultura padrão. Após 24 horas, o meio de cultura padrão foi substituído pelo meio de cultura osteogênico descrito no item 4.7.1, contendo ou não LPS de Pg e Ec na concentração de  $1\mu\text{g/ml}$ . Essas células foram mantidas nessas condições de cultura por 3, 7 e 14 dias, sendo os meios trocados a cada dois dias. Ao final de cada período, o RNA total de todos os grupos foi extraído conforme descrito no item 4.5.1. Reações de PCRq foram realizadas para a quantificação dos níveis de RNAm para os seguintes genes:

*RUNX-2*, *ALP* e *OCN* (Tabela 1). As reações de PCRq seguiram o protocolo descrito acima (item 4.5.2 ao 4.5.4).

Tabela 1. Sequência de Primers utilizados para amplificações por PCR em tempo real

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Amplicon
<i>ALP</i>	CGGGCACCATGAAGGAAA	GGCCAGACCAAGATAGAGTT	184
<i>OCN</i>	AGCTCAATCCGGACTGT	GGAAGAGGAAAGAAGGGTGC	150
<i>RUNX-2</i>	CCGTCCATCCACTCTACCAC	ATGAAATGCTTGGGAACTGC	139
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	CTTCTTCGACACATGGGATAAC	TTTGGGATCTACTCTCCAGC	283
<i>IL-6</i>	CTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGA	TCAGCAGGCTGGCATT	154
<i>IL-8</i>	GCCAAGAGAATATCCGAACCTTAAT	CTGGCTAGCAGACTAGGG	172
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	TCCACCCATGTACTCCTCAC	CCTCCAGATAGATGGGCTCATA	155
<i>OCT-4</i>	AGCTTAGCTTCAAGAACATGTGTA	GTTGCCTCTCACTCGGT	161
<i>GAPDH</i>	ACATCATCCCTGCCTCTAC	CCACCTTCTTGATGCATCATATTTG	171

*ALP*, alkaline phosphatase; *OCN*, osteocalcin; *RUNX-2*, runt-related transcription factor 2; *IL-1 $\beta$* , interleukin-1 beta; *IL-6*, interleukin 6; *IL-8*, interleukin 8; *TNF- $\alpha$* , tumor necrosis factor alpha; *OCT-4*, octamer-binding protein 4; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

#### 4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software Bioestat 5.3 (Sociedade Civil Mamirauá, Belém, PA, Brasil), sendo os valores apresentados na forma de média e desvio-padrão. Os resultados do ensaio de proliferação celular e expressão dos genes relacionados à diferenciação osteogênica foram submetidos ao teste *Two-way Analysis of Variance* (ANOVA dois critérios), seguido pelo teste de Tukey quando diferenças entre os grupos foram detectadas. Os dados referentes ao ensaio de vermelho de alizarina e expressão do gene Oct-4 foram submetidos ao teste *One-way Analysis of Variance* (ANOVA um critério), seguido pelo teste de Bonferroni. Para análise da expressão das citocinas inflamatórias foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Para todas as análises, o nível de significância utilizado foi de 5%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 5. RESULTADOS

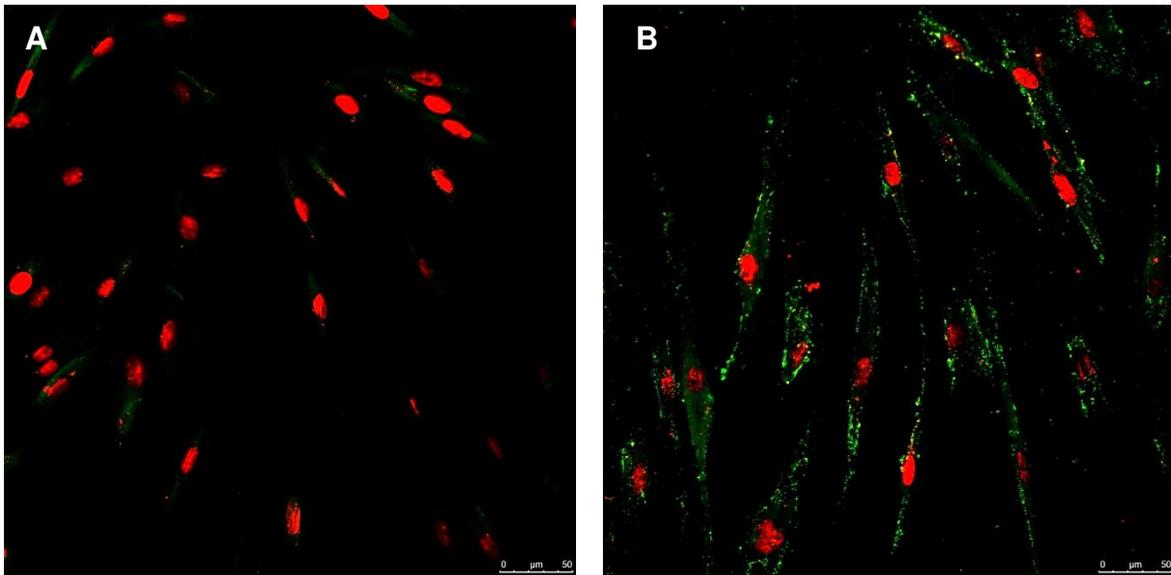
### 5.1 Isolamento e caracterização das PDLMSCs

As culturas primárias de células do ligamento periodontal de humanos foram obtidas a partir de cinco pacientes com idade média de  $20,8 \pm 1,3$ . Microscopicamente, as cinco populações celulares apresentaram morfologia semelhante a fibroblasto, com núcleo arredondado e processo citoplasmático.

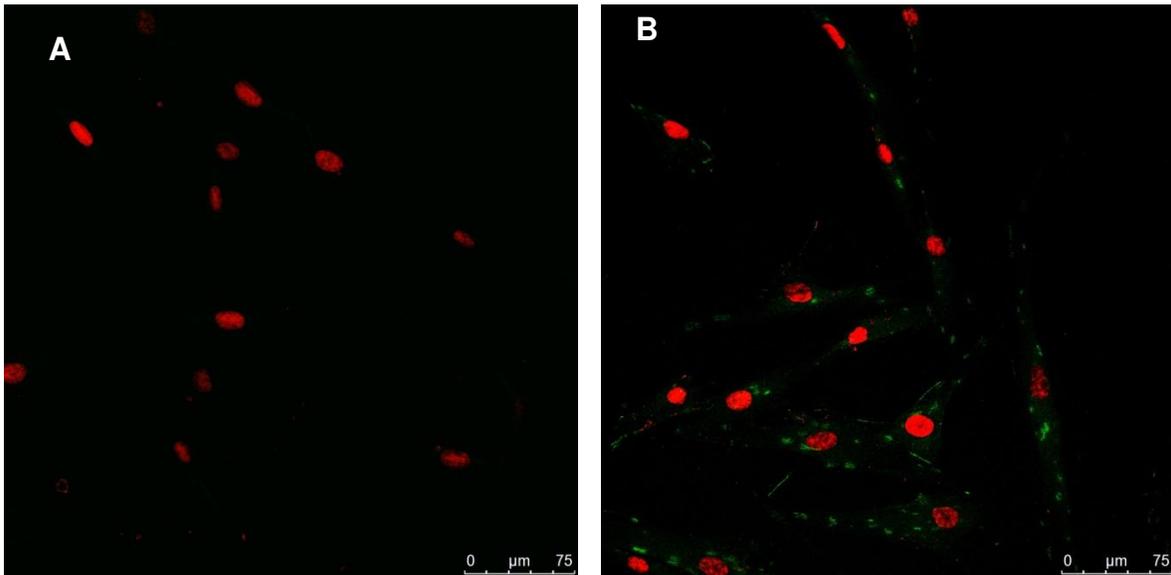
A separação magnética realizada para o antígeno de superfície CD105 mostrou que, em todas as populações celulares avaliadas no presente estudo, a partir de uma concentração inicial de  $1 \times 10^7$  de células do ligamento periodontal, em média 30% das células de cada população eram positivas para o CD105. Após a expansão e cultivo destas células CD105<sup>+</sup> (células de origem mesenquimal), o fenótipo mesenquimal indiferenciado foi confirmado por meio do ensaio de imunofluorescência, o qual revelou a expressão do marcador de superfície STRO-1 pelas cinco populações celulares (Figura 1). Desta maneira, as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal (PDLMSCs) utilizadas no presente estudo foram caracterizadas como sendo CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>.

### 5.2 Avaliação da expressão do receptor *Toll-like 2 e 4* (TLR2 e TLR4) pelas PDLMSCs

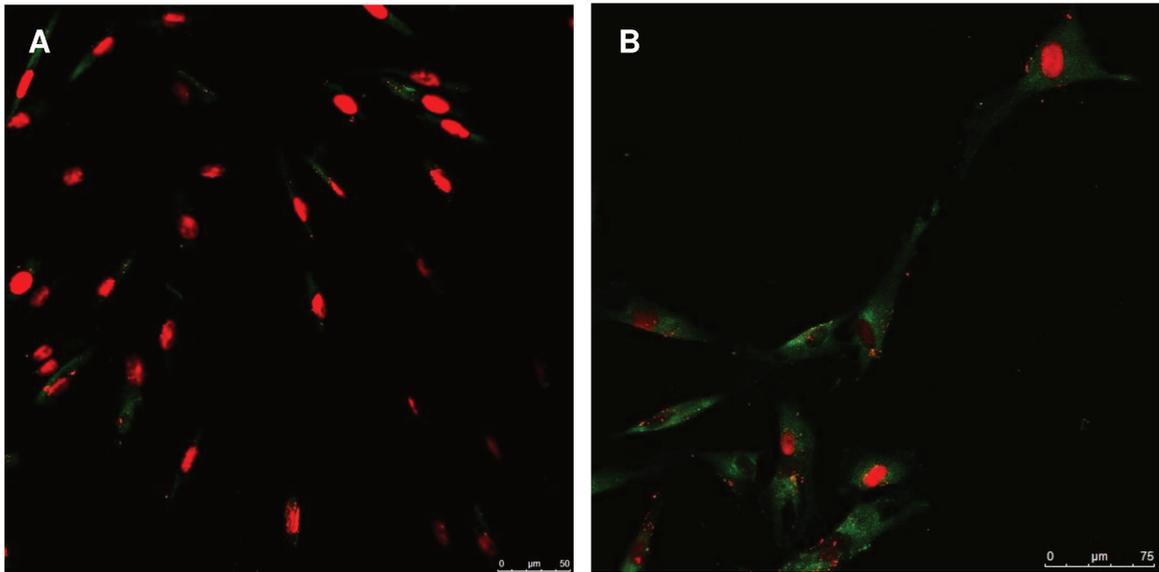
Os resultados do ensaio de imunofluorescência mostraram que, todas as populações de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal avaliadas no presente estudo foram marcadas positivamente para os receptores TLR4 (Figura 2) e TLR2 (Figura 3). Essa positividade para o receptor TLR4 foi confirmada pela técnica *western blotting*, o qual revelou que todas as populações celulares CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> expressam a proteína avaliada (Figura 4).



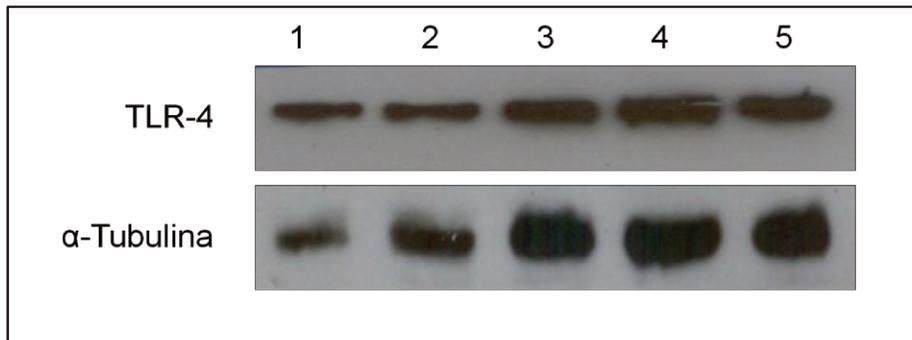
**Figura 1.** Imunofluorescência para Stro-1. (A) Controle negativo, sem a presença do anticorpo primário. (B) Marcação positiva para STRO-1. A positividade está marcada em verde pelo anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG Alexa fluor 488*, diluição 1:1000, sendo o núcleo contra corado com TO-PRO®-3 iodide 642/661.



**Figura 2.** Imunofluorescência para TLR-4. (A) Controle negativo sem a presença do anticorpo primário. (B) Marcação positiva para TLR-4. A positividade está marcada em verde pelo anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG Alexa fluor 488*, diluição 1:1000, sendo o núcleo contra corado com TO-PRO®-3 iodide 642/661.



**Figura 3.** Imunofluorescência para TLR-2. (A) Controle negativo, sem a presença do anticorpo primário. (B) Marcação positiva para TLR-2. A positividade está marcada em verde pelo anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG Alexa fluor 488*, diluição 1:1000, sendo o núcleo contra corado com TO-PRO®-3 iodide 642/661.

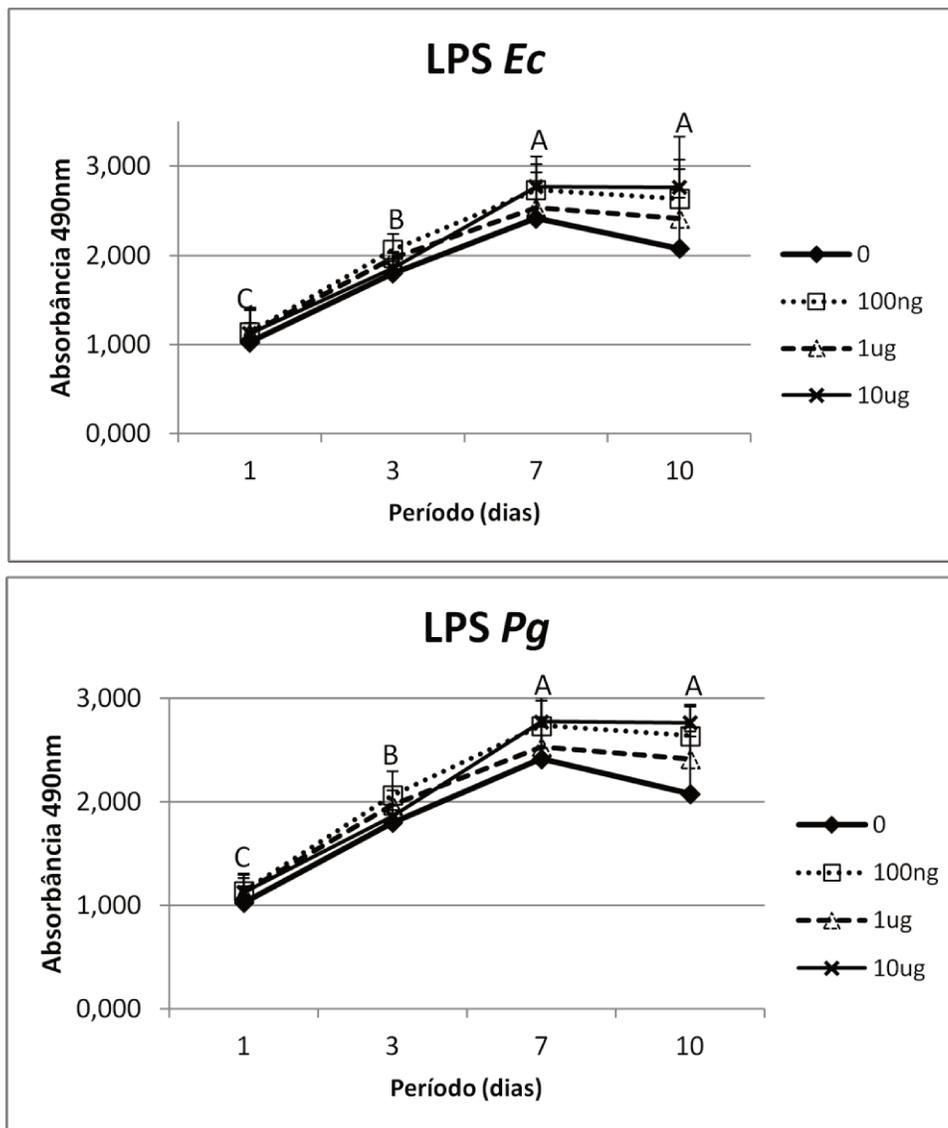


**Figura 4.** Western Blotting. Expressão do TLR-4 nas cinco populações de PDLMSCs.

### 5.3. Avaliação do efeito da exposição aos LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* na proliferação e viabilidade celular

Os resultados mostraram que as células do ligamento periodontal foram capazes de manterem-se aderidas e proliferativas em todas as concentrações de LPS bacteriano. Além disso, nenhuma alteração morfológica foi observada ao longo dos 10 dias de exposição a ambos os tipos de LPS.

A exposição aos LPS da Pg e Ec não alterou o padrão de proliferação celular, a qual se manteve semelhante ao grupo controle (análise intergrupo), sendo que nenhuma das concentrações utilizadas se mostrou tóxica ao longo de 10 dias. A análise intragrupo mostrou que, em todos os grupos o aumento da proliferação celular ocorreu de maneira tempo-dependente, sendo que houve um estímulo crescente do dia 1 até o dia 7 ( $p < 0,05$ ), estabilizando a proliferação no dia 10 (Figura 5).



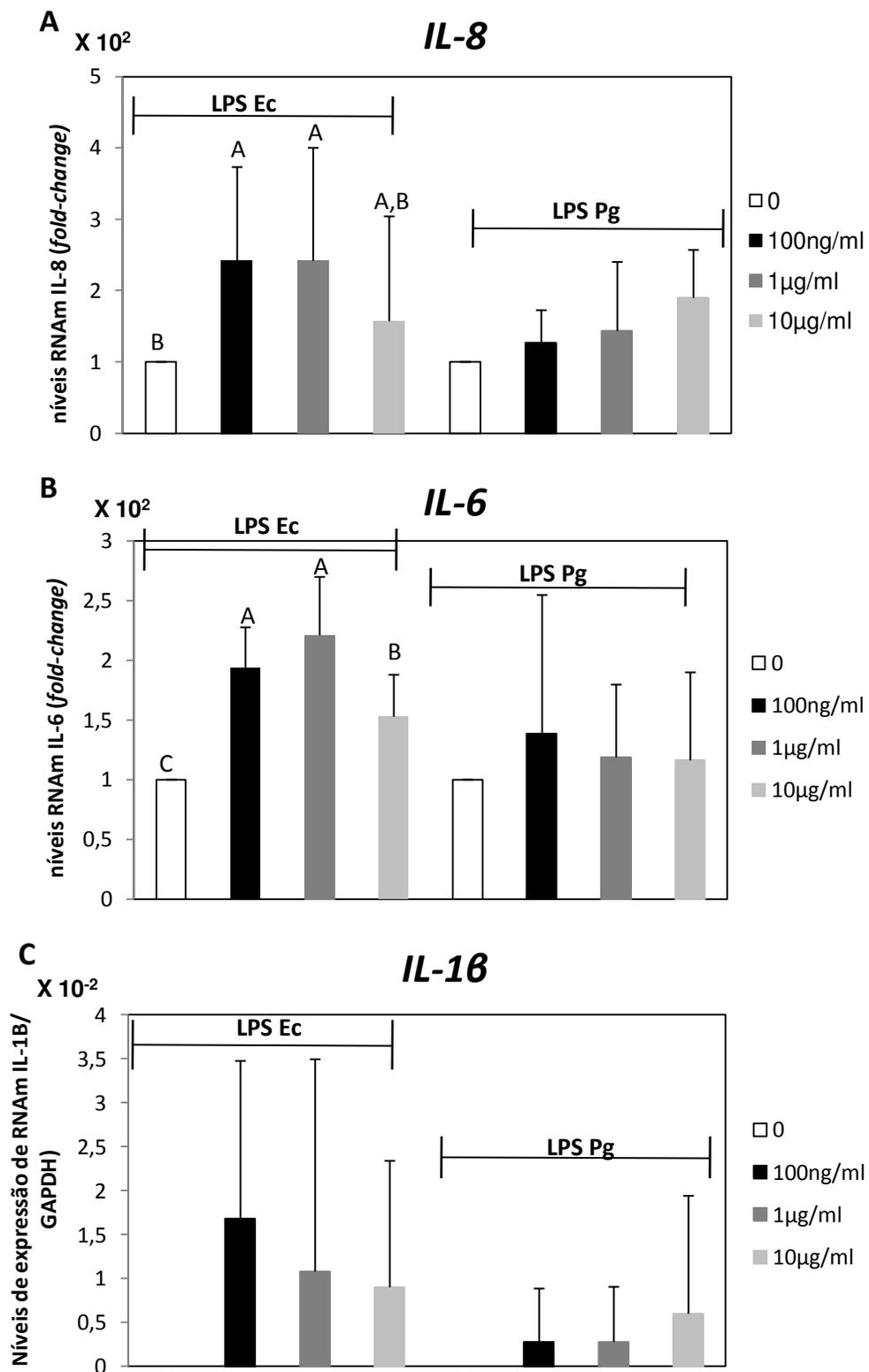
**Figura 5. Proliferação e viabilidade celular.** Capacidade proliferativa das PDLMSCs submetidas ao tratamento com LPS nas concentrações de 100ng/ml, 1µg/ml e 10µg/ml nos dias 1, 3, 7 e 10. Médias e desvio-padrão das cinco populações celulares. Diferentes letras maiúsculas mostram as diferenças intragrupo com o teste ANOVA *two way* seguido pelo teste de Tukey. ( $\alpha = 0,05$ ).

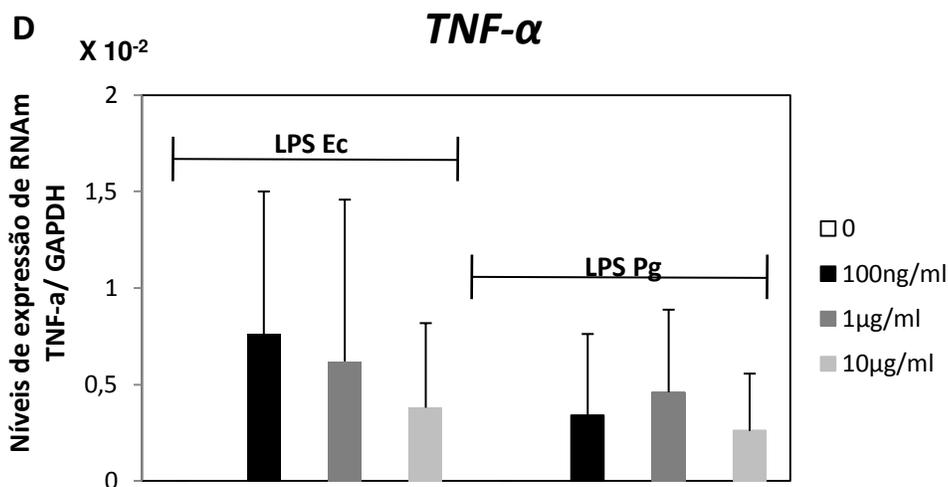
5.4 Avaliar o efeito da exposição ao LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* na expressão de citocinas inflamatórias.

Os resultados do PCRq foram analisados como *fold-change*, ou seja, aumento na expressão dos genes apresentado pelo grupo de células expostas aos LPS bacterianos em relação ao grupo controle.

A exposição das PDLMSCs ao LPS da Ec nas concentrações de 100ng e 1µg/ml promoveu um aumento dos níveis de RNAm para *IL-8* de cerca de 2x mais comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 6A). Um aumento na expressão do gene da *IL-6*, também foi observado quando as células foram cultivadas na presença das três concentrações do LPS da Ec ( $p < 0,05$ ). No entanto, a concentração de 10µg/ml induziu uma expressão mais baixa dos níveis de RNAm para *IL-6* em relação às concentrações de 100ng e 1µg/ml ( $p < 0,05$ ) (Figura 6B). Nenhuma alteração significativa foi observada na expressão dos genes para *IL-1β* e *TNF-α*, quando as células foram expostas ao LPS da Ec independente da concentração testada (Figuras 6C e 6D).

O LPS da *Porphyromonas gingivalis*, nas três concentrações testadas, não foi capaz de induzir a uma resposta inflamatória pelas PDLMSCs. Isto porque, após a exposição ao LPS da Pg, os níveis de RNAm expressos pelas populações de células CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> mantiveram-se semelhantes ao grupo controle para as quatro citocinas inflamatórias avaliadas (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1β* e *TNF-α*) (Figuras 6A-6D).



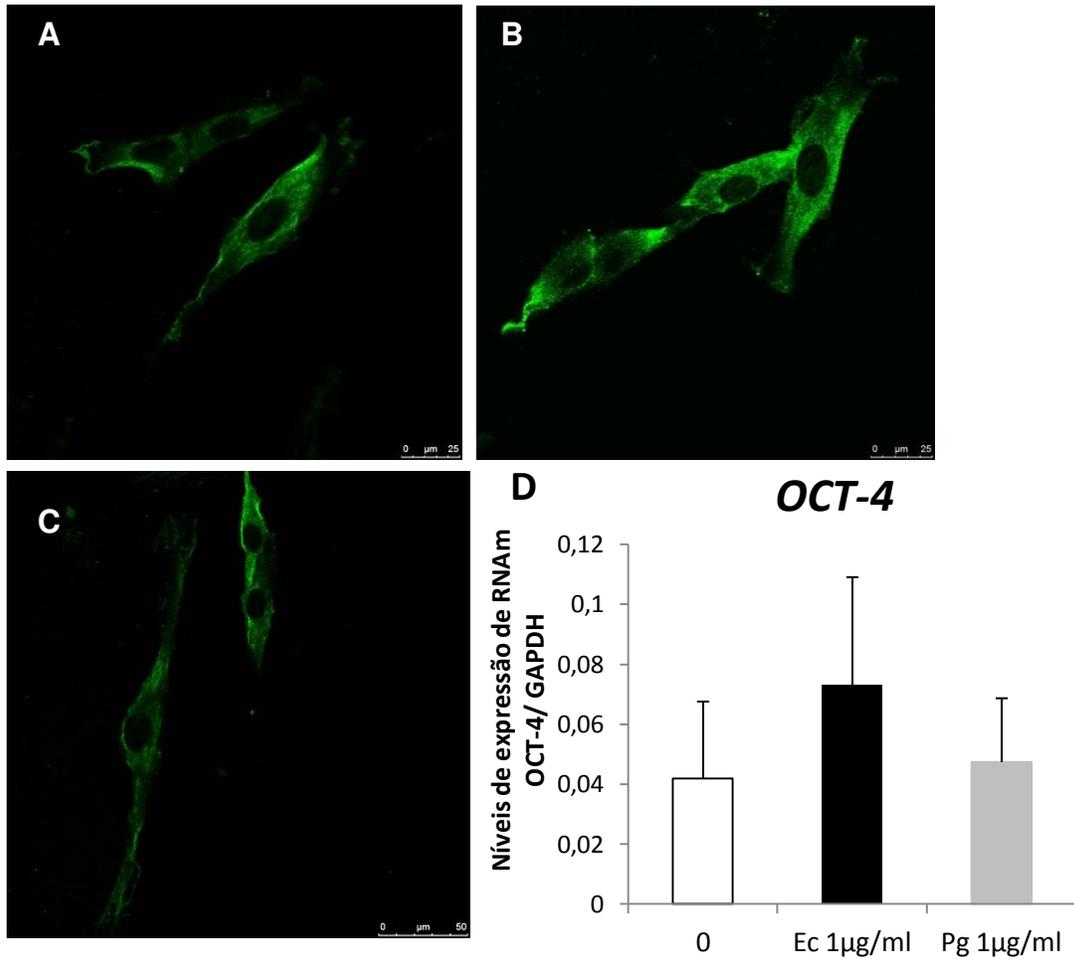


**Figura 6. Expressão de citocinas inflamatórias em PDLMSCs estimuladas com LPS bacteriano por 24h.** (A, B, C, D, E) Média e desvio-padrão dos níveis de RNAm para *IL-8*, *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , e *TNF- $\alpha$* . Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa, empregando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pela análise múltipla pareada, utilizando o método Student-Newman-Keuls ( $\alpha = 0.05$ ).

### 5.5 Avaliar o efeito da exposição ao LPS da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* no fenótipo mesenquimal indiferenciado das PDLMSCs.

A avaliação da reação de imunofluorescência para o marcador de superfície específico para células indiferenciadas, STRO-1, sugere que, não há mudança na positividade deste marcador após o cultivo das PDLMSCs na presença dos LPS de Pg e Ec, quando comparados ao grupo controle (Figuras 7A-7C).

Da mesma forma, a análise dos resultados do PCRq mostrou que, os níveis de RNAm do gene *OCT-4* não sofreu alteração após a exposição aos LPS bacterianos comparados ao grupo controle (Figura 7D).



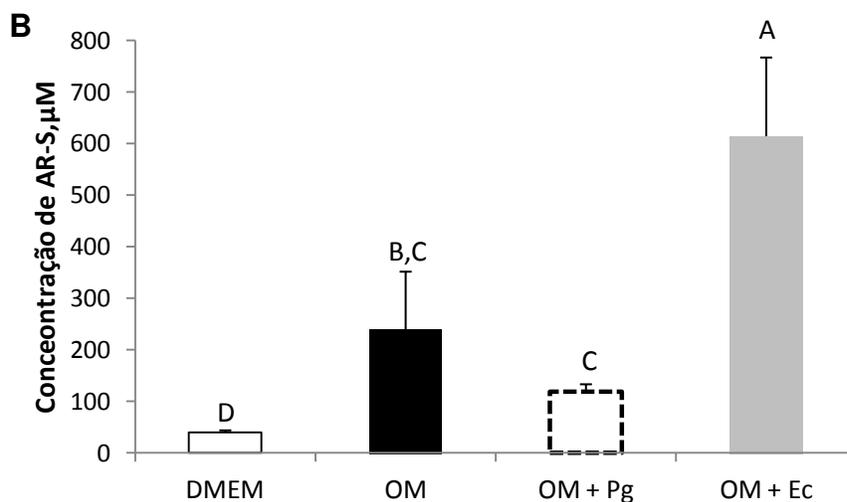
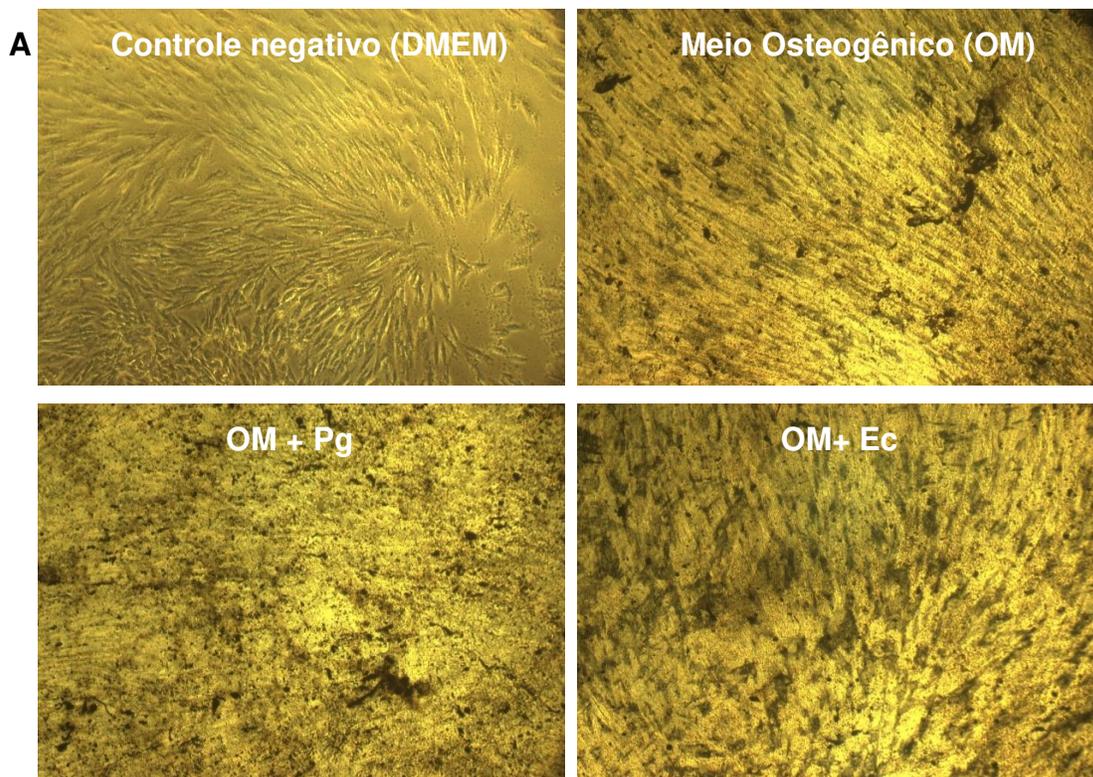
**Figura 7. Avaliação do efeito da exposição aos LPS bacterianos sobre o fenótipo mesenquimal das PDLSMCs.** Marcação positiva para STRO-1 nas células não expostas aos LPS (A), expostas a 1µg/ml de LPS da Ec (B) e Pg (C) após 24 horas. (D) Expressão gênica para *OCT-4* após exposição aos LPS bacterianos. Ausência de letras indica que não houve diferença estatística, empregando o teste ANOVA um critério ( $\alpha=0.05$ ).

5.6 Avaliar *in vitro* a capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblástica das PDLMSCs frente à presença dos LPS de da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*.

*5.6.1 Ensaio de mineralização*

Os resultados revelaram que, após 21 dias de cultivo em meio osteogênico contendo ou não os LPS bacterianos (1µg/ml), as PDLMSCs produziram depósitos mineralizados, visualizados pelo ensaio de von Kossa (Figura 8A). A análise microscópica do ensaio de von Kossa sugeriu uma maior produção de nódulos mineralizados pelas células cultivadas na presença do LPS da Ec. Essa observação foi confirmada pelos resultados do ensaio de vermelho de alizarina (AR-S), o qual revelou haver uma maior concentração de AR-S nas células cultivadas na presença do LPS de Ec comparado aos demais grupos (Figura 8B).

Por meio do ensaio de vermelho de alizarina foi possível observar também que, todos os grupos celulares cultivados em meio osteogênico contendo ou não os LPS bacterianos, produziram nódulos minerais, sendo as concentrações de AR-S estatisticamente significante comparadas ao grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ) (Figura 8B). Ao mesmo tempo, foi possível confirmar que, as células expostas ao LPS da Pg produziram uma quantidade de nódulos minerais similar ao grupo celular cultivado somente com meio osteogênico ( $p > 0,05$ ) (Figura 8B).



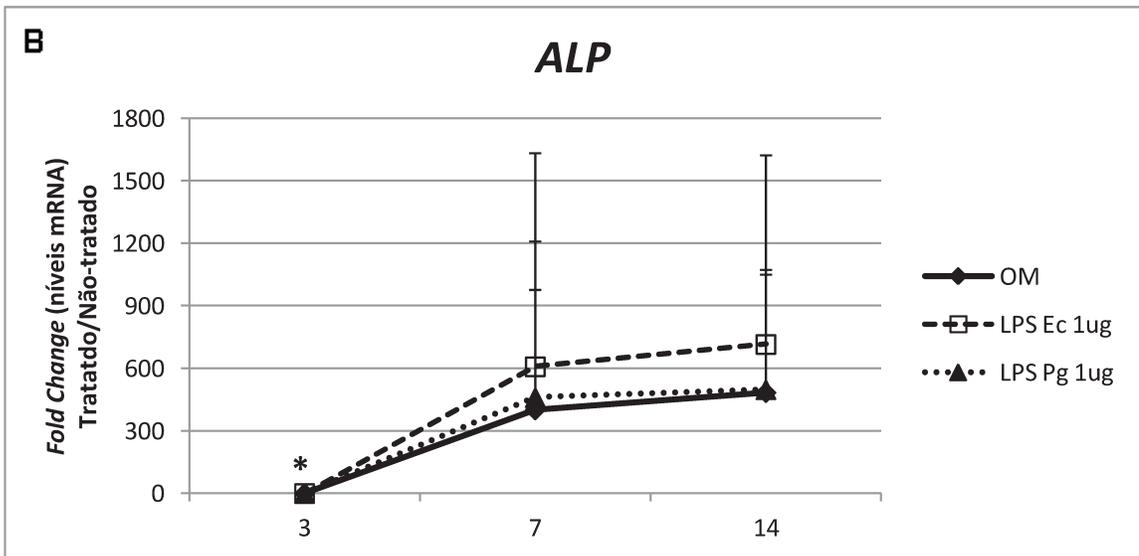
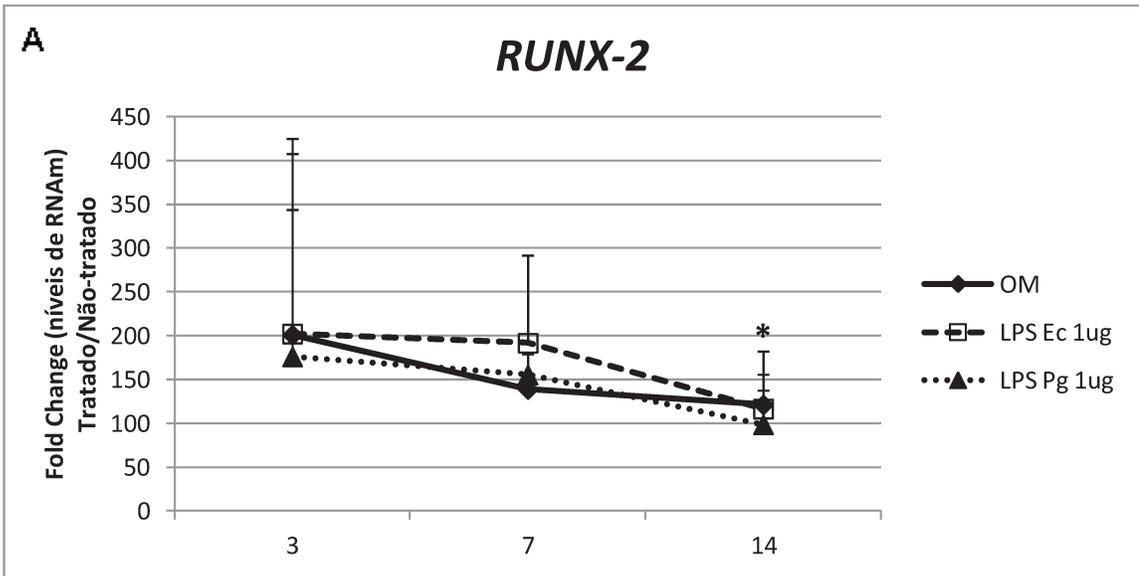
**Figura 8. Expressão dos nódulos minerais pelas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal.** (A) Análise microscópica dos depósitos minerais no grupo somente meio osteogênico (OM), com  $1\mu\text{g/ml}$  de LPS de Pg (OM+Pg) e Ec (OM+Ec) comparados ao grupo em meio de cultura padrão (DMEM). (B) Concentração de AR-S nas células cultivadas em DMEM, OM, OM+Pg e OM+Ec. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa, empregando o teste ANOVA um critério, seguido pelo teste Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

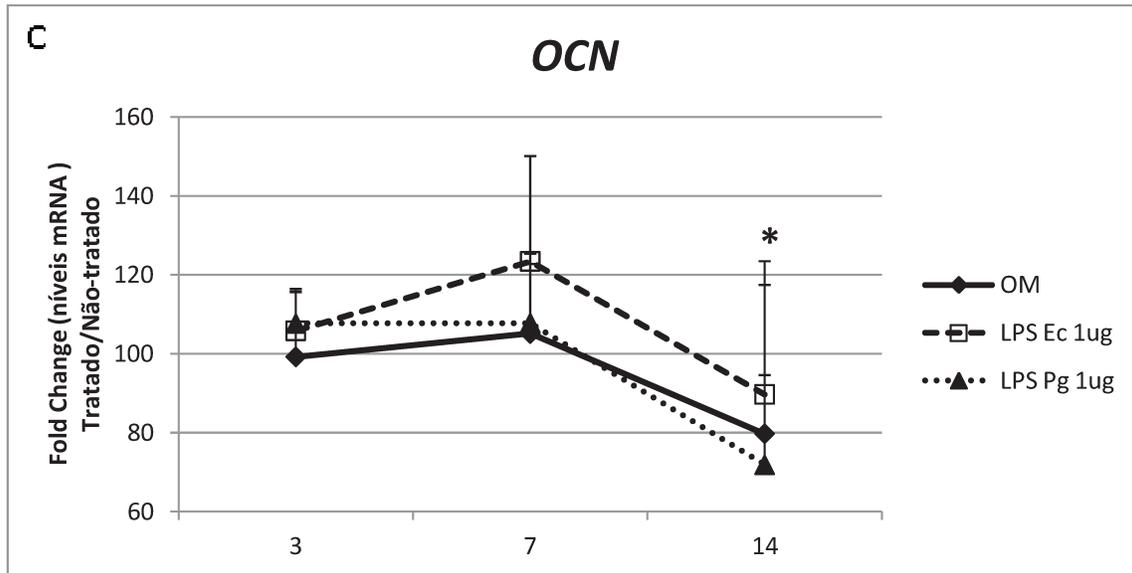
### 5.6.2 Expressão de genes marcadores de diferenciação osteoblástica/cementoblástica.

Os resultados do PCRq foram analisados como *fold-change*, ou seja, aumento na expressão dos genes apresentado pelo grupo de células tratadas com o meio de diferenciação em relação ao grupo controle para os 3 períodos de observação.

A análise intergrupo da expressão dos genes para *ALP*, *OCN* e *RUNX-2* demonstrou não haver diferença nos níveis de RNAm nas células tratadas com os LPS de Pg ou Ec em nenhum dos períodos estudados (Figuras 9A-9C). As mudanças observadas nos níveis de expressão dos genes relacionados à diferenciação osteoblástica/cementoblástica foram atribuídas ao efeito tempo-dependente, ou seja, o aumento ou redução na expressão destes genes variou ao longo do período de indução osteogênica, no qual as células foram mantidas.

Sendo o *RUNX-2* um fator de transcrição importante para a fase inicial da diferenciação osteoblástica/cementoblástica, foi possível observar que, já no terceiro dia em cultura, as PDLMSCs apresentaram níveis elevados desse gene, o qual sofreu uma redução significativa da sua expressão após os 14 dias de observação ( $p < 0,05$ ) (Figura 9A). Além disso, os resultados mostraram que houve um aumento na expressão do gene da *ALP* após 7 dias em cultura em cultura ( $p < 0,05$ ), sendo que os níveis de RNAm mantiveram-se estáveis até o dia 14 ( $p > 0,05$ ). Em relação ao gene para *OCN*, foi possível observar uma expressão aumentada já no terceiro dia de cultura, o qual foi mantido até o dia 7, ocorrendo então, uma redução significativa a partir do dia 14 em cultura ( $p < 0,05$ ) (Figura 9C).





**Figura 9. Expressão do fenótipo osteoblástico/cementoblástico pelas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal.** (A, B e C) Média e desvios-padrão para a expressão dos genes para *RUNX-2*, *ALP* e *OCN* após 3, 7 e 14 dias de indução osteogênica. A presença do símbolo (\*) indica diferença estatisticamente significativa determinada pela análise intragrupo, empregando o teste *Two-way Analysis of Variance* (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey quando diferenças entre os grupos foram detectadas.

## 6. DISCUSSÃO

Sendo a periodontite uma doença inflamatória crônica e a cavidade oral um ambiente microbiano complexo, uma melhor compreensão do comportamento das células mesenquimais indiferenciadas (MSCs) no microambiente periodontal durante o processo imune-inflamatório e, durante a cicatrização da ferida periodontal, torna-se essencial (Zhao *et al.*, 2008), uma vez que alguns estudos sugerem que as células do ligamento periodontal podem alterar seu fenótipo em resposta à inflamação promovida por lipopolissacarídeos bacterianos (Somerman *et al.*, 1990; Takashiba *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2006). Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a exposição das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal aos lipopolissacarídeos da *Porphyromonas gingivalis* e da *Escherichia coli* levariam a alterações do fenótipo mesenquimal indiferenciado, comprometendo a sua capacidade proliferativa e de diferenciação osteoblástica/cementoblástica.

Na primeira fase do estudo, células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foram isoladas e caracterizadas como sendo células CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>. Em concordância com estudos prévios (Nagatomo *et al.*, 2006; Silvério *et al.*, 2010), cerca de 30% das células do ligamento periodontal mantidas em cultura apresentaram-se positivas para o antígeno de superfície CD105. Essas células CD105<sup>+</sup> também expressaram a proteína STRO-1, conforme observado em outros trabalhos, os quais utilizaram tal como o presente estudo, a imunofluorescência/citoquímica (Seo *et al.*, 2004; Nagatomo *et al.*, 2006; Silvério *et al.*, 2010) ou a citometria de fluxo (Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010)) para identificar esse marcador de superfície.

Como parte da caracterização celular, foi verificada a expressão dos receptores do tipo *Toll-like* 2 e 4 pelas populações de PDLMSCs. Estudos tem mostrado que a família dos receptores *Toll-like* encontra-se envolvida no reconhecimento dos componentes da parede celular bacteriana (Medzhitov *et al.*, 1997), além de serem descritos atualmente, como os principais receptores para os

LPS bacterianos em diferentes tipos celulares (Matera *et al.*, 2009; Mahanonda *et al.*, 2007; Gaddis *et al.*, 2009). No presente estudo, os lipopolissacarídeos utilizados foram adquiridos comercialmente e segundo os fabricantes, o LPS da Pg atua principalmente via TLR2 ao passo que, o principal receptor para o reconhecimento do LPS da Ec era o TLR4. Os resultados da imunofluorescência sugerem uma expressão mais evidente do TLR4 pelas PDLMSCs, embora tenha sido possível realizar a imunolocalização do TLR2. Na literatura, ainda não existem estudos que tenham identificado a expressão destes receptores pelas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal. Contudo, trabalhos prévios relataram a expressão do TLR4 em cementoblastos (Nociti *et al.*, 2004) e do TLR2 e 4 na população heterogênea de células do ligamento periodontal (Hatakeyama *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2010).

Para avaliar se os LPS exerciam algum efeito citotóxico, as PDLMSCs foram inicialmente cultivadas na presença de diferentes concentrações de Pg e Ec. Após 10 dias em cultura, os resultados mostraram que as células mantiveram-se viáveis e proliferativas independente da concentração e do tipo de LPS utilizado. Estes dados corroboram com os achados de outros estudos, os quais avaliaram o efeito do LPS de Pg ou de Ec em células pré-osteoblásticas (Kadono *et al.*, 1999), células mesenquimais de medula-óssea (Mo *et al.*, 2008), células mesenquimais do tecido adiposo (Hwa *et al.*, 2006) e principalmente, nas células do ligamento periodontal que foram cultivadas com LPS de Ec nas mesmas concentrações do presente estudo (Jönsson *et al.*, 2008), ou na presença da *Porphyromonas gingivalis* viável (Yamamoto *et al.*, 2006).

Uma vez que não houve alteração na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, na sequência, determinamos se os LPS teriam algum efeito sobre a resposta inflamatória celular. Os resultados obtidos mostraram que o LPS da *P. gingivalis* não foi capaz de induzir o aumento na expressão das citocinas estudadas em nenhuma das concentrações testadas, enquanto que o LPS da *E. coli* nas concentrações de 100ng/ml e 1µg/ml foram capazes de induzir um aumento na expressão dos genes para *IL-6* e *IL-8*, não alterando, porém, a

expressão de *IL-1 $\beta$*  e *TNF- $\alpha$* . Utilizando fibroblastos do ligamento periodontal de humanos, Yamaji *et al.* (1995) observaram que o LPS de Pg em uma concentração muito superior (1mg/ml) às testadas no presente estudo promoveu um aumento na expressão da *IL-6*. Da mesma forma, os autores também encontram um aumento nos níveis de RNAm para *IL-6* e *IL-8*, quando as células foram expostas a 100 mg/ml de LPS de Ec. Contudo, vale ressaltar as diferenças entre os tipos celulares empregados nos dois estudos e a concentração dos LPS as quais essas células foram expostas.

Ao avaliar o efeito da exposição das células do folículo dental aos mesmos LPS da Pg e da Ec utilizados no presente estudo, Morsczeck *et al.* (2012) observaram que a concentração de 1mg/ml de Ec promovia um aumento na expressão dos genes para as citocinas inflamatórias *IL-1 $\beta$* , *IL6*, e *IL8*. Por outro lado, após a exposição à mesma concentração de LPS da Pg, os níveis de RNAm destas citocinas mantiveram-se próximos da expressão constitutiva apresentada pelas células do folículo dental não expostas ao “desafio microbiano”. Tal como o presente estudo, os resultados do trabalho de Morsczeck *et al.* (2012) sugerem que as células do ambiente periodontal são capazes de expressar as citocinas pró-inflamatórias independente do estímulo bacteriano, e que o LPS da Pg comercialmente disponível não induz a uma resposta inflamatória compatível à observada frente à exposição à bactéria viável (Scheres *et al.*, 2010).

A variação das respostas celulares após a exposição ao LPS da Pg e da Ec pode estar relacionada, também, a diferenças na estrutura química entre esses lipopolissacarídeos especialmente no lipídeo A, resultante de mudanças na quantidade e tipos de ácidos graxos, fosfatos e outras modificações (Chen *et al.*, 2007), o qual atua como um potente ativador das atividades imuno inflamatórias do hospedeiro. Em relação à *Porphyromonas gingivalis*, estudos que avaliaram *in vitro* as respostas inflamatórias mediadas pelo LPS isolado em laboratório, puderam observar um potencial inflamatório excepcionalmente baixo destes LPS (Darveau *et al.*, 1995). É possível sugerir, que embora a *Porphyromonas gingivalis* seja caracterizada como uma bactéria do complexo vermelho

(Socransky *et al.*, 1998), a qual está fortemente associada com início e progressão da doença periodontal inflamatória, a exposição ao seu LPS isoladamente, pode não ser o suficiente para induzir uma resposta inflamatória nos diferentes tipos celulares previamente descritos, havendo possivelmente, a necessidade da exposição a todo o complexo de endotoxinas presentes na parede bacteriana. Ainda, em relação aos dados do presente estudo, é possível sugerir que o LPS da Pg não tenha induzido respostas significativas devido ao fato desta endotoxina atuar especificamente via TLR2, o qual teve uma expressão limitada pelas PDLMSCs. Entretanto, as vias de reconhecimento e atuação dos LPS bacterianos precisam ser mais bem compreendidas. Ainda é controverso na literatura se o TLR2 e TLR4 reconhecem diferentes componentes da parede celular bacteriana, se TLR4 seria o receptor dominante para pelo menos alguns tipos de LPS, enquanto que TLR2 não seria necessário para o reconhecimento desta endotoxina bacteriana (Brightbill *et al.*, 1999; Hirschfeld *et al.*, 1999, 2001; Schwandner *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 1999).

Como os resultados observados não mostraram um efeito significativo dos LPS bacterianos sobre os parâmetros viabilidade celular e resposta inflamatória, uma concentração intermediária (1µg/ml) (Loomer *et al.*, 1995) foi utilizada para avaliar o efeito destas endotoxinas sobre as propriedades celulares relacionadas ao fenótipo mesenquimal indiferenciado.

Dentre os marcadores de células mesenquimais indiferenciadas, STRO-1 é o mais conhecido, estando relacionado com a diferenciação osteogênica e adipogênica (Simmons & Torok-Storb, 1991; Dennis *et al.*, 2002). O Oct-4 é também é um marcador de células-tronco, conhecido como um fator crítico transcricional para manter pluripotencialidade e o estado indiferenciado destas células (Kawanabe *et al.*, 2006; Silvério *et al.*, 2010; Kelliner & Kikyo, 2010). No presente estudo, foi avaliado se a exposição aos LPS bacterianos alteraria a expressão destes marcadores, sugerindo que as células poderiam sofrer alteração no seu fenótipo mesenquimal indiferenciado na presença das toxinas bacterianas.

Pela análise da imunofluorescência, é possível sugerir que, a positividade para STRO-1 não sofreu alteração, após exposição celular aos LPS. Contudo, deve-se considerar que este tipo de análise é somente qualitativa, não sendo possível detectar se houve alteração no número de células positivas para esse marcador de superfície. Em relação à expressão do gene para *OCT-4*, as células mostraram um padrão semelhante ao grupo controle, sugerindo que não houve alteração na expressão deste gene quando estas células foram desafiadas com as toxinas bacterianas. Contudo, esses resultados devem ser interpretados com certa cautela já que, esses dois indicativos, expressão de STRO-1 e de OCT-4, foram avaliados após um período curto (24 horas) de exposição aos LPS bacterianos, não caracterizando uma condição clínica, na qual as PDLMSCs são expostas a um desafio microbiano crônico. Além disso, até o momento, não existe na literatura estudos que tenham realizado análises semelhantes, não sendo possível comparar e discutir os resultados encontrados no presente trabalho.

Considerando ainda, as propriedades relacionadas ao fenótipo mesenquimal indiferenciado, o presente estudo avaliou o efeito dos LPS bacterianos sobre a capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblástica pelas PDLMSCs. Os resultados mostraram que, as PDLMSCs cultivadas sob indução osteogênica foram capazes de depositar uma matriz mineralizada, característica compatível com a diferenciação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico, e que essa propriedade celular não foi comprometida pela exposição aos LPS da Pg e da Ec. Em concordância com estudo prévio realizado com células mesenquimais da medula óssea (Mo *et al.*, 2008), a Ec promoveu um aumento significativo na formação de nódulos minerais pelas células mesenquimais do ligamento periodontal.

Por outro lado, a exposição ao LPS da Pg manteve a formação de nódulos mineralizados em níveis similares ao grupo controle positivo (células cultivadas somente em meio osteogênico). Em geral, os estudos *in vitro* relatam um efeito negativo do LPS da Pg sobre a osteogênese, caracterizado pela inibição da diferenciação dos pré-osteoblastos e da formação óssea (Kadono *et al.*, 1999;

Loomer *et al.*, 1994; Loomer *et al.*, 1995). Em células do folículo dental, o processo de maturação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico também foi comprometido pela exposição ao LPS da Pg, tendo como consequência, menor formação de matriz mineralizada (Morsczeck *et al.* 2012). No entanto, ainda não está bem definido como o LPS da Pg realmente atua sobre o processo de osteogênese. No estudo realizado por Abe *et al.* (2010), em células da polpa humana, baixas concentrações de extratos de *P. gingivalis* aumentaram a deposição de matriz mineralizada enquanto que, altas concentrações inibiram este processo. Por sua vez, Mo *et al.* (2008) observaram que as células mesenquimais da medula óssea podem adaptar-se ao estímulo com LPS contínuo através da redução da expressão de TLR4 e TLR2, assim, estas células seriam poupadas do efeito tóxico do LPS, conduzindo-as a um paradoxal aumento nas atividades osteogênicas (Mo *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que as toxinas bacterianas podem influenciar o processo de diferenciação osteogênica em ambas as direções e que, os resultados observados estão diretamente relacionados à origem e ao grau de diferenciação celular.

Para confirmar a maturação do fenótipo osteoblástico/cementoblástico, a expressão de três genes alvo, *RUNX-2*, *ALP* e *OCN*, foi verificada ao longo do processo de indução osteogênica. O *RUNX-2* tem sido considerado como um gene regulador mestre, responsável pela diferenciação osteoblástica/cementoblástica precoce (Komori, 2002). No presente estudo foi possível observar que todos os grupos celulares, ou seja, PDLMSCs expostas ou não LPS bacterianos sofreram maturação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico, caracterizado pela elevada expressão precoce do *RUNX-2* (terceiro dia de indução osteogênica), acompanhada pela expressão dos genes *ALP* e *OCN*, relacionados à mineralização da matriz extracelular (Lian *et al.*, 1985).

Embora a exposição ao LPS da Ec tenha induzido a uma maior quantificação de AR-S, sugerindo uma maior deposição de nódulos mineralizados, não foram observadas diferenças significativas quanto à expressão dos genes da

via osteoblástica/cementoblástica comparado aos demais grupos, apesar de numericamente, o nível de RNAm dos três genes avaliados sempre se mantiveram acima no grupo Ec. De fato, o estímulo com o LPS da Ec parece aumentar a expressão de *RUNX-2* e a atividade da fosfatase alcalina, como observado por em alguns estudos realizados com células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea (Mo *et al.* 2008) e células do folículo dental (Morsczeck *et al.*, 2012).

Como discutido anteriormente, a *Porphyromonas gingivalis* tem se mostrado capaz de inibir a osteoindução (Loomer *et al.*, 1994), a qual está associada a uma redução da atividade de ALP e expressão de *OCN* e *OPN* (Kadono *et al.*, 1999) em células pré-osteoblásticas da calvária de rato, e uma redução tempo-dependente da *OCN* em cementoblastos (Nociti *et al.*, 2004). A redução da expressão de *OCN* pode significar um atraso na maturação celular, já que, essa proteína é expressa somente por osteoblastos e cementoblastos maduros (Lian *et al.*, 1985; Nociti *et al.*, 2004). No presente estudo, as PDLMSCs estimuladas com o LPS da Pg não sofreram alteração no padrão de expressão dos genes osteoblásticos/cementoblásticos, os quais se mantiveram em níveis similares ao do grupo sob indução osteogênica e sem LPS. Esse dado confirma mais uma vez que, a exposição à endotoxina desse periodontopatógeno não compromete o potencial de diferenciação e maturação das PDLMSCs em fenótipo osteoblástico/cementoblástico. Essa diferença do comportamento celular frente ao estímulo com LPS da Pg pode ser relacionada aos métodos distintos utilizados para purificar os produtos bacterianos e também, às origens celulares que podem exercer uma influência direta no padrão de formação de nódulos minerais e expressão gênica. Desta maneira, torna-se difícil a comparação dos resultados do presente estudo com os dados disponíveis na literatura.

Estes resultados indicam a conservação do fenótipo mesenquimal indiferenciado pelas PDLMSCs, sugerindo não haver perda do estado indiferenciado e de pluripotencialidade quando estas foram estimuladas com os LPS bacteriano. Extrapolando esses resultados para a condição clínica, seria possível sugerir que as células mesenquimais indiferenciadas que residem no

ligamento periodontal são resistentes ao desafio microbiano que ocorre durante a instalação e progressão da doença periodontal inflamatória, o que seria de fundamental importância para a regeneração periodontal. Entretanto, devem-se considerar as limitações do presente estudo tais como, utilização de endotoxinas isoladas e não do complexo bacteriano como um todo, bem como as diferenças entre um ambiente *in vitro* controlado e o ambiente da doença periodontal, na qual as PDLMSCs recebem um estímulo crônico e polimicrobiano.

Desta maneira, estudos adicionais em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, que simulem melhor as condições clínicas como, por exemplo, a exposição a diferentes toxinas bacterianas, ou o uso de periodontopatógenos viáveis, são necessários para a compreensão do comportamento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal durante a progressão e pós-tratamento da doença periodontal inflamatória.

## 7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que a exposição das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos aos lipopolissacarídeos da *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* não alterou as propriedades relacionadas à condição de mesenquimal indiferenciada destas células.

## REFERÊNCIAS

- Abe S, Imaizumi M, Mikami Y, Wada Y, Tsuchiya S, Irie S, et al. Oral bacterial extracts facilitate early osteogenic/dentinogenic differentiation in human dental pulp-derived cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2010; 109(1):149–54.
- Agarwal S, Chandra CS, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Baran C. Regulation of Periodontal Ligament Cell Functions by Interleukin-1b. *Infect Immun.* 1998; 66(3):932-7.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124: 783–801.
- Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA. *In vitro* attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J Periodontol* 1975; 46:639-45.
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(3):301-16.
- Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal regeneration. *Biology of the Periodontal Connective Tissues, Vol., Chapter 11.* Chicago: Quintessence Publishing; 1998.
- 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; 24:253-69.
- Bartold PM & Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000.* 2006; 40, 29–49.
- Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* 2006; 40, 164–72.
- Batouli S, Miura, M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, *et al.* Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003; 82,976–81.

---

\*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* – grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, *et al.* Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*. 2007; 75:279-91.
- Becker W & Becker BE. Periodontal regeneration: a contemporary re-evaluation. *Periodontology* 2000.1999; 19: 104–14.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001; 105(7):829-41.
- Bobis S, Jarochoa D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44(4):215-30.
- Bowers GG, Schallhorn RG, & Melloning JT. Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *J Periodontol*. 1982;53:509–14.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science*. 1999; 285:732-36.
- Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol*.1990; 61(9):597-601.
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009; 31(Supl.1):25-35.
- Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang C-Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dental Res*. 2005; 84 (11): 994–8.
- Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Fang C, Wu Z-F. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*. 2010; 31: 7892-7927.
- Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res*. 2006b; 41:547-53.

- Chen C, Coats SR, Bumgarner RE, Darveau RP. Hierarchical gene expression profiles of HUVEC stimulated by different lipid A structures obtained from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2007;9(4):1028-38.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized micro niche. *J Bacteriol* 1994; 176:2137-42.
- Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res.* 2008; 43: 531–36.
- Darveau RP, Cunningham MD, Bailey T, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, et al. Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. *Infect Immun.* 1995; 63:1311-17.
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K *et al.* *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004; 72:5041–51.
- Darveau RP. The oral microbial consortiums interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol* 2009; 28:389–95.
- Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charboard P. The STRO1+ marrow cell population is multipotent. *Cells Tissues Organs.* 2002; 170:73-82.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Papapanou PN, Sacco RL. Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke* 2003; 34:2120-25.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8:315-17.

- Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. J Periodontal Res. 1987; 22(3):233-42.
- Elangovan S, Srinivasan S, Ayilavarapu S. Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. Expert Opin Biol Ther. 2009; 9 (4): 399-410.
- Elter JR, Offenbacher S, Toole JF, Beck JD. Relationship of periodontal disease and edentulism to stroke/TIA. J Dent Res 2003; 82:998-1001.
- Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, *et al.* Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: a report of 3 cases. Oral Dis. 2010; 16: 20–28.
- Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1:102.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968; 6:230–47.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet. 1987; 20:263–72.
- Gaddis DE, Michalek SM, Katz J. Requirement of TLR4 and CD14 in dendritic cell activation by Hemagglutinin B from Porphyromonas gingivalis. Mol Immunol. 2009; 46:2493-2504.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res. 2007; 10:149-60.
- Gilbert P, Evans DJ, Brown MR. Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*. J Appl Bacteriol 1993; 74: 67S-78S.
- Goldschmidt-Clermont P J & Peterson ED. On the Memory of a Chronic Illness. Sci Aging Knowledge Environ. 2003; 45:re8.

- Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by Oct4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25:3143-54.
- 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; 329:77–84.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 13625-30.
- Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al*. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*. 2002; 81, 531–35.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, *et al*. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003; 116: 1827-35.
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Linde J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1984; 11:494–503.
- Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT *et al*. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002a; 9:403–11.
- Hajishengallis G, Sharma A, Russell MW, Genco RJ. Interactions of oral pathogens with toll-like receptors: possible role in atherosclerosis. *Ann Periodontol*. 2002b; 7: 72–78.
- Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E *et al*. Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition Fibroblasts in interaction with *P. gingivalis* apparatus. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 1557–70.

- Hajishengallis G, Wang M, Bagby GJ, Nelson S. Importance of TLR2 in early innate immune response to acute pulmonary infection with *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Immunol.* 2008; 181:4141– 49.
- Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 2011; 10(5): 497-506.
- Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 14–23.
- Hausmann E, Weinfeld N, Miller WA. Effects of lipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. *Calcif. Tissue Res.* 1972; 9: 272–82.
- Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, et al. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 1999; 163: 2382-86.
- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, et al. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* 2001; 69:1477-82.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 7(5): 393-5.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* 1999; 20: 168-238.
- Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infect Immun.* 2000; 68: 4681-87.

- Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9): 792-806.
- Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS: Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2006; 24(12): 2744-52.
- Iino Y & Hopps RM. The bone resorbing activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* isolated from human mouths. *Arch. Oral Biol*. 1984; 19: 59–63.
- Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, *et al*. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol*. 2001; 72: 314-23.
- Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K *et al*. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*. 2009; 30: 2716–23.
- Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *J Clin Periodontol*. 2002; 29 Suppl 3: 103-16.
- Jones KJ, Ekhlassi S, Montufar-Solis D, Klein JR, Schaefer JS. Differential cytokine patterns in mouse macrophages and gingival fibroblast following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* or *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontol*. 2010; 81: 1850-57.
- Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson B. LPS-induced MCP-1 and IL-6 production is not reversed by oestrogen in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(9): 896-902.
- Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1999; 67: 2841–6.

- Kaldahl WB, Kalkwarf KL & Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. J Periodontol. 1993; 64: 243–53.
- Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. J Clin Periodontol. 1980; 7(2): 96-105.
- Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. J Clin Periodontol. 1985; 12: 51–60.
- Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies. Periodontol 2000. 1993; 1(1): 26–35.
- Kawanabe N, Murakami K, Yamamoto-Takano T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. BBRC. 2006; 344: 1278-83.
- Kellner S, Kikyo N. Transcriptional regulation of Oct4 gene, a master gene for pluripotency. Histol Histopathol 2010; 25:405-12.
- Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative peri-odontal bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 145–51.
- Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki-Kawashita Y, Nakashima T, *et al.* Force-induced osteoclast apoptosis *in vivo* is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. J Bone Miner Res. 2000; 15(10): 1924-34
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther. 2007; 9:204.
- Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. J Cell Biochem. 2002; 87:1e8.
- Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr Opin Immunol. 1999; 11:13-18.

- Krajewski AC, Biessei J, Kunze M, Maersch S, Perabo L, Noack MJ. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS*. 2009; 117(10): 746-54.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62: 1244-63.
- Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1044: 132-8.
- Lian JB, Coutts M, and Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 8706–10.
- Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res*. 1988; 67: 1131–35.
- Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterization of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 329-35.
- Loomer PM, Sigusch B, Sukhu B, Ellen RP, Tenenbaum HC. Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* 2561 on osteogenesis *in vitro*. *Infect Immun* 1994; 62: 1289–97.
- Loomer PM, Ellen PR, Tenenbaum HC. Characterization of Inhibitory Effects of Suspected Periodontopathogens on Osteogenesis *In vitro*. *Infect immun*. 1995; 63(9): 3287–96.
- Liu WH, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1691–99.
- Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM *et al*. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 2008; 26: 1065–73.

- Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 41–55.
- Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, *et al.* IL-8 andIDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol*. 2007; 178: 1151-57.
- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001; 86: 1099-1100.
- Matera G, Muto V, Vinci M, *et al.* Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 1804-09.
- Mayrand D & Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.*1988; 52: 134–37.
- McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B & Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Ana Rec*. 1987; 219: 233–42.
- McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res* 1991; 26: 144–54.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-97.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976; 47(5): 256-60.
- Melcher AH. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl*. 1985; 67: 130–31.
- Millar SJ, Goldstein EG, Levine MJ, Hausmann E. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun*. 1986; 57: 302–06.

- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 5807-12.
- Miura Y, Miura M, Gronthos S, Allen MR, Cao C, Uveges TE, *et al.* Defective osteogenesis of the stromal stem cells predisposes CD18-null mice to osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 14022-27.
- Miyauchi M, Sato S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, Zhao M, Takata T. Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol.* 2001; 116:57–62.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109: 199-209.
- Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biology.* 2008,9: 52.
- Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active disease destructive progression. *J. Clin. Periodontol.* 1991; 18: 729–39.
- Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med.* 1987; 38: 417–32.
- Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24: 155-65.
- Morsczeck CO, Dress J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induces pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(12): 1595-601.

- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2006; 41: 303-10.
- Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremo-to K, Matsuno T, Tabata Y *et al.* In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng.* 2004; 10: 537–44.
- Nishimine D, O’Leary TJ. Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surface. *J Periodontol* 1979; 50: 345-49.
- Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. *J Dent Res.* 2004; 83(8): 602–07.
- Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, *et al.* Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod.* 2007; 33(10): 1187–91.
- Nonnenmacher C, Dalpke A, Zimmermann S, Flores-De-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. DNA from periodontopathogenic bacteria is immunostimulatory for mouse and human immune cells. *Infect Immun.* 2003; 71: 850–56.
- Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 394–401.
- Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 821-78.
- Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15: 59–65.
- Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origin and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res.* 1994; 19: 81–94.
- Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000.* 2006; 41: 30-47.

- Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic *in vitro*, intracardiac injection elicits an immune response *in vivo*. *Transplantation*. 2007; 83: 783-90.
- Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006; 1: 365-69.
- Pluchino S, *et al*. Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain* 2008; 131: 2564-78.
- Puchtler HMS. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry*. 1978; 56:177–185.
- Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *Calcif Tissue Int*. 1995; 57: 52–9.
- Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am*. 2010;54:55-71.
- Rietschel E, Kirikae T, Schade F, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, *et al*. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8: 217-25.
- Sahingur SE, Xia XJ, Alamgir S, Honma K, Sharma A, Schenkein HA. DNA from *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induce cytokine production in human monocytic cell lines. *Mol Oral Microbiol*. 2010; 25: 123–35.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 8116–20.
- Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2010; 45: 262–70.
- Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients

are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*. 2011; 46: 407–16.

- Schifferle RE, Wilson ME, Levine MJ, Genco RJ. Activation of serum complement by polysaccharide-containing antigens of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 1993; 28: 248-54.
- Schöler HR, Ciesiolka T, Gruss P. A nexus between Oct-4 and E1A: Implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell*. 1991; 66: 291-304.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999; 274: 17406-409.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, *et al*. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-55.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001; 29: 532–39.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 696-704.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofacial Res*. 2005; 8: 191–99.
- Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol*. 2010; 81: 1207-15.
- Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991; 78: 55-62.
- Slots J & Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal

disease: virulence factors in periodontal colonization, survival and tissue destruction. J Dent Res. 1984; 63: 412–21.

- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. 1992; 63: 322-31.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25: 134–144.
- Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005; 38: 135-87.
- 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: 241–7.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS ONE. 2006; 1(e79): 1–8.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod. 2008; 34: 166-71.
- Suaid FF, Ribeiro FV, Gomes TR, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH Jr *et al.* Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: a study in dogs. J Clin Periodontol. 2012; 39(4): 377-84.
- Sun Y, Shu R, Zhang MZ, Wu AP. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52:362-69.
- Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. J Periodontol. 2010; 81(10): 1488-96.
- Tabeta K, Yamazaki S, Akashi K, Miyake K, Kumada H, Umemoto T. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. Infect Immun. 2000; 68: 3731-35.
- Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. J Periodontol. 2003; 74: 103–10.

- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11: 443–51.
- Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.* 1992; 60: 4932–37.
- Thesleff I & Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone.* 1999; 25: 123–5.
- Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 Suppl 3: 117-35.
- Trombelli L. Which reconstructive procedures are effective for treating the periodontal intraosseous defect? *Periodontol* 2000. 2005; 37: 88-105.
- van Winkelhoff AJ, van Appelmek BJ, Kippuw N, de Graaff J. K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 8: 259-265.
- van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 1023–28.
- Villar CC & Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am* 2010; 54: 73-92.
- Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009; 18: 487-96.
- Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in

periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*. 2004; 35(3): 629–35.

- Wang PL & Ohura K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts – CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(2): 132-42.
- Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontal pathogenic bacteria. *J Periodontal Res*. 1996; 31: 393–407.
- Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006b; 26: 363-69.
- Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, *et al*. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 1995; 63(9): 3576– 81.
- Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with Porphyromonas gingivalis. *J Periodont Res*. 2006; 41: 554–9.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *Immun*. 1999; 163: 1-5.
- Zannettino ACW, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, *et al*. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Physiol*. 2008; 214: 413-21.
- Zhao Q, Gong P, Tan Z, Yang X. Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs). *Medical Hypotheses* 2008; 70: 944–47.
- Zhou Q & Amar S. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to Porphyromonas gingivalis or to its purified cell wall components. *J Immunol*. 2007; 179: 7777–90.

- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7: 211-28.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Efeito do LPS da Porphyromonas gingivalis nas propriedades biológicas das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos"**, protocolo nº 022/2011, dos pesquisadores Karina Gonzales Silverio Ruiz e Mayra Laino Albiero, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 21/05/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Effect of LPS from Porphyromonas gingivalis on the biological properties of mesenchymal stem cells of human periodontal ligament"**, register number 022/2011, of Karina Gonzales Silverio Ruiz and Mayra Laino Albiero, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 05/21/2011.

**Prof. Dra. Lívia Maria Andalo Tenuta**  
 Secretária  
 CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
 Coordenador  
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.