



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FERNANDA FLORIAN

Avaliação do efeito da lectina Artin M na expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias relacionadas ao processo de reparação tecidual. Estudo *in vitro* em macrófagos e fibroblastos gengivais de ratos.

ARARAQUARA

2014



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FERNANDA FLORIAN

Avaliação do efeito da lectina Artin M na expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias relacionadas ao processo de reparação tecidual. Estudo *in vitro* em macrófagos e fibroblastos gengivais de ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*

ARARAQUARA

2014

Florian, Fernanda

Avaliação do efeito da lectina Artin M na expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias relacionadas ao processo de reparação tecidual: estudo in vitro em macrófagos e fibroblastos gengivais de ratos / Fernanda Florian - Araraquara: [s.n.], 2014.

55 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1.Periodontia 2. Cicatrização 3. Lectinas de ligação a manose

I.Título

FERNANDA FLORIAN

“Avaliação do efeito da lectina Artin M na expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias relacionadas ao processo de reparação tecidual. Estudo *in vitro* em macrófagos e fibroblastos gengivais de ratos.”

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º examinador: Prof^ª. Dr^ª. Silvana Regina Perez Orrico

3º examinador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Faloni

Araraquara, 20 de Março de 2014.

DADOS CURRICULARES

FERNANDA FLORIAN

NASCIMENTO	18 de Agosto de 1983 - São Paulo / SP.
FILIAÇÃO	Carlos Antônio Florian Neiva de Camargo Florian
2005 – 2008	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2009 – 2011	Curso de Aprimoramento em Cirurgia e Traumatologia Bucó-maxilo-facial pela Fundação do Desenvolvimento Administrativo – FUNDAP.
2012 – 2014	Curso de Especialização em Implantodontia pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD.
2012 – 2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

À **Deus**, criador do Universo que nos concede a cada dia uma nova oportunidade, iluminando os pensamentos e guiando meus passos. Agradeço por todas as pessoas envolvidas em minha vida que tornaram possível a conquista de novos objetivos, nos dão fé e esperança com suas palavras e sorrisos.

Aos meus pais **Carlos** e **Neiva** que com muito amor, dedicação e humildade foram os responsáveis diretos por minha educação e valores. Por todo apoio em minhas escolhas e, com amor e confiança, por estarem presentes ao meu lado durante toda vida.

À minha irmã **Fabiana**, pelo estímulo e participação na minha carreira acadêmica. Pelo exemplo de profissional dedicada que procuro seguir, pelo carinho, incentivo e eterna amizade.

Ao meu marido **André**, quem eu amo, agradeço pelo companheirismo e compreensão nas horas dedicadas a elaboração da dissertação. Pela confiança em meu trabalho e exemplo de profissional na qual procuro seguir os passos, ao seu lado.

Minha eterna gratidão por todos vocês fazerem parte da minha vida.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, pela orientação na elaboração dessa dissertação, pela confiança e respeito. Por acreditar em meu potencial profissional e participar dessa etapa da minha carreira acadêmica. Pelo exemplo de pessoa e profissional.

Às amigas **Luana Carla Pires** e **Andressa Vilas Boas Nogueira** por todo apoio, dedicação e orientações para o desenvolvimento desse trabalho. São exemplos de profissionais que com toda paciência e compreensão me ajudaram nos primeiros passos da carreira acadêmica. Meus sinceros agradecimentos pela convivência e votos de sucesso.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, Prof^ª. Dr^ª. **Andreia Affonso Barretto Montandon** e da Vice-Diretora Prof^ª. Dr^ª. **Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior** e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelência no ensino e pesquisa, dedicação e apoio aos alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, que colaborou financeiramente no início da pesquisa.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof.Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof^ª. Dr^ª. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, Prof^ª. Dr^ª. **Silvana Regina Perez Orrico**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli** e Prof^ª. Dr^ª. **Daniela Leal Zandim-Barcelos** que colaboraram com minha formação com competência em suas atividades.

Aos amigos de turma do Mestrado (2012-2014): **Jaqueline, Fabiana, Lígia, Sâmara, Rafael, Paula, Cássio, Lélis, Haline, Adriana, Vinícius M., Suzane, Elton, Vinícius I. e Patrícia**, pelo companheirismo e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, novas amigas que com certeza se preservarão por muito tempo.

Também aos colegas das turmas de Doutorado em Periodontia e Implantodontia: **Rafael M., Luana, Mário, Andressa, Luiz Guilherme, Fausto, Sabrina F., Marcell, Giovanna, Livia Finotti, Guilherme Oliveira, Chaine, Felipe, Fernanda Rocha, Leila, Livia Valverde, Michele, Samia, Telma, Túlio, Livia Moretti e Jônatas** que

tornaram a convivência mais agradável com a amizade e o apoio oferecido entre os colegas.

. Às colegas Pós-Doutorandas, **Morgana, Sabrina e Naná**, que me ajudaram nas tarefas do Laboratório, sempre atenciosas e humildes.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia: **Maria José, Isabela, Regina Lúcia, Cláudia, Ester e Leandro** pela atenção reservada a todos os alunos, sempre com carinho e dedicação, tornando possível a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, José Alexandre e Sérgio** pela gentileza que sempre nos receberam, resolvendo nossas dúvidas com paciência e competência.

Aos funcionários da Biblioteca, **Silvia Helena, Maria Inês, Adriano, Eliane, Maria, Marley e Ceres**, pela disposição em ajudar aos alunos com eficiência e agilidade.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

Florian F. Avaliação do efeito da lectina Artin M na expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias relacionadas ao processo de reparação tecidual: estudo in vitro em macrófagos e fibroblastos gengivais de ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

Atualmente diversas pesquisas em Periodontia e Implantodontia visam estudar novos procedimentos e materiais que otimizem o processo cicatricial. O reparo envolve a proliferação de várias células que atuam sob a coordenação de proteínas chamadas fatores de crescimento e/ou citocinas, nos quais muitos estudos têm se concentrado e confirmado seu papel especial no processo de reparação. Artin M é uma lectina isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia* e foi utilizado no tratamento tópico de lesões por queimadura de pele proporcionando aceleração da cicatrização, e redução da necrose.

Em estudos recentes, foi demonstrado que o Artin M também estimulou a proliferação de fibroblastos e a reparação tecidual de lesões em mucosa palatina de ratos. Buscando um melhor entendimento da forma de atuação desta lectina, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Artin M na expressão gênica e produção proteica de citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de reparo tecidual. Culturas primárias de fibroblastos gengivais e macrófagos de rato foram tratadas com Artin M nas concentrações de 1 ; 2,5 e 5,0 µg/ml por 4, 8, 12 e 24 h para análise da expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa de maneira quantitativa, em tempo real (RT-qPCR) e, nas mesmas concentrações por 48 e 72h após estímulo para análise quantitativa da concentração proteica dos fatores de crescimento (VEGF e TGFβ) e das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNFα) em sobrenadante de culturas de células por meio de kits ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Os resultados demonstraram um estímulo significativo ($p < 0,05$; ANOVA) na expressão gênica das citocinas IL-1 e TNFα tanto pelos macrófagos como os fibroblastos. A secreção proteica dos fibroblastos gengivais demonstrou aumento nos níveis de TGFβ, enquanto nos macrófagos houve aumento para TNFα. Os resultados sugerem que o Artin M atua aumentando a expressão gênica e proteica de citocinas relevantes no processo de reparação.

Palavras-chave: periodontia, cicatrização, lectinas de ligação a manose.

Florian F. Evaluating the effect of lectin Artin M in the expression of growth factors and inflammatory cytokines related to the healing process: in vitro study on rat macrophages and gingival fibroblasts [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

Currently, several studies in Periodontics and Implantology seek for new procedures and material that optimize the healing process. The healing process involves the proliferation of various cells that act under the coordination of proteins called growth factors and/or cytokines, which have been focused by many researches that have confirmed their special role in the repair process. Artin M is a lectin isolated from *Artocarpus integrifolia* seed and used in the topical treatment of skin burn injuries, providing accelerated healing and necrosis reduction. Recently, some studies demonstrated that Artin M also stimulates fibroblast proliferation and wound healing in rat oral mucosa. Seeking a better understanding of the lectin action, the aim of this study was to evaluate the effects of Artin M on gene expression and protein production of cytokines and growth factors involved in tissue repair. Primary cultures of rat gingival fibroblasts and macrophages were treated with Artin M at concentrations of 1, 2.5, and 5.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for 4, 8, 12 and 24 h for gene expression analysis by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and at the same concentrations for 48 and 72h for quantitative analysis of protein concentration of growth factors (VEGF and TGF β) and inflammatory cytokines (IL-1 , IL-6 and TNF α) in culture supernatants by ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). The results demonstrated significant ($p < 0.05$, ANOVA) expression of IL-1 and TNF- α by macrophages as well as fibroblasts. In relation to the protein levels, gingival fibroblasts produced increased levels of TGF β , while macrophages synthesized significant levels of TNF- α . The results suggest that Artin M has a role in the increasing gene and protein expression of relevant cytokines in the repair process.

Keywords: periodontics , wound healing, mannose-binding lectins.

LISTA DE ABREVIATURAS

- DMEM:** meio “*dulbecco 's modified eagle médium*”
- FBS:** soro fetal bovino
- PBS:** solução salina de fosfato tamponada
- RPMI 1640:** meio “*roswell park memorial institute*” tipo 1640
- LPS:** lipossacarídeo d e *E.coli*
- VEGF:** fator de crescimento vascular endotelial
- TGF β :** fator de crescimento de transformação - β
- MEC:** matriz extracelular
- PMN:** leucócitos polimorfonucleares
- PDGF:** fator de crescimento derivado de plaquetas
- EGF:** fator de crescimento epidermal
- FGF:** fator de crescimento de fibroblastos
- FGF-7:** fator de crescimento de fibroblastos tipo 7
- IGF:** fator de crescimento semelhante à insulina
- TNF α :** fator de necrose tumoral - α
- IL-1:** interleucina 1
- IL-1 β :** interleucina 1 tipo β
- IL-6:** interleucina 6
- IL-8:** interleucina 8
- IL-12:** interleucina 12
- MMPs:** metaloproteinases da matriz
- TIMPs:** inibidores de metaloproteinases
- TIMP3:** inibidor de metalloproteinase tipo 3
- MMP-1:** metaloproteinase da matriz tipo 1
- MMP-2:** metaloproteinase da matriz tipo 2
- MMP-3:** metaloproteinase da matriz tipo 3
- MMP-8:** metaloproteinase da matriz tipo 8
- MMP-9:** metaloproteinase da matriz tipo 9
- PGE₂:** prostaglandina E₂
- TLR₂:** receptor tipo Toll- 2
- PCNA:** antígeno nuclear de proliferação celular

p63: proteína 63

cMet: receptor para o fator de crescimento de hepatócitos

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo celular e molecular em reparação tecidual adaptado segundo Eming et al. ²⁰ , 2007.....	24
Figura 2 - Cultura primária de fibroblastos com 21 dias de cultivo com aumento de 4x. (F) fragmento de tecido; (fb) fibroblastos ao redor do tecido gengival.....	33
Figura 3 - Fluxograma das etapas para obtenção da cultura primária de fibroblastos gengivais de ratos e desenho do experimento proposto.	35
Figura 4 - Avaliação da expressão gênica de TNF- α em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	39
Figura 5 - Avaliação da secreção da proteína TNF- α por cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.	40
Figura 6 - Avaliação da expressão gênica de TNF- α por fibroblastos de cultura primária de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	40
Figura 7 - Avaliação da expressão gênica de IL - 6 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	41
Figura 8 - Avaliação da secreção da proteína IL - 6 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.	42
Figura 9 - Avaliação da expressão gênica de IL-6 por fibroblastos de cultura primária de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	42
Figura 10 - Avaliação da secreção da proteína IL - 6 em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.....	43
Figura 11 - Avaliação da expressão gênica de IL - 1 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	43
Figura 12 - Avaliação da expressão gênica de IL - 1 em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.....	44
Figura 13 - Avaliação da expressão gênica de TGF β em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	45
Figura 14 - Avaliação da secreção da proteína TGF β em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.	45
Figura 15 - Avaliação da expressão gênica de TGF β em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	46

Figura 16 - Avaliação da secreção da proteína TGF β em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.....	46
Figura 17 - Avaliação da expressão gênica de VEGF em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	47
Figura 18 - Avaliação da expressão gênica de VEGF em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.	48
Figura 19 - Avaliação da secreção da proteína TGF β em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Informações sobre os conjuntos de primers para PCR em tempo real (TaqMan qPCR master mix, Applied Biosystems). Araraquara, 2014	37
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3 PROPOSIÇÃO.....	30
4 MATERIAL E MÉTODO.....	32
4.1 Obtenção da lectina Artin M.....	32
4.2 Obtenção e Manutenção dos Animais.....	32
4.3 Cultura primária celular.....	32
4.4 Extração de RNA e RT-PCR em tempo real.....	35
4.4.1 <i>Extração de RNA total</i>	35
4.4.2 <i>RT – Transcrição Reversa (síntese de cDNA)</i>	36
4.4.3 <i>PCR em Tempo Real</i>	36
4.5 ELISA.....	37
4.6 Análise Estatística.....	37
5 RESULTADO.....	39
5.1 TNF α	39
5.2 IL-6.....	41
5.3 IL – 1.....	43
5.4 TGF- β	45
5.5 VEGF.....	47
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	58



1 INTRODUÇÃO

Na Odontologia, especialmente na Periodontia e Implantodontia, as cirurgias mucogengivais têm sido amplamente utilizadas para devolver saúde, função e estética ao paciente (Hall, Lundergan²⁷, 1993). As técnicas de enxertos de tecido mole - enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo – são indicadas, para reconstrução de áreas de recessão gengival, perda de papila interdental e deficiência no rebordo alveolar (Langer, Langer³⁶, 1983; Novaes, Novaes⁴⁴, 1997).

Apesar de apresentarem altos índices de sucesso, essas técnicas promovem feridas agudas no leito doador, resultantes da interrupção da integridade da mucosa pelo procedimento cirúrgico, que estão sujeitas à infecção e cronificação. Entretanto, poucos estudos são encontrados na literatura avaliando materiais com a finalidade de acelerar e melhorar a reparação da área doadora na cavidade oral. Alguns trabalhos têm avaliado materiais como cimento cirúrgico, colágeno microcristalino (Saroff et al.⁵⁹, 1982), subgalato de bismuto (Tramontina et al.⁶⁸, 2002) e adesivos com fibrina na tentativa de uma rápida hemostasia e proteção da ferida, como demonstrado pela maior formação de tecido conjuntivo no local (Alves-Rezende, Okamoto², 1997; Bartolucci, Prato⁶, 1982; Dogan et al.¹⁸, 1992; Jackson³⁰, 2001; Jackson³¹, 2001).

Na medicina, o tratamento de feridas cutâneas tem recebido modalidades terapêuticas que envolvem corticosteróides, antimicrobianos e antiinflamatórios, visando acelerar a reparação de feridas cutâneas em geral (Martins et al.⁴⁰, 2009). No entanto, nos últimos anos, têm se intensificadas pesquisas com produtos naturais como alternativas, em vista dos efeitos adversos e na busca de propriedades adicionais. Vários estudos têm demonstrado efeitos positivos com relação ao processo de reparo de feridas quando utilizado derivados de plantas com *Centella asiática*, *Morinda citrifolia*, *Chamomilla recutita*, *Aloe vera*, entre outros (Martins et al.⁴⁰, 2009; Ermertcan et al.²¹, 2008; Nayak et al.⁴³, 2007; Shetty et al.⁶¹, 2006).

O Artin M é uma lectina isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia*, conhecida mais popularmente como a Jaca. Essas lectinas são proteínas que ligam-se especificamente e reversivelmente a glicanas, presentes nas superfícies celulares,

desencadeando sinalização, ativação, migração e proliferação celulares, além de induzir a produção de citocinas (Peumans et al.⁵⁴, 2001).

Diversos estudos foram realizados para melhor compreensão dos mecanismos de ação do Artin M, na qual estão envolvidos a ativação e migração de neutrófilos (Moreno et al.⁴², 2003), degranulação de mastócitos (Pereira-da-Silva et al.⁵¹, 2006), produção de interleucina 12 (IL-12) pelos macrófagos e células dendríticas, além de conferir imunidade T helper 1 contra infecções por *Paracoccidioides brasiliensis* (Panunto-Castelo et al.⁴⁹, 2001) e *Leishmania* (Coltri et al.¹⁵, 2008).

Algumas pesquisas tiveram enfoque nos efeitos do Artin M na cicatrização de lesões. Em estudos com coelhos, foi observado que no grupo tratado houve maior número de neutrófilos e fatores de crescimento quando comparados ao grupo controle (Chahud et al.¹³, 2009). Para Kim et al.³³(2013) a aplicação tópica do Artin M em feridas criadas cirurgicamente no palato de cães e ratos promoveu uma aceleração da cicatrização e altas concentrações de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento de transformação – β (TGF β).

Diante dos vários benefícios observados em estudos pré-clínicos pelo Artin M, estudos adicionais que avaliem o mecanismo de ação desta proteína nas células envolvidas no processo de reparação são necessários.



2 REVISÃO DA LITERATURA

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico ou mecânico. A capacidade de reparar os danos causados por esses agentes é crucial para a sobrevivência do organismo. Assim, a resposta inflamatória a esses agentes serve não só para eliminá-los, mas também para estimular os processos de reparo (Blanes¹⁰, 2004; Kumar et al.³⁵, 2008).

Por vários séculos, o tratamento de feridas teve como objetivo primário o seu fechamento em menor tempo possível. Para isso, vários agentes foram utilizados, como extrato de plantas, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas (Blanes¹⁰, 2004). Porém, somente no século 19 foram alcançados avanços significativos no controle de infecção e da hemostasia, além da descoberta das citocinas e fatores de crescimento que trouxeram novas perspectivas para compreensão da biologia celular na cicatrização de feridas (Blanes¹⁰, 2004; Eming et al.²⁰, 2007).

Segundo Byrne et al.¹² (2005) o processo de reparação tecidual, altamente dinâmico, pode ocorrer por meio de dois mecanismos: a regeneração e a cicatrização que envolvem a proliferação de várias células e sua relação com a matriz extracelular (MEC). Dentre essas células, podem-se citar os remanescentes do tecido lesado, as células endoteliais vasculares e fibroblastos, que se proliferam sob a coordenação de proteínas chamadas fatores de crescimento, cuja produção e a resposta das células a esses fatores são determinantes para um processo adequado de reparação.

O reparo do tecido não depende somente da atividade dos fatores de crescimento, mas também de interações entre as células e os componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente o colágeno e fibronectina. Muito além de uma substância preenchedora de espaço, a MEC oferece suporte mecânico para as células, controle do crescimento celular e manutenção da diferenciação celular (Kumar et al.³⁵, 2008), juntamente com as moléculas de adesão celular: selectinas e integrinas (Thomas et al.⁶⁵, 1995).

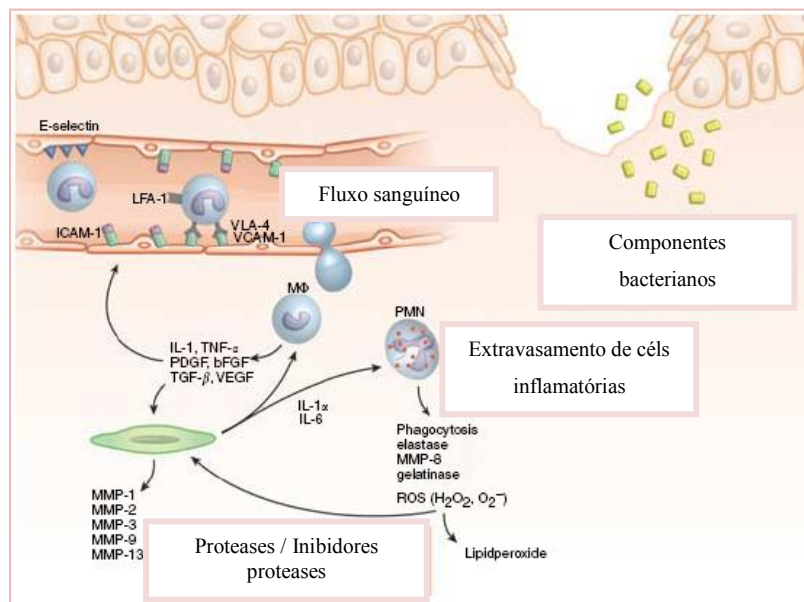
Didaticamente, o processo de reparação consiste numa sequência de eventos moleculares que podem ser divididos em três fases: inflamação, proliferação e remodelação, ocorrendo na realidade uma transição gradual e contínua durante o processo (Clark¹⁴, 1989; Eming et al.²⁰, 2007; Li et al.³⁸, 2007). Um balanço entre mediadores celulares de inibição e proliferação celular durante os diversos estágios de reparação é crucial para o equilíbrio dos tecidos após a lesão (Eming et al.²⁰, 2005; Thomas et al.⁶⁵, 1995).

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão, por um período de 24 a 48 horas, envolvendo fenômenos vasculares, de coagulação, de migração celular e de liberação de citocinas e fatores de crescimento (Clark¹⁴, 1989; Li et al.³⁸, 2007). Inicialmente, no sítio da ferida, os vasos lesionados sofrem contração, seguida de agregação plaquetária, resultando na formação de coágulo, sendo que alguns autores consideram a hemostasia a primeira fase do processo de reparação da ferida (Li et al.³⁸, 2007). No espaço perivascular, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e as plaquetas extravasadas aderem-se ao colágeno, sofrendo degranulação e ativação, ocorrendo a liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento de transformação (TGF), fator de crescimento epidermal (EGF), e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) além de proteínas adesivas como fibrinogênio, fibronectina, tromboespondina (Eming et al.²⁰, 2007; Hom et al.²⁸, 2002; Li et al.³⁸, 2007; Thomas et al.⁶⁵, 1995). (Figura 1).

Os monócitos e neutrófilos são as primeiras células que se dirigem ao sítio de dano tecidual, iniciando o processo da cicatrização. Os neutrófilos aderem-se às células endoteliais e migram para o tecido inflamado, iniciando debridamento de tecidos desvitalizados, reconhecimento, fagocitose e destruição dos agentes infecciosos (Clark¹⁴, 1989; Eming et al.²⁰, 2007). Os macrófagos residentes, bem como os derivados de monócitos atraídos para o local, são predominantes na fase inflamatória e desempenham papel essencial na formação e remodelação do tecido, sendo responsáveis pela fagocitose, recrutamento de novas células inflamatórias, ativação celular e angiogênese. Essas atividades decorrem da liberação de quimiocinas, além das citocinas e diversos fatores de crescimento, como a interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral

(TNF), EGF, PDGF, TGF, FGF (Eming et al.²⁰, 2007; Hom et al.²⁸, 2002; Li et al.³⁸, 2007).

Figura 1- Mecanismo celular e molecular em reparação tecidual adaptado segundo Eming et al.²⁰, 2007.



Fonte: Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127:514-525.

Para Li et al.³⁸ (2007) os mastócitos também desempenham papel importante na reparação tecidual, principalmente por liberação de fatores contidos em seus grânulos que ampliam o recrutamento de neutrófilos e a neoangiogênese. De acordo com Iba et al.²⁹ (2004) a deficiência em mastócitos afetou a deposição de colágeno e remodelação do tecido, na fase tardia do reparo.

A importância da fase inflamatória foi ressaltada por Devalajara et al.¹⁶ (2000) nos estudos com camundongos *knockout* para gene CXCR2: os animais testados apresentaram recrutamento deficiente de neutrófilos e macrófagos para a local da ferida, angiogênese reduzida e atraso na reparação, demonstrando que as alterações genéticas modificam a resposta inflamatória alterando o curso da reparação. Também nos estudo de Peters et al.⁵³ (2005), camundongos com neutrófilos modificados para a integrina CD-18 da sua superfície apresentaram atraso no fechamento de feridas pela deficiência em miofibroblastos e redução da sua contração, já que a ausência de neutrófilos no local inibe os macrófagos de secretarem TGF-β1, um mediador chave para a diferenciação de miofibroblastos.

Também segundo Koh et al.³⁴ (2011) diversos estudos demonstraram o papel essencial dos macrófagos no reparo tecidual e sua habilidade em produzir mediadores e citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), IL-12 e TNF α . A cicatrização de feridas em ratos com deficiência em macrófagos apresentou-se atrasada, com formação de tecido de granulação e menor angiogênese.

Dentre as enzimas proteolíticas envolvidas na reparação tecidual, as metaloproteinases da matriz (MMPs) e os inibidores de metaloproteinases (TIMPs) são as principais responsáveis pela regulação dos mecanismos celulares e moleculares, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, de todas as fases do processo de reparo, sendo que maior expressão de MMPs foi detectada nos tecidos em reparação (Gill, Parks²⁵, 2008; Toriseva, Kahari⁶⁷, 2009).

Na fase inflamatória, as MMPs, regulam atividade de quimiocinas, extravasamento de leucócitos e migração celular (Gill, Parks²⁵, 2008). Durante a angiogênese, promovem a ruptura da camada basal vascular e a proliferação endotelial, sendo essenciais na reepitelização e no remodelamento do tecido (Lafleur et al.³⁷ 2003). As propriedades das TIMPs em regular a atividade das MMPs é fundamental em todos os aspectos da resolução do processo de reparo, especialmente na migração celular e na regulação da angiogênese pela TIMP3 (Gill, Parks²⁵, 2008; Toriseva, Kahari⁶⁷, 2009). Outros estudos têm como proposta a utilização da MMP2 e MMP9, inibidores da angiogênese, na prevenção do crescimento tumoral após tratamento quimioterápico (Lafleur et al.³⁷ 2003).

Na fase proliferativa, os fibroblastos estimulados por FGF e TGF β começam a deposição de colágeno, formando o tecido de granulação que é constituído por uma matriz frouxa de colágeno, com grande número de vasos recém-formados essenciais nessa fase, fibroblastos e macrófagos (Braumann, Wiksman¹¹, 2007). A reepitelização inicia-se pela migração de células epiteliais das margens para o centro da ferida. (Li et al.³⁸, 2007; Thomas et al.⁶⁵, 1995).

O processo de angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, regulada por fatores de crescimento, citocinas pró-angiogênicas e inibidores da neovascularização (Lafleur et al.³⁷, 2003). Nesse processo, em resposta a fatores quimiotáticos liberados devido à descontinuidade da rede vascular,

inicia-se a migração de células endoteliais ao local. Em seguida ocorre proliferação endotelial, atribuída à ação de fatores de crescimento como FGF, TGF β , EGF e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), ocorrendo por fim, alinhamento e organização das células para formação do tubo capilar (Eming et al.¹⁹, 2007).

Dentre os fatores de crescimento que participam no restabelecimento da vascularização, o VEGF, liberado por plaquetas e macrófagos, é o principal estimulador na proliferação endotelial e formação de novos vasos (Berse et al.⁹, 1999; Lafleur et al.³⁷, 2003). Foi verificado que a produção de VEGF por fibroblastos *in vitro* pode ser estimulada por prostaglandina E2 (PGE₂) e interleucinas IL-1 α e IL-6, sendo que o TGF β demonstrou ser um potente indutor, estimulando seis vezes mais a secreção de VEGF quando comparado aos outros fatores de crescimento.

As repetições sucessivas de lise, síntese e direcionamento formam fibras de colágeno maiores, resultando numa orientação paralela às forças aplicadas e aumentando a sua resistência (Eming et al.¹⁹, 2007; Rhett et al.⁵⁵, 2008). Essa é a fase de maturação e remodelação da ferida. O remodelamento da matriz extracelular é mediado principalmente por collagenases (MMP-1 e MMP-8) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9), controladas por IL-1, TNF α , PDGF, TGF, EGF, provenientes de fibroblastos e células epiteliais (Gill, Parks²⁵, 2008; Toriseva, Kahari⁶⁷, 2009), podendo durar meses.

A contração de ferida contribui para fechamento de lesões, principalmente quando há reparação por segunda intenção. O movimento ocorre das margens para o centro e é desejável por reduzir o risco de infecção, no entanto pode resultar em formação de tecido cicatricial em excesso prejudicando a estética e função do tecido (Farahani, Kloth²², 2008). Segundo Peters et al.⁵³ (2005) o TGF β é considerado o principal modulador dessa fase, induzindo a contração da matriz extracelular e dos miofibroblastos. Entretanto, também foi demonstrado ser responsável na formação de quelóides (Beanes et al.⁸, 2003). Uma lesão pode ser considerada reparada depois de concluída a remodelação e contração da matriz extracelular (Giannoudis, Pountos²⁴, 2005; Thomas et al.⁶⁵, 1995).

Muitos estudos têm concentrado suas pesquisas no papel especial dos fatores de crescimentos e/ou citocinas no processo de reparação justificando sua utilização terapêutica nesse processo (Adolphe, Wainwright¹, 2005; Anusaksathien et al.³, 2003,

Menke et al.⁴¹, 2008). Segundo Bao et al.⁵ (2009) e Barrientos et al.⁷ (2008), o VEGF estimula o processo de angiogênese no reparo, assim como a deposição de colágeno e epitelização.

Oda et al.⁴⁶ (2004) verificaram que aplicação tópica de FGF nas feridas no palato de ratos acelerou a formação de tecido de granulação, epitelização e maturação de colágeno. A aplicação de TGF isoladamente ou associada ao PDGF e/ou EGF estimulou maior deposição de colágeno em ratos com alterações nos padrões de reparação induzidas por diabetes ou corticoides (Beanes et al.⁸, 2003).

Dessa maneira, fica evidente a importância de estudos adicionais na promoção de cicatrização tecidual mais rápida e eficiente. As pesquisas com produtos naturais que possam exercer essa função têm se intensificado nos últimos anos. De acordo com Martins et al.⁴⁰ (2009), a *Chamomilla recutita*, conhecida como Camomila, mostraram resolução mais rápida da ferida em ratos tratados com Camomila do que com corticoides, revelando propriedades anti-inflamatórias, anti-bacterianas e anti-fúngicas.

Artin M

O Artin M é uma lectina ligante a D-manose, isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia*, conhecida mais popularmente como a Jaca (Silva et al.⁶³, 2005; Pereira-da-Silva et al.⁵¹, 2008; Rosa et al.⁵⁶, 2009; Silva-Lucca et al.⁶⁴, 1999).

Lectinas são proteínas que, através de seus domínios de reconhecimento de carboidratos, ligam-se especificamente e reversivelmente a glicanas. A ligação de lectinas a glicanas de superfícies celulares pode desencadear sinalização, ativação, migração e proliferação celulares, além de induzir a produção de citocinas. As lectinas são também utilizadas como ferramentas de identificação e isolamento de glicanas da superfície de células, bactérias e vírus (Moreno et al.⁴², 2003; Panunto-Castelo et al.⁴⁹, 2001).

Artin M induz a migração de neutrófilos, resultante da interação concomitante com laminina da matriz extracelular e receptores glicosilados, como CXCR2, da superfície celular (Santos de Oliveira et al.⁵⁸, 1994). Essa propriedade depende parcialmente da ativação e degranulação dos mastócitos, também induzidas pela lectina (Moreno et al.⁴², 2003). A ligação de Artin M com o receptor CXCR2 de neutrófilos é

seguida de sinalização celular por via dependente da proteína G (Pereira-da-Silva et al.⁵¹, 2006; Pereira-da-Silva et al.⁵⁸, 2008).

Ao ligar-se a glicanas associadas a TLR2 da superfície de macrófagos e células dendríticas, o Artin M induz a produção de interleucina 12 (IL-12) e promove respostas T helper 1. Por essa ação imunomoduladora, Artin M tem se mostrado capaz de conferir resistência a camundongos contra patógenos de parasitismo intracelular (Panunto-Castelo et al.⁴⁹, 2001; Toledo et al.⁶⁶, 2009).

Recentemente, Artin M foi utilizado no tratamento tópico de lesões por queimadura de pele proporcionando aceleração da cicatrização e redução da necrose (Pereira-da-Silva et al.⁵⁸, 2008). Chahud et al.¹³ (2009) observaram em estudo com coelhos, aceleração na reepitelização das lesões de abrasão da córnea tratados com a lectina tópica quando comparados as lesões não tratadas, num período de 24h. Segundo os autores, este evento seria resultado da ação direta do Artin M na proliferação do epitélio. Além disso, verificaram maior expressão de VEGF, PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), p63 (proteína 63) e cMet (receptor para o fator de crescimento de hepatócitos) nas lesões tratadas do grupo de 24h, indicando aceleração na neoformação de vasos sanguíneos, proliferação e diferenciação das células epiteliais. Os autores concluíram que a aplicação tópica de Artin M acelera a reparação epitelial da córnea de coelho, por meio de mecanismo de aumento na indução de neutrófilos (Charud et al.¹³, 2009; Pereira-da-Silva et al.⁵¹, 2006; Toledo et al.⁶⁶, 2009).

Na cavidade oral, outros estudos demonstraram os efeitos do Artin M na reparação de lesões criadas cirurgicamente na mucosa palatina de ratos e de cães (Kim et al.³³, 2013). A aplicação tópica do Artin M promoveu uma aceleração da cicatrização e da maturação do tecido de granulação, além de aumento significativo na proliferação de fibroblastos e nos níveis de VEGF e TGF β .

Esses resultados nos levaram a propor o presente trabalho *in vitro*, com o intuito de iniciar estudos para esclarecer os mecanismos de ação do Artin M em possíveis células envolvidas no processo de cicatrização.



3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da lectina Artin M na expressão gênica e proteica de fatores de crescimento (VEGF, TGF β) e citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF α) diretamente relacionados ao processo de reparação tecidual, em culturas primárias de fibroblastos gengivais e macrófagos de ratos.

Hipótese testada: A lectina Artin M aumenta a expressão gênica, bem como a produção proteica e secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento por células relevantes no processo de reparação de feridas na mucosa mastigatória oral.



4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Obtenção da lectina Artin M

Preparações de Artin M de planta foram obtidas de acordo com procedimento descrito por Santos-de-Oliveira et al.⁵⁸ (1994) e Silva et al.⁶³ (2005). Essas preparações foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

4.2 Obtenção e Manutenção dos Animais

Foram utilizados 6 ratos da espécie *Holtzman*, machos, com peso médio de 300g. Estes animais foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, com aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP sob o número 4/2013 (Anexo 1) e permaneceram no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara até o momento do sacrifício. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas limpas, em temperatura controlada (22 - 25°C), com ciclos de luz-escuro de 12 horas e alimentados com ração granulada e água ad libitum.

Em toda eutanásia animal, realizou-se sobredose de anestésico geral, com injeção intramuscular de 0,08mL/100g por peso corporal de Ketamina e 0,04mL/100g por peso corporal de Cloridrato de Xilazina, confirmado por parada cardíaca. Para cada cultura primária celular, foram utilizados protocolos diferentes de obtenção tecidual, descritos a seguir.

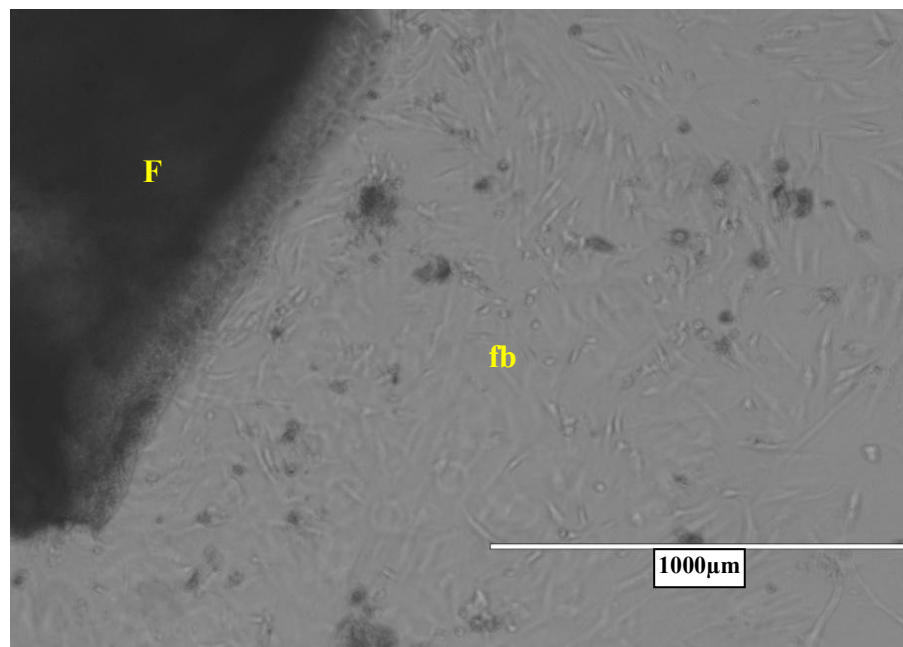
4.3 Cultura primária celular

a) Fibroblastos gengivais

Fibroblastos gengivais de rato foram obtidos através da técnica de cultivo primário no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara–UNESP (Figura 2). Após sacrifício animal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para acesso à mucosa palatina, de forma a se obter um fragmento do tecido

próximo a margem gengival do molar, de aproximadamente 20mm² com auxílio de lâmina de bisturi nº15. Imediatamente após a coleta da amostra, esta foi lavada em soro fisiológico e colocada em um tubo falcon contendo 5 ml de meio DMEM suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino), 1% de penicilina/estreptomicina, 5µg/ml de anfotericina B e 250 µg/ml de sulfato de gentamicina. Em seguida, numa câmara de fluxo laminar, a amostra foi lavada com solução salina de fosfato tamponada (PBS) e o tecido epitelial removido com o auxílio de lâmina de bisturi nº15, em placa de Petri de 100 mm de diâmetro, contendo 5 ml do meio de cultura previamente descrito. Após a desepitelização, cada amostra foi fragmentada em 5 partes (explantes) de aproximadamente 4mm² e divididas em placas de 60mm e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ com 3 ml do meio de cultura devidamente suplementado por 100U/ml de penicilina e 100U/ml de estreptomicina e antifúngico anfotericina B 5µg/ml e 250 µg/ml de sulfato de gentamicina. O crescimento celular foi observado diariamente, através de um microscópio de fase invertida. Quando atingiu uma confluência de aproximadamente 70%, as células foram tripsinizadas, expandidas em passagens subsequentes e essa cultura primária deu origem a uma nova subcultura na proporção de 1:1.

Figura 2 - Cultura primária de fibroblastos com 21 dias de cultivo com aumento de 4x. (F) fragmento de tecido; (fb) fibroblastos ao redor do tecido gengival.



b) Macrófagos:

Os macrófagos de rato foram obtidos por meio da técnica de cultura primária da medula óssea de ossos longos no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara–UNESP. Foram utilizados os mesmos ratos *Norvegicus Holtzman* da obtenção da cultura primária de fibroblastos gengivais.

Inicialmente, os fêmures e tíbias bilaterais foram dissecados, seguido da lavagem da parte interna desses ossos com RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. O conteúdo da medula óssea foi centrifugado a 200g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), 30% de sobrenadante de célula L929 (linhagem de fibroblastos) e 2% de glutamina. 10 ml desta suspensão foram colocados em cada placa de cultura com superfície tratada para crescimento celular específico (Optilux - BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, Califórnia, USA) e incubadas a 37°C em 5%CO₂.

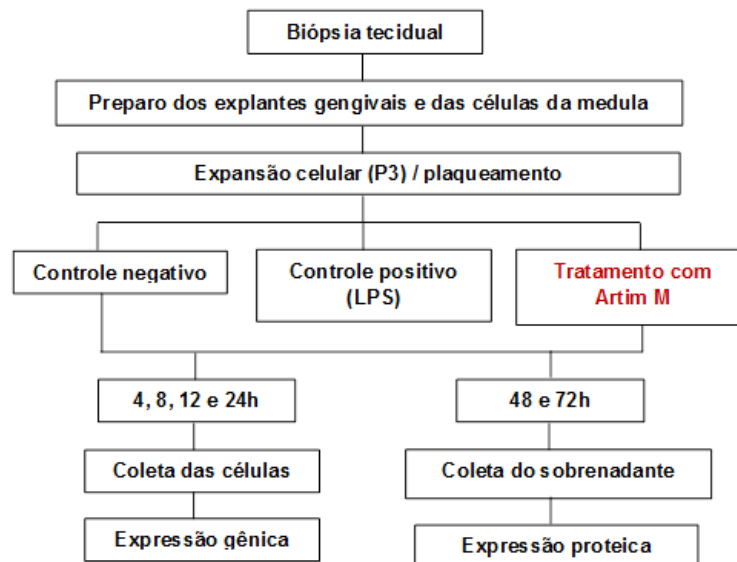
Após 4 dias, em cada placa, foram acrescentados 10 ml do meio de plaqueamento e incubadas por mais 3 dias. Para obtenção dos macrófagos, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas na placa lavadas com 10 ml de PBS estéril, seguido de nova lavagem com 10 ml de PBS gelado em cada placa e incubados a 4°C por 10 minutos. Os macrófagos foram destacados por pipetagem suave do PBS, centrifugados a 200G por 5 minutos a 4°C e ressuspendidos com meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), 5% de sobrenadante de célula L929 e 2% de glutamina.

Para a realização dos experimentos, os cultivos celulares de macrófagos e fibroblastos foram realizado em placas de acrílico com 24 poços contendo 0,5x10⁵ células/compartimento nos experimentos realizados para análise da expressão proteica por meio da técnica ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Para análise da expressão gênica por PCR – *Polymerase Chain Reaction*, tanto para os fibroblastos quanto para os macrófagos, o cultivo celular ocorreu em placas de acrílico com 12 poços contendo 1x10⁵ células/compartimento, ambas mantidas a 37°C.

Previamente ao estímulo com Artin M, as células foram desinduzidas em meio de cultura apropriado suplementado com 0.3% de FBS por um período mínimo de 8 h.

As células foram estimuladas com Artin M nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g/ml}$ e mantidas a 37°C por períodos definidos para cada tipo de análise, de acordo com experimentos anteriores de Kim et al.³³, 2013. As células cultivadas apenas com meio de cultura RPMI (não estimuladas com a lectina) foram utilizadas como controle negativo. Para controle positivo, as células foram estimuladas com $1\mu\text{g/ml}$ de LPS (Lipopolissacarídeo) de *E. coli*. Posteriormente, os sobrenadantes e as células colatadas em Trizol (TRIzol® Reagent – Life Technologies – Califórnia - USA) foram armazenados a -80°C para posterior análise. (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma das etapas para obtenção da cultura primária de fibroblastos gengivais de ratos e desenho do experimento proposto.



Fonte: própria.

4.4 Extração de RNA e RT-PCR em tempo real

4.4.1 Extração de RNA total

A presença de mRNA nos fibroblastos gengivais e macrófagos para os fatores de crescimento VEGF e $\text{TGF}\beta$ e citocinas IL-1, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa de maneira quantitativa, em tempo real (RT-qPCR).

Inicialmente, as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e mantidas em gelo. Em seguida, para cada 1 ml de trizol foi acrescentado 0,2ml de clorofórmio, centrifugado após 2

minutos. O sobrenadante foi transferido e acrescentado 0,5 ml de isopropanol. Após incubação de 10 minutos, o conteúdo foi centrifugado, o sobrenadante desprezado cuidadosamente, permitindo a secagem do conteúdo de RNA depositado no fundo do microtubo, por 1 minuto. Na sequência, o material foi suspenso em 25µl de etanol, centrifugado por 5 minutos e deixado em repouso até a completa evaporação do conteúdo. Após o conteúdo evaporar, foi acrescentado 20µl de água ultra-pura, incubado a 56°C e em seguida centrifugado por 15 segundos.

Posteriormente, a quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation – Ohio - USA) por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm, respectivamente.

4.4.2 RT – Transcrição Reversa (síntese de cDNA)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita por reação de transcrição reversa (RT) utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems – Life Technologies – Califórnia - USA), na presença de RNA de cada amostra, Oligo-dT, dNTPs, MgCl₂, inibidor de RNase e enzima de transcriptase reversa, segundo o protocolo do fabricante.

4.4.3 PCR em Tempo Real

1µL do produto da reação de RT foi utilizado num volume total de reação de PCR de 30 µL. A reação de PCR em tempo real foi realizada em um aparelho *StepOne Real Time PCR System* utilizando TaqMan qPCR master mix (Applied Biosystems – Life Technologies – Califórnia - USA). As condições de reação de qPCR para cada gene de interesse foram otimizadas e padronizadas em relação à concentração de primers específicos, ausência da formação de dímeros e eficiência de amplificação do gene alvo. Os genes alvos e primers para PCR estão descritos na Tabela 1. Os assays foram previamente testados e validados por meio de curva padrão realizada com a diluição seriada de cDNA de uma amostra pré selecionada. Inicialmente, as condições pré-otimizadas de ciclagem serão: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e os ciclos de 95° C por 15segundos e 60°C por 1 minuto (o número de ciclos deverá ser otimizado para cada gene alvo, baseado no *cycle three shold* para detecção do sinal de cada gene). As expressões gênicas dos genes alvo serão normalizadas pela expressão do gene constitutivos GAPDH, e quantificada pelo método de quantificação

relativa em comparação à expressão das amostras controle utilizadas como valor de referência.

Tabela 1 - Informações sobre os conjuntos de primers para PCR em tempo real (TaqMan qPCR master mix, Applied Biosystems). Araraquara, 2014

Target Gene	Assay ID	Acession #	Amplicon Lenth (bp)
GAPDH	Mm99999915_g1	NM_008084.2	107
TNF	Rn01525859_g1	NM_012675.3	92
IL-6	Rn99999011_ml	NM_012589.1	90
IL-1	Rn00580432_ml	NM_031512.2	74
TGFb1	Rn00572010_ml	NM_021578.2	65
VEGFa	Rn01511601_ml	NM_001110333.1	69

Fonte: Applied Biosystems com adaptações.

4.5 ELISA

A análise quantitativa da concentração dos fatores de crescimento VEGF e TGF β e das citocinas IL-1, IL-6 e TNF α foi realizada em sobrenadante de culturas de células após 48h e 72h do estímulo com Artin M na concentração de 1,0; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g/ml}$, por meio do uso de kits ELISA - *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA Opteia™ Rat - Set; BD-Pharmingen, San Diego, Califórnia, USA). A densidade óptica foi mensurada num comprimento de onda de 450nm e o valor médio das leituras proporcionadas por cada amostra foi comparado ao valor médio proporcionado pelo controle negativo.

4.6 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente com o auxílio do software GraphPad, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, USA). Para a comparação inter-grupos, em cada período de análise, foi utilizado o teste de análise de variância One-way Anova seguido de comparação entre os grupos com o teste de Tukey. Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada.



5 RESULTADO

Todos os resultados obtidos com o estímulo de culturas primárias de fibroblastos gengivais ou macrófagos de rato, pelas diferentes concentrações de Artin M, estão separados de acordo com a citocina inflamatória/fator de crescimento avaliado. Estão apresentados os resultados da expressão gênica, seguido dos resultados de proteína secretada no meio de cultura.

5.1 TNF α

A Figura 4 apresenta os resultados da expressão gênica de TNF α em cultura primária de macrófagos de rato. Houve significativa ação do Artin M em todos os períodos quando comparado ao Controle, sendo que as doses de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ foram mais representativas. Da mesma maneira, os resultados de proteína secretada demonstram taxas relativamente elevadas de TNF α nas amostras estimuladas com 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Artin M (Figura 5).

Figura 4 - Avaliação da expressão gênica de TNF- α em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.

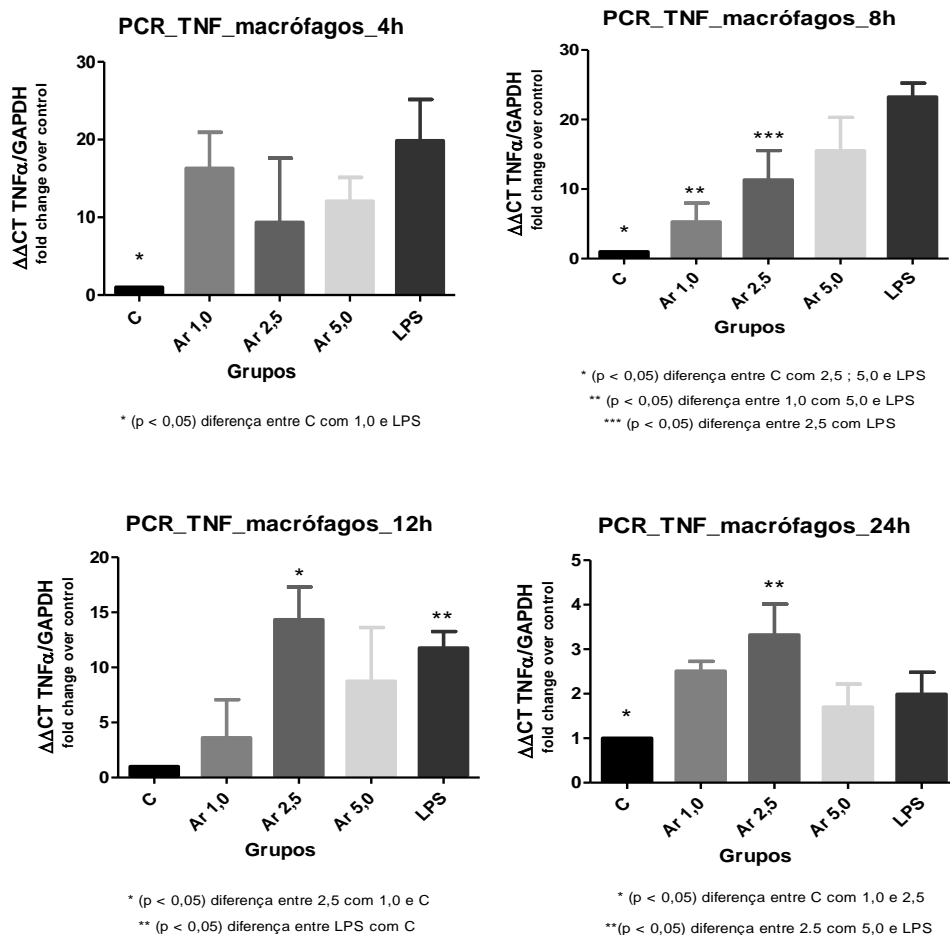
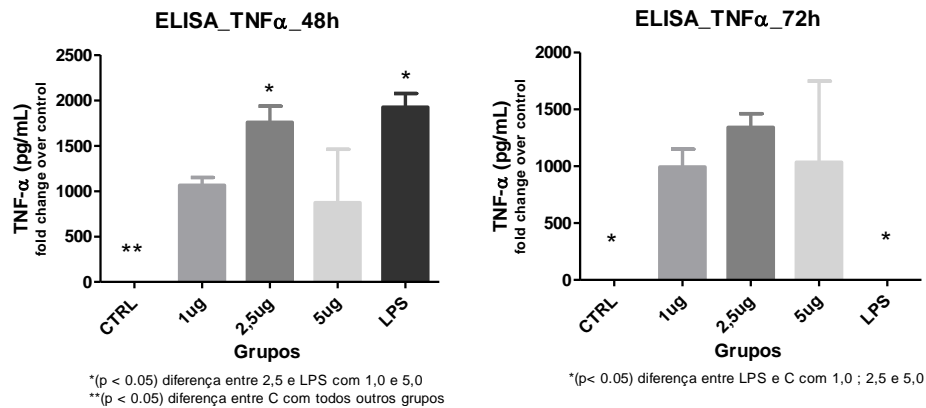
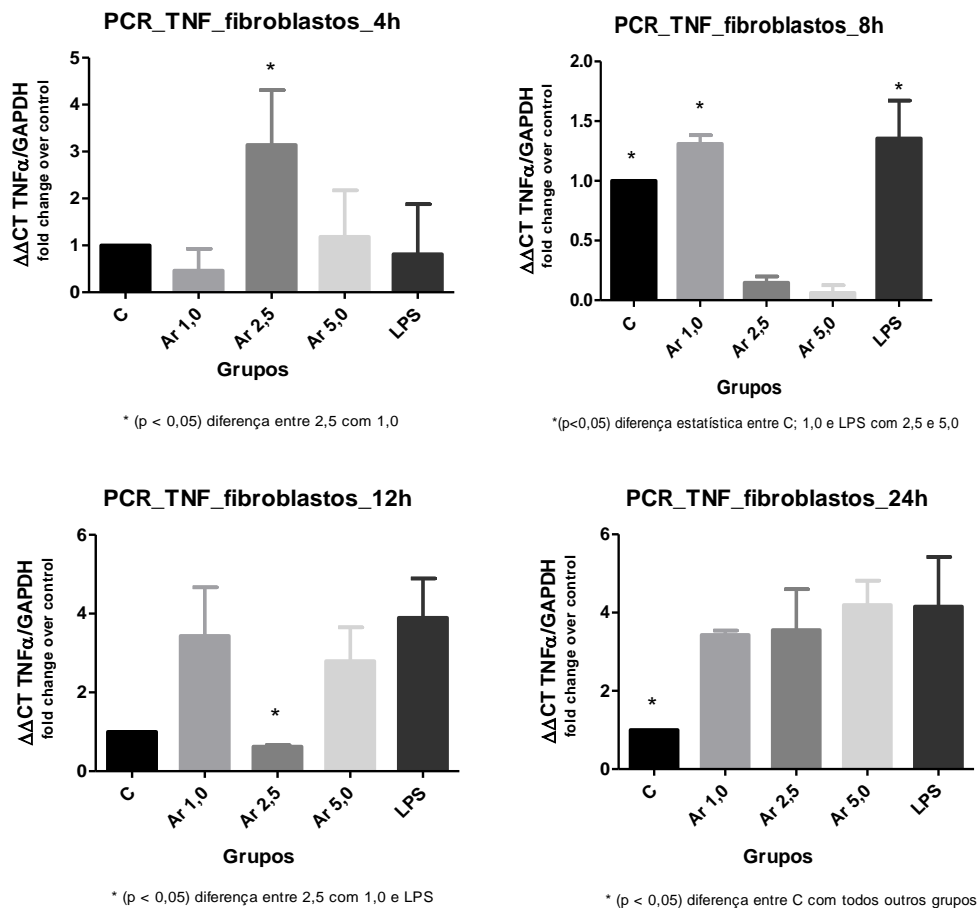


Figura 5 - Avaliação da secreção da proteína TNF- α por cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.



A Figura 6 representa os resultados da expressão gênica de TNF α em cultura primária de fibroblastos de ratos. As concentrações de Artin M de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ parecem ter melhor estimulado os fibroblastos para a expressão gênica, assim como observado para os macrófagos. Não foram detectados níveis significativos de TNF α secretado em nenhum dos grupos e períodos.

Figura 6 - Avaliação da expressão gênica de TNF- α por fibroblastos de cultura primária de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.



5.2 IL-6

A Figura 7 representa o resultado da expressão gênica de IL-6 em cultura primária de macrófagos de rato. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos tratados com Artin e o controle, em alguns períodos as concentrações de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ parecem agir, sugerindo uma tendência ao estímulo da expressão de IL-6. A secreção de IL-6 foi baixa em todos os grupos tratados com Artin, em ambos os períodos. Porém, observa-se uma tendência de estímulo no grupo de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, para os períodos de 48 e 72h (Figura 8).

Figura 7 - Avaliação da expressão gênica de IL - 6 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.

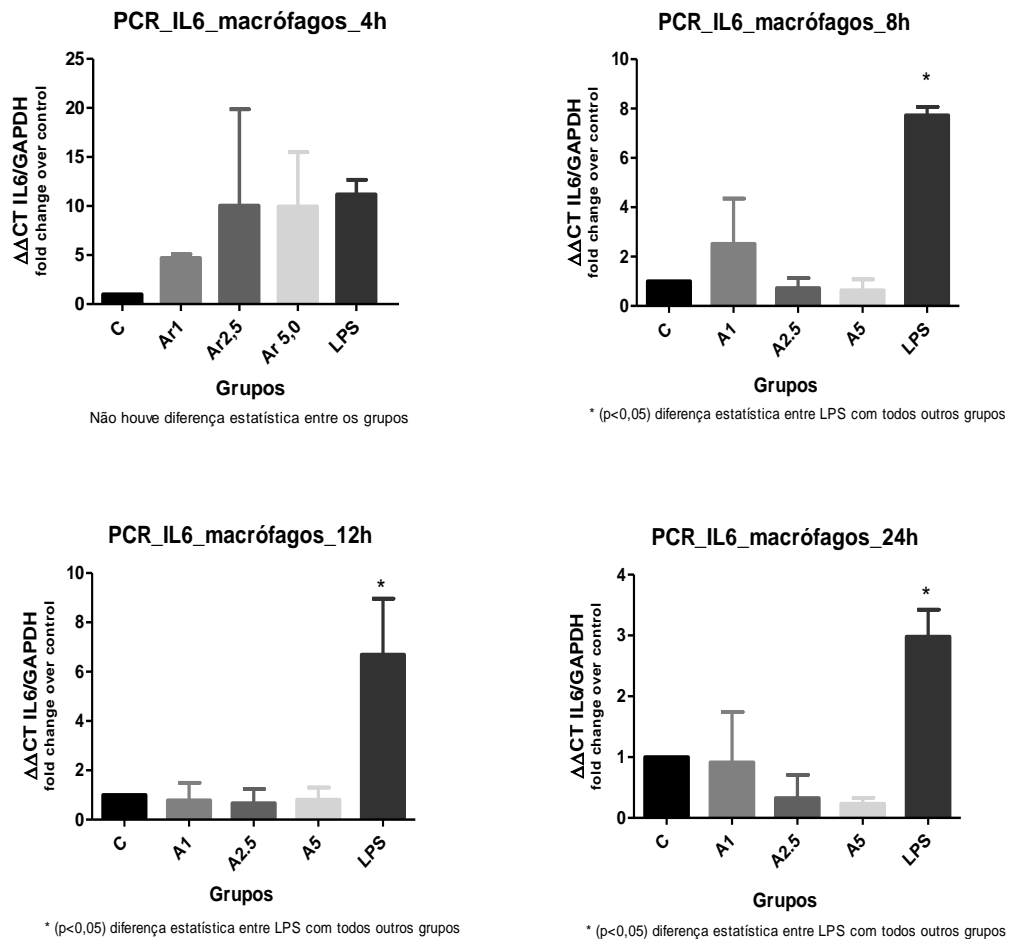
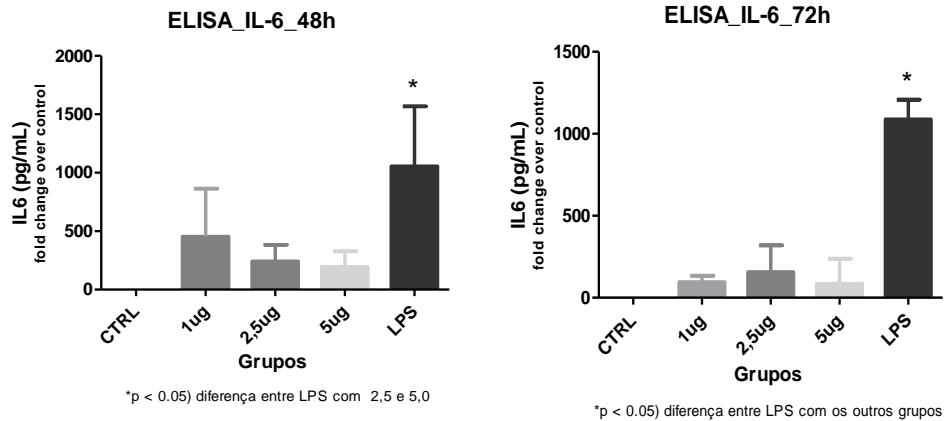
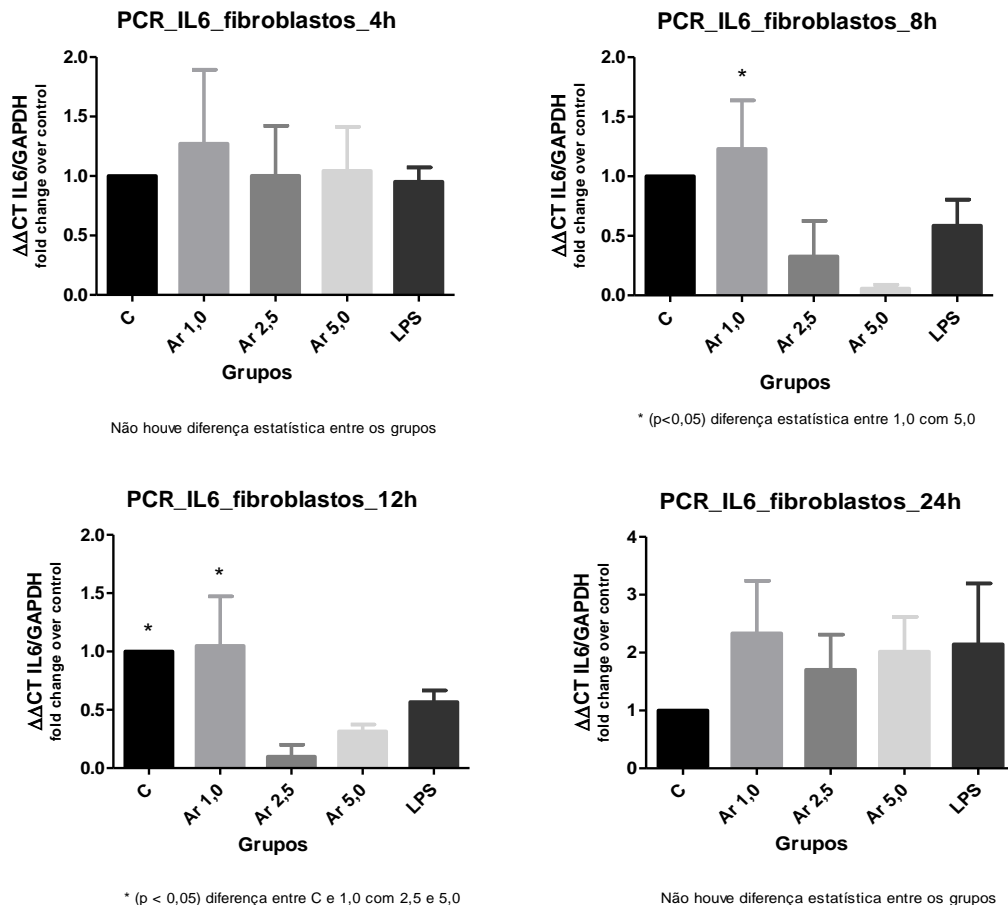


Figura 8 - Avaliação da secreção da proteína IL - 6 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.



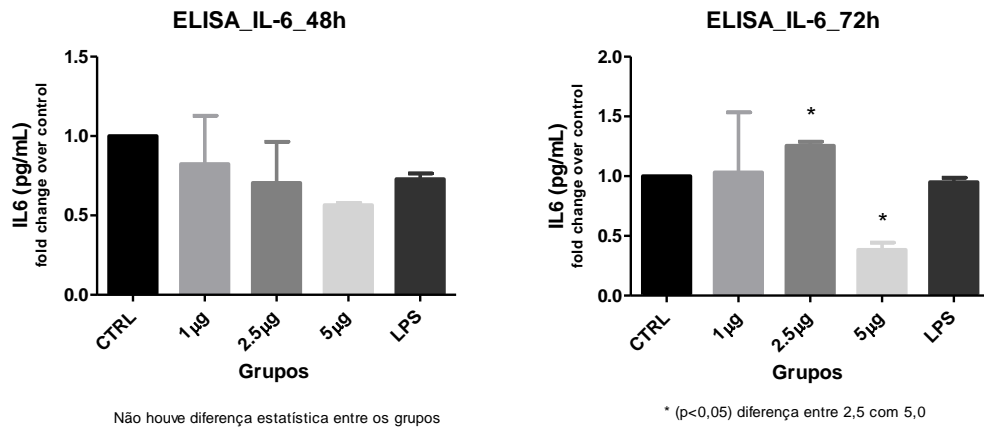
Com relação aos resultados da expressão gênica de IL-6 em cultura primária de fibroblastos de ratos, as concentrações de Artin M de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ parecem agir sugerindo uma tendência ao estímulo da expressão de IL-6 nos períodos após 8 e 12h. Apesar de não ocorrer diferença estatística nos outros períodos, as concentrações se mantêm ao nível ou superiores ao Controle (Figura 9).

Figura 9 - Avaliação da expressão gênica de IL-6 por fibroblastos de cultura primária de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.



A secreção da proteína IL-6 pelos fibroblastos se demonstrou mais acentuada no período de 72h após estímulo com a concentração de 2,5µg/ml exercendo maior tendência do que as outras concentrações (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da secreção da proteína IL - 6 em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.



5.3 IL - 1

A Figura 11 apresenta os resultados da expressão gênica de IL-1 em cultura primária de macrófagos de rato. Houve significativa ação do Artin M nas doses de 1,0µg/ml e 2,5µg/ml nos períodos de 8h e 24h, respectivamente. Não foram detectados níveis significativos de IL-1 secretado em nenhum dos grupos e períodos.

Figura 11 - Avaliação da expressão gênica de IL - 1 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.

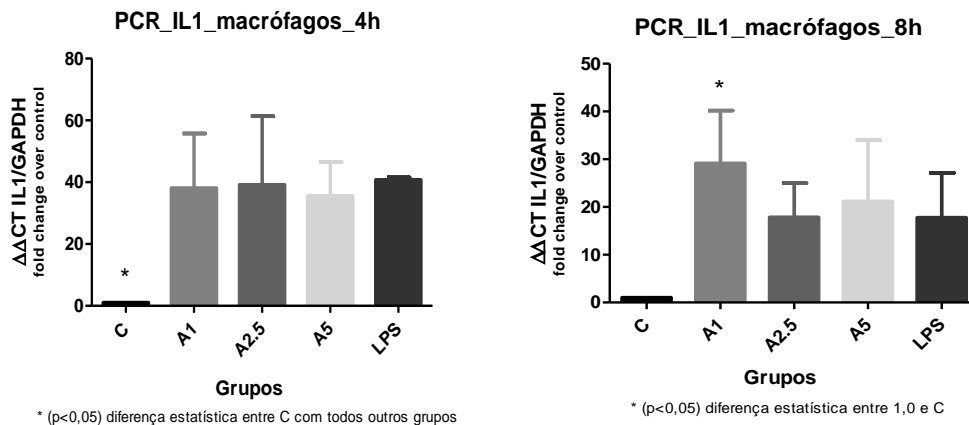
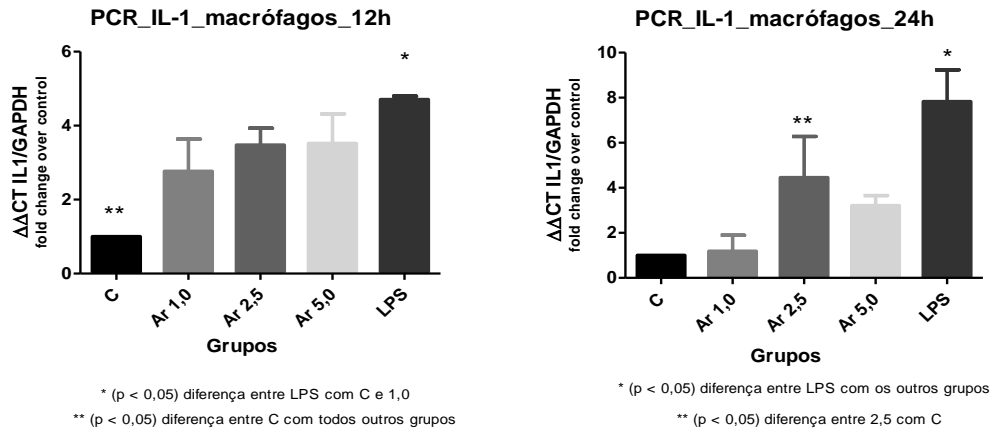
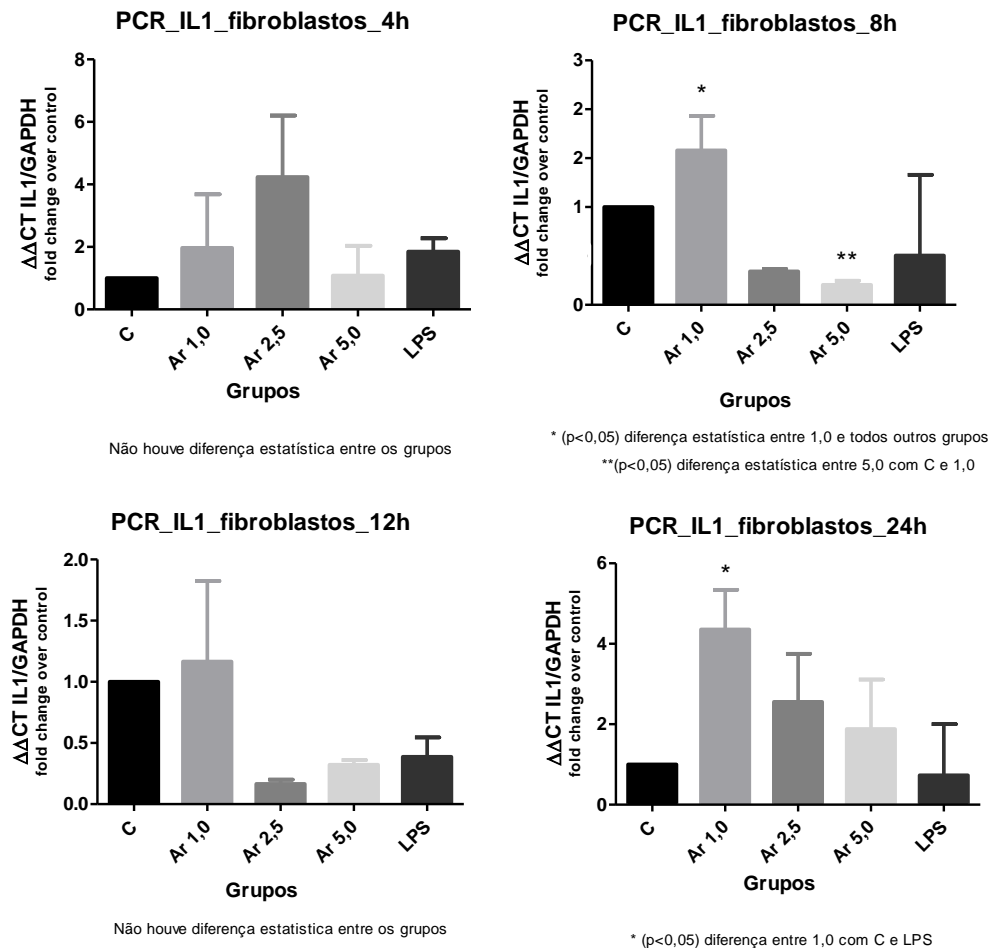


Figura 11 - Avaliação da expressão gênica de IL - 1 em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.



O resultado da expressão gênica de IL-1 pelos fibroblastos se destacou no período de 8h, da mesma maneira que os macrófagos, na dose de 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, não ocorreram grandes mudanças nos valores expressados, mantendo-se até o período de 24h (Figura 12). Não foram detectados níveis significativos de IL-1 secretado em nenhum dos grupos e períodos.

Figura 12 - Avaliação da expressão gênica de IL - 1 em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.



5.4 TGF- β

A Figura 13 apresenta o resultado da expressão gênica de TGF β em cultura primária de macrófagos de rato. Inicialmente, no período de 4h, observamos a dose de 2,5 μ g/ml promovendo maior expressão de TGF β , sendo que nos períodos subsequentes, ocorre predomínio de estímulo pela concentração de 1,0 μ g/ml. Além disso, observa-se uma tendência de estímulo no grupo de 2,5 μ g/ml para o período de 72h (Figura 14).

Figura 13 - Avaliação da expressão gênica de TGF β em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.

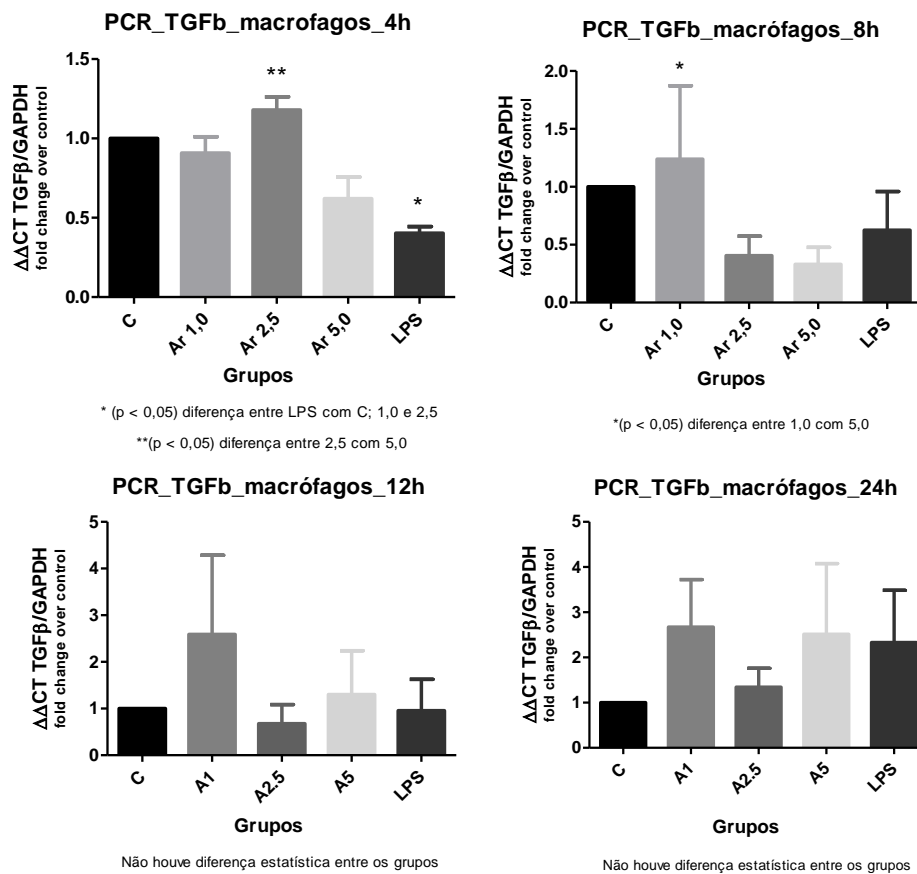
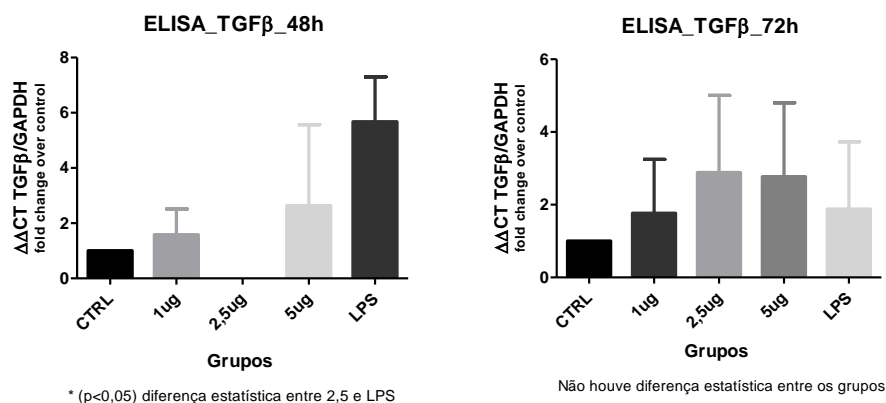


Figura 14 - Avaliação da secreção da proteína TGF β em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.



A expressão gênica para TGF β em cultura primária de fibroblastos de rato parece demonstrar uma tendência de melhor ação para o Artin M na dose de 5,0 μ g/ml no período de 4h e 12h e, para concentração de 2,5 μ g/ml nos períodos de 8 e 24h (Figura 15). A análise da expressão de proteína TGF β também aponta para maiores estímulos da célula na concentração de 2,5 μ g/ml, no período de 48h (Figura 16).

Figura 15 - Avaliação da expressão gênica de TGF β em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.

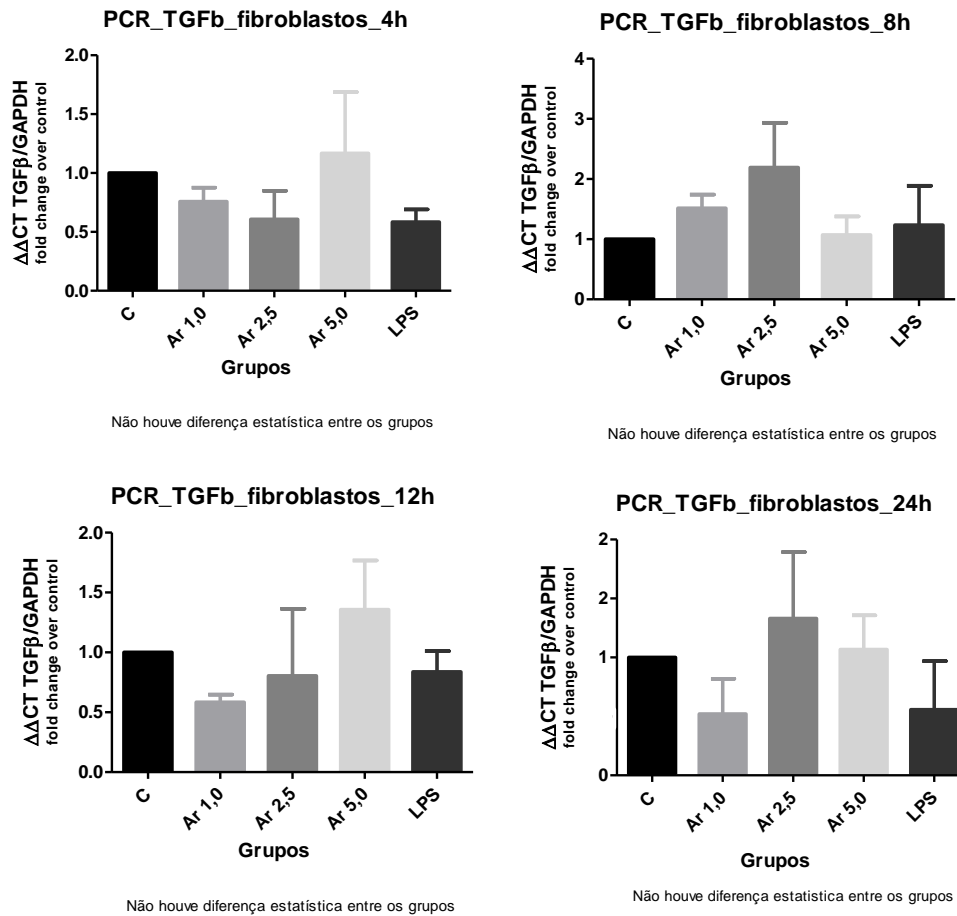
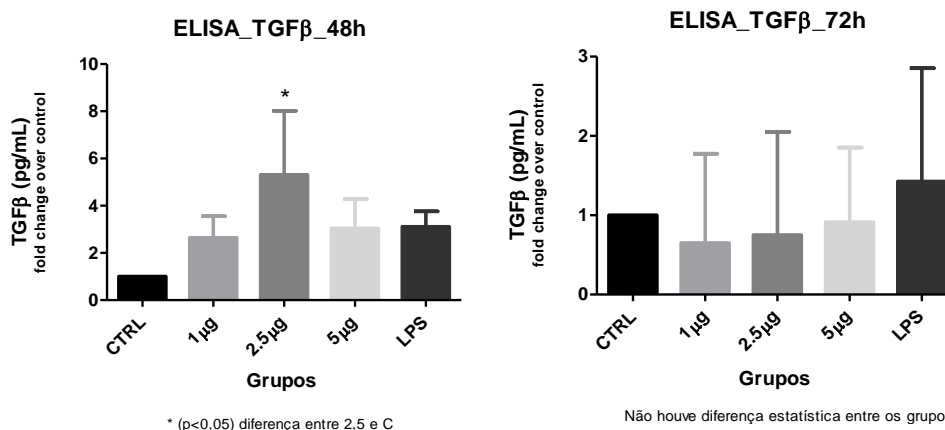


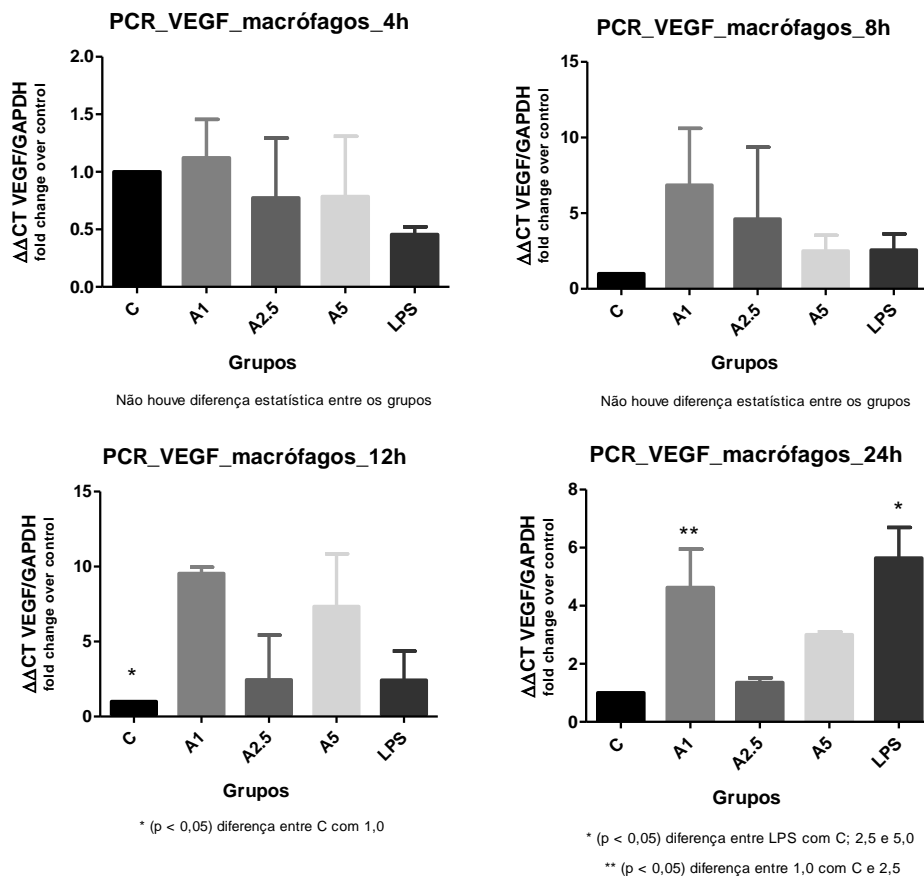
Figura 16 - Avaliação da secreção da proteína TGF β em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.



5.5 VEGF

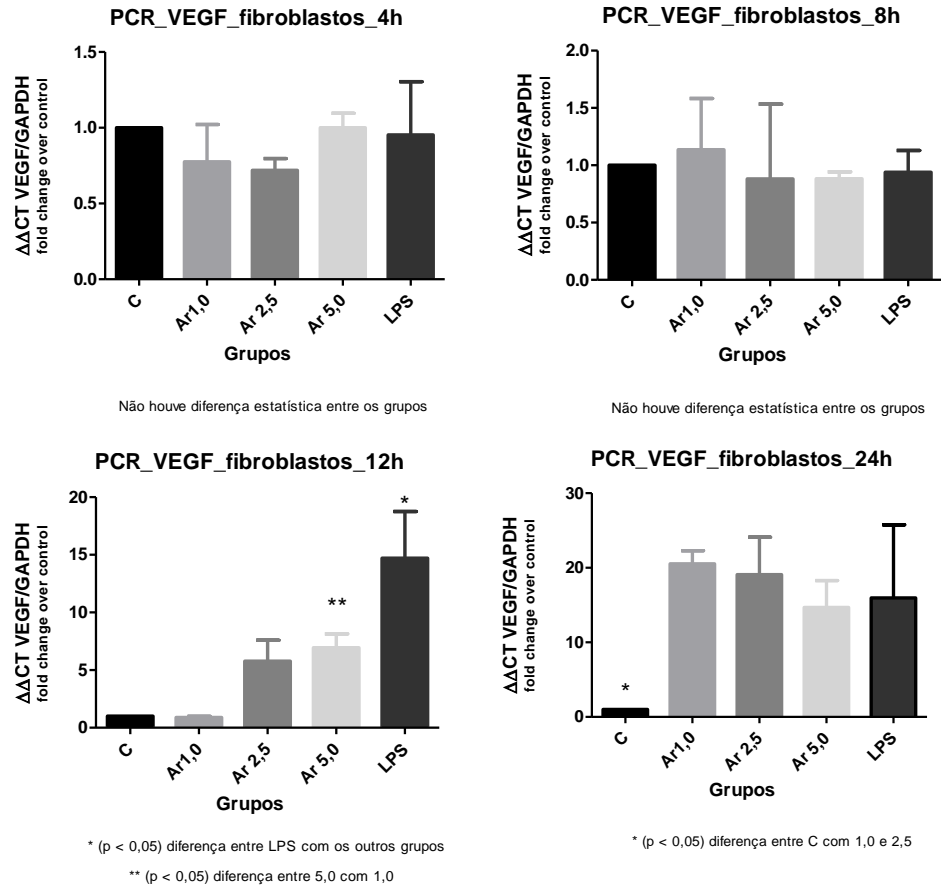
A Figura 17 apresenta o resultado da expressão gênica de VEGF em cultura primária de macrófagos de rato, demonstrando melhores expressões nos períodos de 12 e 24h para a dose de 1,0 μ g/ml. Não foram detectados níveis significativos de VEGF secretado em nenhum dos grupos e períodos.

Figura 17 - Avaliação da expressão gênica de VEGF em cultura primária de macrófagos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.



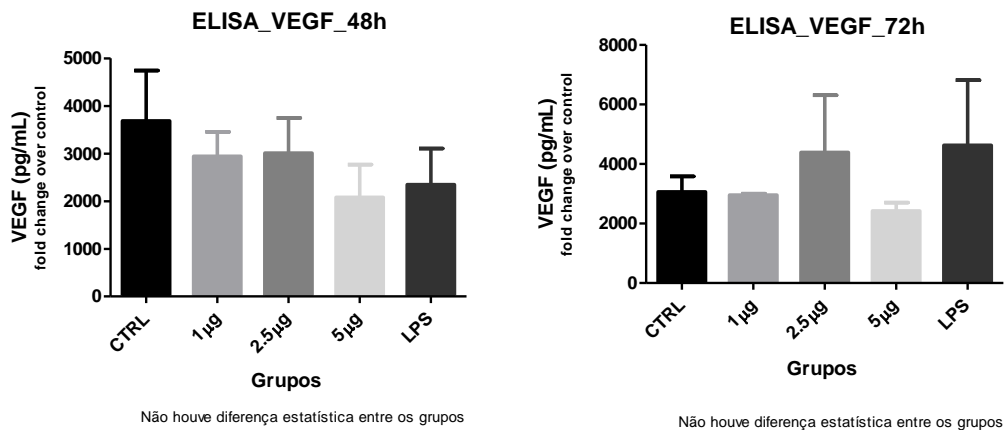
A expressão gênica de VEGF em cultura primária de fibroblastos de rato apresentou-se com valores crescentes a partir do período de 4h, exibindo certa tendência a melhores resultados no período de 24h, sugerindo a ação das concentrações de 1,0 μ g/ml e 2,5 μ g/ml (Figura18).

Figura 18 - Avaliação da expressão gênica de VEGF em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 4, 8, 12 e 24h.



Com relação à expressão da proteína VEGF pelos fibroblastos de cultura primária de rato, o período de 72h após o estímulo demonstrou melhor expressão para a dose de 1,0µg/ml (Figura19).

Figura 19 - Avaliação da secreção da proteína TGFβ em cultura primária de fibroblastos de rato, estimulados por Artin M para os períodos de 48h e 72h.





6 DISCUSSÃO

Atualmente, diversas técnicas cirúrgicas mucogengivais tem sido propostas e utilizadas para devolver saúde e estética periodontal e/ou peri-implantar aos pacientes odontológicos. Porém, muitos desses procedimentos envolvem a criação de feridas na mucosa dos sítios doadores de tecido, representadas pela interrupção da continuidade tecidual, ficando sujeitas a ação do processo complexo e dinâmico denominado reparação tecidual. Na cavidade oral, este processo pode sofrer a influência de diversos fatores, destacando-se a contaminação bacteriana e a ocorrência de traumas, que podem levar a intercorrências pós-operatórias indesejadas.

Durante o processo de reparação tecidual, as interações celulares entre fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células de defesa, como macrófagos e neutrófilos, e plaquetas ocorrem de forma coordenada, na tentativa de fechamento da ferida numa sequência de eventos programados (Barrientos et al.⁷, 2008). Estes eventos dependem de diversos mediadores celulares, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas envolvidos em uma complexa integração de sinais que coordenam esses processos. Dessa maneira, fica evidente a importância de estudos que interpretem essas interações celulares / moleculares e permitam o desenvolvimento de técnicas e / ou produtos que promovam uma cicatrização tecidual mais rápida e eficiente.

Diversos estudos têm sido realizados investigando a utilização de produtos naturais na reparação tecidual (Chahud et al.¹³, 2009; Ermertcan et al.²¹, 2009; Kim et al.³³, 2013; Martins et al.⁴⁰ 2008; Moreno et al.⁴², 2003; Nayak et al.⁴³, 2007; Shetty et al.⁶¹, 2006). A lectina Artin M tem demonstrado efeitos imunorreguladores (Pereira da Silva et al.⁵⁸, 2008), aceleração da reparação epitelial da córnea de coelho (Chahud et al.¹³, 2009) e na cicatrização e maturação do tecido de granulação em tecidos orais, além de aumento na proliferação de fibroblastos e nos níveis de VEGF e TGF β (Kim et al.³³, 2013). Baseado nesses estudos prévios, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da lectina Artin M na expressão e produção de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias relacionados ao processo de reparo tecidual em cultura primária de macrófagos e fibroblastos gengivais de ratos. Para tal estudo, realizamos a avaliação da expressão gênica desses fatores/citocinas nas células estudadas, bem como a produção protéica, por meio da quantificação da proteína secretada no meio de cultura.

O uso de cultura primária em estudos *in vitro*, embora tecnicamente mais complexo, possui a vantagens sobre as células de linhagem amplamente utilizadas. Marim et al.³⁹ (2010) ressalta em seus estudos que apesar da cultura primária apresentar multiplicação limitada, os macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) podem ser obtidos em grandes quantidades de apenas um animal e não sofrem alterações genéticas como nas células de linhagem. O fibroblasto é o elemento celular predominante no tecido conjuntivo gengival e apresenta importante participação no desenvolvimento, manutenção e reparo do tecido conjuntivo gengival (Fiorellini et al.²³, 2007). Além disso, os macrófagos desempenham papel fundamental na formação e remodelação do tecido gengival, fagocitose e recrutamento de novas células inflamatórias, presentes no sítio da lesão desde as primeiras horas até por semanas (Eming et al.²⁰, 2007; Li et al.³⁸, 2007).

Dentro desse processo da fase inicial de reparo, ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-1; IL-6 e TNF α que são expressas em grande quantidade na fase inflamatória do reparo (Barrientos et al.⁷, 2008) e fundamental para lesões em áreas contaminadas, como por exemplo, em lesões orais (Li et al.³⁸, 2007). Da mesma forma, os fatores de crescimento TGF β e VEGF além de participarem ativamente em diversos processos biológicos, organiza a fase de contração da ferida e realiza a modulação da angiogênese, respectivamente (Barrientos et al.⁷, 2008; Byrne et al.¹², 2005). Desta forma, no presente trabalho, direcionamos nossa investigação para a avaliação desse grupo de citocinas e fatores de crescimento.

Assim, a análise da expressão gênica e secreção proteica para os fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias avaliados demonstrou que, em geral, as concentrações de Artin M de 1,0 e 2,5 μ g/ml parecem ter melhor estimulado, tanto os macrófagos como os fibroblastos gengivais. Estudos anteriores também demonstraram que as baixas concentrações de Artin M são mais eficazes para o estímulo celular (Chahud et al.¹³, 2009; Kim et al.³³, 2013; Moreno et al.⁴², 2003).

Das citocinas pró-inflamatórias avaliadas, a expressão gênica de TNF α e IL-1 em ambos os tipos celulares foi estimulada nos grupos tratados com Artin M, em todos os períodos avaliados, apresentando resultados estatisticamente superiores ao grupo controle e, em geral, similares ao LPS, utilizado como controle positivo. Porém a detecção de proteína secretada no meio de cultura foi estatisticamente maior que no grupo controle, apenas para TNF α , nos macrófagos.

Nos estudos de Barrientos et al.⁷ (2008) foram observados que em baixos níveis, o TNF α promove o reparo da ferida por estimular indiretamente a inflamação e por aumentar a produção de fatores de crescimento pelos macrófagos. Já em altos níveis e por longo período, o TNF α parece ter um efeito negativo sobre a cicatrização, suprimindo a síntese de proteínas da MEC e TIMPs enquanto estimula a síntese de MMPs. Além disso, observaram que os níveis de IL-1 β são similares aos de TNF α e estes aparecem elevados na ferida crônica. A IL-1 é produzida por neutrófilos, monócitos, macrófagos e queratinócitos, além de estimular fibroblastos e a secreção de FGF-7 (Barrientos et al.⁷, 2008). No recente estudo in vitro de Ozeki et al.⁴⁷ (2013) a IL-1 β demonstrou induzir a produção de MMP3 em células da polpa dental de ratos, aumentando a proliferação celular.

Dentre os fatores de crescimento avaliados no presente estudo, o Artin M induziu, para ambas as células, um aumento na expressão gênica de VEGF, nos períodos tardios (12 e 24h), porém, este aumento não foi seguido por maior secreção proteica estatisticamente significativa, nos períodos avaliados. No entanto, uma tendência de maior secreção de VEGF pelos macrófagos pode ser observada, em ambos os períodos de análise, quando comparados os grupos estimulados com o grupo controle.

Diversos estudos (Bao et al.⁵, 2009; Barrientos et al.⁷, 2008; Clark¹⁴, 1989; Thomas et al.⁶⁵, 1995) relatam que o VEGF liberado por plaquetas e macrófagos, é o principal estimulador na proliferação endotelial, participa do processo de angiogênese, assim como na deposição de colágeno e epitelização, atuando em queratinócitos e fibroblastos. O fato de não termos detectado maior secreção de VEGF em macrófagos e fibroblastos no presente estudo pode estar relacionado ao seu período de produção nas fases finais da reparação, sugerindo que os períodos analisados (48 e 72h) possam ter sido precoces para sua detecção.

Já para o TGF β , não conseguimos comprovar expressão gênica aumentada em relação ao grupo controle, em nenhum dos períodos avaliados. No entanto, a presença deste fator no meio de cultura foi significativamente maior após 72h, no grupo tratado com Artin 2,5 μ g/ml que no grupo controle. O TGF β está envolvido em inúmeros processos durante o processo de cicatrização da ferida: fase inflamatória, angiogênese, proliferação dos fibroblastos, síntese de colágeno e remodelação da MEC, sugerindo até o seu envolvimento na formação de cicatrizes hipertróficas (Penn et al.⁵⁰, 2012; Schmid et al.⁶⁰, 1998).

Diversos fatores podem justificar a falta de uma relação direta entre o aumento da expressão gênica e a secreção protéica no meio de cultura, ocorrido no presente estudo para as citocinas IL1(ambas as células), TNF (fibroblastos) e VEGF (ambas as células). A informação genética de qualquer célula é estocada em seu DNA contido no núcleo. O RNA é sintetizado a partir de uma fita molde de DNA (processo de transcrição) dando origem ao RNA mensageiro (mRNA) que é transportado do núcleo para o citoplasma, onde a sequência de RNA é decodificada (processo de tradução) para uma determinada sequência de aminoácidos (Nussbaum et al.⁴⁵, 2002).

Existem alguns elementos reguladores desses processos, conhecidos como fatores de transcrição que podem interferir no transporte e manutenção do mRNA e conseqüentemente impedir a tradução. Mais recentemente, diversos estudos tem sua atenção para uma classe especial de reguladores transcricionais denominados microRNA (miRNA). Várias pesquisas tem avaliado a possibilidade dos miRNA exercerem papel na patogênese de várias doenças (Jinnin³², 2014). O processo de reparo tecidual envolve mudanças na expressão de miRNAs específicos em determinadas fases do reparo, o que pode justificar a supressão da expressão proteica dessas citocinas e fatores de crescimento relacionadas ao processo de reparo (Shilo et al.⁶², 2007). De acordo com Jinnin³² (2014) os miRNAs podem afetar atividades celulares in vitro, incluindo proliferação e desenvolvimento e, causar alterações na resposta imune in vivo.

No presente estudo, destacamos um aumento na secreção proteica de TGF β (pelos fibroblastos) e uma tendência de maior secreção de IL-6 (pelos macrófagos). Estes resultados corroboram com os achados dos estudos in vivo de Kim et al.³³ (2013) durante o reparo tecidual da mucosa palatina de ratos, na qual houve maior expressão para TGF β no período de 48h após o estímulo, na concentração de 2,5 μ g/ml, assim como observado em cultura primária de fibroblastos gengivais²². Da mesma maneira, segundo estudos de Diegelmann, Evans¹⁷ (2004) os macrófagos em repouso produzem baixos níveis de mediadores pró-inflamatórios e, quando expostos a citocinas, interferons ou LPS bacteriano adquirem o fenótipo “ativado”, responsável pela produção de grande quantidade de IL-1, IL-6, IL-12 e TNF α , confirmando a tendência de secreção proteica de IL-6.

O mecanismo de ação do Artin M nos fibroblastos e macrófagos parece melhor estabelecido. In vitro a lectina Artin M mostrou estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que estão envolvidas do processo de reparação e que se mostraram presentes nos estudos in vivo. Assim, tentamos estabelecer uma relação entre os

experimentos a fim de melhor elucidarmos o papel do Artin M e definirmos sua melhor concentração, que promova estímulos celulares de interesse na Odontologia.

De acordo com os resultados obtidos, o Artin M mostrou melhores estímulos em macrófagos e nos fibroblastos em menores concentrações (1,0 e 2,5µg/ml) verificados pela expressão gênica e proteica.

Apesar de resultados favoráveis obtidos até o momento, o organismo humano é um complexo e organizado sistema na qual a influência de determinada substância em uma célula isolada em estudos in vitro não é capaz de reproduzir seu efeito como um todo. O uso do Artin M como forma de tratamento ainda deve ser discutido e pesquisado, em busca da concentração ideal, forma de aplicação e identificação de efeitos benéficos ou adversos.



7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que o Artin M estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento relevantes no processo de reparação tecidual em culturas primárias de macrófagos (TNF- α , IL-6) e fibroblastos gengivais (TGF β e IL-6) de ratos.



Referências

REFERÊNCIAS*

1. Adolphe C, Wainwright B. Pathways to improving skin regeneration. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7(20):1-14.
2. Alves-Rezende MC, Okamoto T. Effects of fibrin adhesive material (Tissucol) on alveolar healing in rats under stress. *Braz Dent J.* 1997; 8(1):13-9.
3. Anusaksathien O, Webb SA, Jin QM, Giannobile WV. Platelet-derived growth factor gene delivery stimulates ex vivo gingival repair. *Tissue Eng.* 2003; 9(4):745-56.
4. Banerjee J, Chan YC, Sen CK. MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol Genomics.* 2011; 43(10):543-56.
5. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res.* 2009; 153(2): 347-58.
6. Bartolucci EG, Prato GP. Preliminary observations on the use of a biologic sealing system (Tissucol) in periodontal surgery. *J Periodontol.* 1982; 53(12):731-5.
7. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5):585-601.
8. Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5(1):1-22.
9. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 1999; 115(1):176-82.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

10. Blanes L. Tratamiento de feridas. In: Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado [Internet]. 2004 [acesso em 2013 Mai 22]. Disponível em: <http://www.bapbaptista.com>
11. Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(6):767-79.
12. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmeij JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005; 9(4):777-94.
13. Chahud F, Ramalho LN, Ramalho FS, Haddad A, Roque-Barreira MC. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90(2):166-73.
14. Clark RA. Wound repair. *Curr Opin Cell Biol.* 1989; 1(5):1000-8.
15. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, Goldman MH, et al. Therapeutic administration of KM_ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via Interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol.* 2008; 173(2):423-32. doi: 10.2353/ajpath.2008.080126.
16. Devalaraja RM, Nanney LB, Quian Q, Du J, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(2):234-44.
17. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004; 9:283-9.
18. Dogan A, Taner L, Oygur T, Balos K. Effects of fibrin adhesive material (Tissucol) application on furcation defects in dogs. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1992; 34(1):34-41.
19. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem.* 2007; 42(3):115-70.
20. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(3):514-25.
21. Ermertcan AT, Inan S, Ozturkcan S, Bilac C, Cilaker S. Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopathological study. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5):674-81.
22. Farahani RM, Kloth LC. The hypothesis of 'biophysical matrix contraction': wound contraction revisited. *Int Wound J.* 2008; 5(3):477-82.
23. Fiorellini JP, Kim DM, Ishikawa SO. A gengiva. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. Carranza periodontia clínica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
24. Giannoudis PV, Pountos I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury.* 2005; 36 Suppl 4:S2-5.

25. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(6):1334-47.
26. Goren I, Allmann N, Yogev N, Schurmann C, Linke A, Holdener M, et al. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol.* 2009; 175(1):132-47.
27. Hall WB, Lundergan WP. Free gingival grafts. Current indications and techniques. *Dent Clin North Am.* 1993; 37(2):227-42.
28. Hom DB, Thatcher G, Tibesar R. Growth factor therapy to improve soft tissue healing. *Facial Plast Surg.* 2002; 18(1):41-52.
29. Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(14):1873-80.
30. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: an overview. *Am J Surg.* 2001; 182(2 Suppl):1S-7S.
31. Jackson MR. New and potential uses of fibrin sealants as an adjunct to surgical hemostasis. *Am J Surg.* 2001; 182(2 Suppl):36S-39S.
32. Jinnin M. Various applications of microRNAs in skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2014; 74(1):3-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.01.004>.
33. Kim YJ, Carvalho FC, Souza JA, Gonçalves PCG, Spolidório LC, Roque-Barreira MCA, et al. Lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa through stimulation of TGF- β and VEGF expression. *Wound Repair Regen.* 2013; 21(3):456-63.
34. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13(1):e23. doi: 10.1017/S1462399411001943.
35. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Reparo tecidual: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins patologia básica.* 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.63-85.
36. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol.* 1985; 56(12):715-20.
37. Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5(23):1-39
38. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25(1):9-18.
39. Marim FM, Silveira TN, Lima Jr. DS, Zamboni DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS ONE.* 2010; 5(12): e15263 doi:10.1371/journal.pone.0015263

40. Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MAT, Pavesi VCS, Mesquita-Ferrari RA, et al. Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. *Phytother Res*. 2009; 23(2):274-8.
41. Menke MN, Menke NB, Boardman CH, Diegelmann RF. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. *Gynecol Oncol*. 2008; 111(2 Suppl):S87-91.
42. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003; 132(3):221-30.
43. Nayak BS, Isitor GN, Maxwell A, Bhogadi V, Ramdath DD. Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. *J Wound Care*. 2007; 16(2):83-6.
44. Novaes AB, Jr., Novaes AB. Soft tissue management for primary closure in guided bone regeneration: surgical technique and case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12(1):84-7.
45. Nussbaum RL, Mc Innes RR, Willard HF. *Genética médica*. 6ª ed. Filadélfia: Thompson & Thompson; 2002.
46. Oda Y, Kagami H, Ueda M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62(1):73-80.
47. Ozeki N, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Nakata K, Mogi M, Nakamura H. IL-1 β induced matrixmetalloproteinase-3 regulates cell proliferation in rat dental pulp cells. *Oral Dis*. 2013 Dec 12 [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/odi.12219.
48. Pakar MH, Kuru L, Giouzeleli M, Olsen I. Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. *Arch Oral Biol*. 2001; 46(3):275-84.
49. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology*. 2001; 11(12):1035-42.
50. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma*. 2012; 2(1):18-28.
51. Pereira-da-Silva G, Moreno NA, Marques F, Oliver C, Jamur MC, Panunto-Castelo A, et al. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760(1): 86-94.
52. Pereira-da-Silva G, Roque-Barreira MC, Van Damme EJ, Artin M. A rational substitution for the names artocarpin and KM+. *Immunol Lett*. 2008; 119(1-2):114-5.
53. Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EAD, et al. Wound-healing defect of CD18 $^{-/-}$ mice due to a decrease in TGF- β 1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J*. 2005; 24(19): 3400-10.

54. Peumans WJ, Van Damme EJ, Barre A, Rouge P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491(1):27-54.
55. Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O'Quinn M, Yost MJ, Gourdie RG. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends Biotechnol.* 2008; 26(4):173-80.
56. Rosa JC, de Oliveira PSL, Garratt R, Beltramini L, Resing K, Roque-Barreira MC, et al. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci.* 1999; 8(1):13-24.
57. Rutnan ZJ, Wight TN, Yang BB. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol.* 2013; 32(2):74-85.
58. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, Beltramini LM, Roque-Barreira MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol.* 1994; 153(4):1798-807.
59. Saroff SA, Chasens AI, Eisen SF, Levey SH. Free soft tissue autografts. Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation. *J Periodontol.* 1982; 53(7):425-8.
60. Schmid P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type 1 and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol.* 1998; 152(2):485-93.
61. Shetty BS, Udupa SL, Udupa AL, Somayaji SN. Effect of *Centella asiatica L* (Umbelliferae) on Normal and Dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar Albino rats. *Int J Low Extrem Wounds.* 2006; 5(3):137-43.
62. Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. MicroRNA in cutaneous wound healing: a new paradigm. *DNA Cell Biol.* 2007; 26(4):227-37.
63. Silva LLP da, de Molfetta-Machado JB, Panunto-Castelo A, Denecke J, Goldman GH, Roque-Barreira MC, et al. cDNA cloning and functional expression of KM+, the mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1726(3):251-60.
64. Silva-Lucca RA, Tabak M, Nascimento OR, Roque-Barreira MC, Beltramini LM. Structural and thermodynamic studies of KM+, a d-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biophys Chem.* 1999; 79(2):81-93.
65. Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53(4):442-7.
66. Toledo KA, Scwartz C, Oliveira AF, Conrado MC, Bernardes ES, Fernandes LC, et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett.* 2009; 123(1):14-20.

67. Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(2):203-24.
68. Tramontina VA, Machado MA, Nogueira Filho G da R, Kim SH, Vizzioli MR, Toledo S. Effect of bismuth subgallate (local hemostatic agent) on wound healing in rats. Histological and histometric findings. *Braz Dent J.* 2002; 13(1):11-6.
69. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet.* 2006; 38(3):356–62.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 4/2013

Araraquara, 14 de junho de 2013.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado *"AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA ARTIN M NA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS RELACIONADAS AO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL. ESTUDO IN VITRO EM MACRÓFAGOS E FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE RATOS"* (Proc. CEUA nº 4/2013) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MAIO/2014.

Atenciosamente.

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
DD. Pesquisador Responsável
a/c – Fernanda Florian
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 20 de Março de 2014.

FERNANDA FLORIAN