

RAFAEL SIMÕES GONÇALVES

**Efeito da trombina sobre a produção TGF- β e TNF- α por
células-tronco mesenquimais originadas da medula
óssea de cão**

ARAÇATUBA – SP

2011

RAFAEL SIMÕES GONÇALVES

**Efeito da trombina sobre a produção TGF- β e TNF- α por
células-tronco mesenquimais originadas da medula
óssea de cão**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Helena
Penha de Oliveira

ARAÇATUBA – SP

2011

Dedicatória

A Deus.

Aos meus pais, Jorge Luiz Gonçalves e Maria Luiza Simões Gonçalves, por esta oportunidade de estar realizando um sonho. Pois vocês que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir nesta jornada, fossem quais fossem os obstáculos; a vocês que, mesmo ocupados, mantiveram-se sempre ao meu lado, dedico a minha vitória, com a mais profunda gratidão e respeito.

Agradecimento

A Divindade, acima de tudo, que permitiu que eu trilhasse o caminho por mim escolhido;

À Prof.^a Dr.^a. Sandra Helena Penha de Oliveira por me orientar, pela paciência, compreensão, confiança que depositou em mim e pelos ensinamentos científicos, filosóficos e as lições de vida;

A Prof.^a Dr.^a. Suely Regina Mogami Bomfim, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba por ter dedicado seu tempo e ter nos ajudado com as coletas das células tronco da medula óssea dos cães;

Ao pós graduando Renato Colenci, por sua paciência e dedicação com o experimento, me auxiliou em todos os cuidados que deveria ter com as culturas celular para prosseguir com ótimos resultados;

Aos colegas de laboratório pelo incentivo sempre presente e pelo ombro sempre disponível, os quais dedicaram várias tardes de seus afazeres para me auxiliar, sempre demonstrando muito carinho, respeito e atenção às minhas dúvidas;

A todos do Departamento de Ciências Básica pela receptividade por todos esses anos que estive presente;

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

...quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.

GONÇALVES, R. S. **Efeito da trombina sobre a produção TGF- β e TNF- α por células-tronco mesenquimais originadas da medula óssea de cão.** 2011. 33f. Tese de conclusão de curso (graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

A trombina, de acordo com a literatura, tem um importante papel na capacidade de estimular o crescimento dos fibroblastos, aumentar a síntese de colágeno, na cicatrização inicial da ferida do periodonto sendo importante na modulação da resposta de cura, dentre outras funções. Como observado anteriormente em estudo do laboratório a trombina associada ao plasma rico em plaqueta (PRP) auxiliou no reparo tecidual após o reimplante dentário. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, o papel da trombina sobre a produção de TGF- β e TNF- α por células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cães. As células-tronco foram obtidas de cães adultos jovens, sem raça definida, com idade aproximada de 1 ano, sendo que o material da medula óssea foi obtido por aspiração na região da crista do osso ilíaco dos cães. As células-tronco mesenquimais foram separadas pelo método de purificação utilizando-se Ficoll-PaqueTM Plus. Posteriormente as células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modificado por Eagle (D-MEM) para a expansão das células. Após a terceira passagem, as células foram plaqueadas e estimuladas com trombina nas concentrações de 5, 10 e 50 U/mL. Após 6, 24 e 48 horas, a produção de TGF- β e de TNF- α foram avaliadas por ELISA. Para análise estatística utilizamos o teste ANOVA one-way test com correção de Bonferroni para determinar a significância da diferença entre os grupos do mesmo ensaio. Observamos que a produção de TNF- α foi estatisticamente significativa quando as CTM foram estimulada por 10 U/mL de trombina 24 horas após. Em relação ao TGF- β por CTM, observamos uma produção significativa de TGF- β quando estimuladas por 50 U/mL de trombina 6, 24 e 48 horas após. Concluímos que a trombina é um importante fator capaz de estimular as CTM induzindo a produção de TGF- β e TNF- α possivelmente favorecendo o reparo tecidual.

Palavras-chave: Célula-tronco, Trombina, TNF- α , TGF- β .

GONÇALVES, R. S **The effect of Thrombin upon the TGF- β and TNF- α production by mesenchymal stem cells from bone marrow of dog.** 2011. 33f. Tese de conclusão de curso (graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

According to the literature, thrombin, has an important role in the ability to stimulate the fibroblasts growth, increase the collagen synthesis, in the periodontal initial wound healing, being important in the modulation of healing response and others functions. As noted previously in the laboratory study, thrombin associated with platelet-rich plasma (PRP) helped in tissue repair after tooth replantation. The aim of this study was evaluate the role of thrombin in the production of TGF- β and TNF- α by mesenchymal stem cells from bone marrow of dogs. Stem cells were obtained by aspiration of the bone marrow from the iliac crest of undefined breed young adult dogs around one year old. Mesenchymal stem cells were separated by purification using Ficoll-PaqueTM Plus. Following, the cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's Medium (D-MEM), in order to allow cell proliferation. After the third passage, cells were plated and stimulated with thrombin at concentrations of 5, 10 e 50 U/mL. After 6, 24 and 48 hours, the TGF- β and TNF- α production were evaluated by ELISA. Data were analyzed by ANOVA one-way test with Bonferoni correction to determine the significance of the differences among the groups. We noted that thrombin-stimulated mesenchymal stem cells to produce TNF- α . The production was statistically significant when stimulated by 10 U/mL of thrombin evaluated 24 hours after. In relation of TGF- β production by mesenchymal stem cells, we noted significant production of TGF- β when stimulated by 50 U/mL of thrombin at 6, 24 and 48 hours after. We conclude that thrombin is an important stimulus to the mesenchymal stem cells inducing TGF- β and TNF- α production possibly favoring the tissue repair.

Key words: Stem-cell, Thrombin, TNF- α , TGF- β .

Lista de Figuras

Figura 1 - Diagrama e foto ilustrando a punção ilíaca realizada para obtenção das células-tronco da medula óssea.	15
Figura 2 - Separação das células por centrifugação utilizando Ficoll-Paque™.	16
Figura 3 - <i>Pellet</i> de células formado após a última centrifugação.	17
Figura 4: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 3 dias de cultura. Aumento de 3x.	17
Figura 5: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 8 dias de cultura. Aumento de 10x.	18
Figura 6: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 11 dias de cultura. Aumento de 4x.	18
Figura 7: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 11 dias de cultura. Aumento de 10x.	19
Figura8 : fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 11 dias de cultura. Aumento de 20x.	19
Figura 9: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 15 dias de cultura. Aumento de 4x.	20
Figura 10: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 16 dias de cultura. Aumento de 10x.	20
Figura 11: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 16 dias de cultura. Aumento de 20x.	21
Figura 12: Produção de TNF- α pelas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cão estimuladas por trombina. As células foram estimuladas por trombina nas concentrações de 5, 10 e 50 U/mL e avaliadas 6,	23

24 e 48 horas após. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de um único experimento com amostras em triplicatas.

Figura 13: Curva padrão logarítmica da dosagem da proteína TNF- α de cão. 24

Figura 14: Produção de TGF- β pelas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cão estimuladas por trombina. As células foram estimuladas por trombina nas concentrações de 5, 10 e 50 U/mL e avaliadas 6, 24 e 48 horas após. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de um único experimento com amostras em triplicatas. * $p < 0.001$ (ANOVA One-way following Bonferoni test). 25

Sumário

1.	Introdução e Justificativa	10
2.	Objetivos específicos	14
3.	Materiais e Métodos	15
	3.1- modelo animal	15
	3.2- coleta do material da medula de cão	15
	3.3- separação e cultura das células-tronco derivadas da medula óssea de cão	16
	3.4- estímulo das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cães	21
	3.5- avaliação da produção de TNF- α e TGF- β por células-tronco da medula óssea de cães estimuladas por trombina.	21
	3.6- análise estatística	22
4.	Resultados	23
	4.1- produção de TNF- α pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea de cão estimuladas por trombina	23
	4.2- produção de TGF- β pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea de cão estimuladas por trombina	24
5.	Discussão	26
6.	Conclusão	28
7.	Referências Bibliográficas	29
8.	Anexo – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	33

1. Introdução e Justificativa

Avanços na área de biologia molecular e celular têm contribuído para o desenvolvimento de técnicas de reparação ou, até mesmo, de regeneração de órgãos e tecidos injuriados por doenças, traumas e deformidades congênitas.

Langer e Vacanti (1993) foram os pioneiros a descrever o conceito de engenharia tecidual como sendo um campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia, biologia e ciências clínicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam manter, restaurar, ou até melhorar a função de órgão e tecidos. Essa nova ciência está alicerçada sobre três pilares: células, matrizes biocompatíveis e moléculas bioativas responsáveis pelo sinal morfogênicos.

As células-tronco ou *stem cells*, são definidas como células com baixo grau de diferenciação, que possuem a capacidade de se auto-reproduzirem, bem como gerar células diferenciadas de tipos especializados de tecidos. Estudos mostram que o número de tecidos com potencial regenerador tem aumentado significativamente devido, em grande parte, ao progresso da biologia das células-tronco (BIANCO, ROBEY, 2001). Muitos tecidos adultos, além das células-tronco de origem embrionária, também possuem populações destas células com capacidade de regeneração após trauma, doença ou envelhecimento. Sendo assim a medula óssea, além de ser o maior reservatório de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) que renovam continuamente os elementos sanguíneos circulantes, apresenta também células-tronco mesenquimais (CTM) (PITTENGER *et al.*, 1999).

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes com uma população de células heterogênea que prolifera como células aderentes ao plástico *in vitro*, tem morfologia fibroblasto-like, forma colônias e pode se diferenciar em osso, cartilagem e tecido adiposo (HORWITZ *et al.*, 2005). O imunofenótipo dessas células são CD45⁻, CD34⁻, CD13⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD166⁺, CD80⁻, CD86⁻, HLA Classe I^{baixo}, HLA classe II⁻, distinguindo das células-tronco hematopoiéticas que são CD34⁺, CD45⁺ e CD13⁻ (HOOGDUIJN *et al.*, 2010). As estratégias terapêuticas destas células são baseadas na suposição de que, em um tecido específico e em resposta a sinais moleculares, podem transformar-se no tecido de origem (RISBUD, SHAPIRO, 2005). Segundo PANG *et al.* (2004), condições especiais são

necessárias para o cultivo das CTM derivadas da medula óssea. Assim sendo, a engenharia tecidual depende de três fatores importantes, fonte celular, matriz (“scaffolds”), ou seja, o material que irá atuar como um arcabouço para as células (o crescimento de células em substratos específicos), além dos fatores de indução para o crescimento celular. (LAVIK *et al.*, 2004). As células-tronco mesenquimais são capazes de secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Essas células secretam constitutivamente uma grande quantidade de citocinas IL-6 e IL-8 e a quimiocina CCL2 (UCCELLI *et al.*, 2008). No entanto, o potencial terapêutico dessas células após estimulação necessita ser mais bem investigado.

Nos últimos anos, a odontologia passou a explorar o potencial da engenharia tecidual na reparação e regeneração de estruturas dentais (CASSAGRANDE, 2008), já que o traumatismo dentário é uma situação frequente nos consultórios odontológicos. Traumatismo dentoalveolar envolve três estruturas básicas: dentes, porção alveolares e tecidos moles adjacentes (DALE, 2000).

Estudos realizados em nosso laboratório com o objetivo de avaliar o efeito do PPP, do PRP ativado ou não por trombina ou de células-tronco mononucleares originadas da medula óssea (CTMC) de cães sobre a reconstrução do ligamento periodontal após reimplantes dentários seguido do traumatismo demonstraram que o grupo dos animais que receberam o reimplante na presença do PRP ativado por trombina não apresentaram evidências de reabsorção por substituição diferentemente dos outros grupos. No entanto, o grupo dos animais que receberam o reimplante dentário associado a CTMC com PRP ativado por trombina também apresentam a reconstituição do ligamento periodontal sem observação de reabsorção por substituição. Ainda observou-se a presença de feixes de fibras colágenas organizadas, resultando em reparo com a formação do ligamento periodontal (ASSUNÇÃO *et al.*, 2010). Os achados iniciais desse estudo sugerem que o uso da trombina no preparo do PRP pode desempenhar um importante papel na regeneração dos tecidos após reimplante dentário. No entanto, o mecanismo pelo qual a trombina desempenha esta função ainda não foi totalmente esclarecido.

A trombina é um polipeptídeo plasmático, com peso molecular de 33700UI formado a partir da ativação de fatores ativadores da cascata de coagulação Xa e Va formando um complexo que é responsável pela conversão da protrombina em

trombina. Isso acontece quando o tecido é lesado (ALTIERI, 1993). A trombina formada funciona como uma serino-protease que pode ativar a cascata de coagulação e induzir a formação de redes da matriz de fibrina e conseqüente a formação de coágulos sanguíneos. Sendo assim, a trombina está relacionada com as seguintes funções: pode decompor o fibrinogênio em fibrina, ativar a agregação plaquetária e estimular a coagulação do sangue em um defeito da ferida. A trombina induzindo uma rede de fibrina pode, portanto, fornecer um bom substrato para a migração, o apego e o crescimento das células do ligamento periodontal adjacente (PDL) (POLSON e PROVE, 1983). Clinicamente, se o coágulo sanguíneo em um defeito da ferida é estável e é mais tarde substituído por células derivadas do PDL ou gengiva, há reparo e regeneração de novo cemento, PDL e fixação fibrosa será atingível (WIKESJO *et al.*, 1992; TATAKIS, 1992). Além das propriedades biológicas descritas acima, a trombina também pode estimular a proliferação de células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos (DAWES *et al.*, 1993; HERBERT *et al.* 1994; BERK *et al.*, 1991; CHANG *et al.*, 1998a). CHAN *et al.* (1998b) investigaram, *in vitro*, o efeito da trombina no comportamento de células derivadas do ligamento periodontal (LP), procurando também melhor elucidar o papel dessa substância no processo de reparo do tecido periodontal. A função da trombina foi analisada quanto ao crescimento das células do LP, adesão dos fibroblastos do LP à fibronectina e colágeno tipo I, produção da fosfatase alcalina e morfologia dos fibroblastos do LP. Foi observado que a trombina foi capaz de estimular o crescimento dos fibroblastos, aumentar a síntese de colágeno e causar significantes alterações morfológicas nessas células, provocando uma maior união entre as células, alterações na orientação das fibras e aumento do espaço intercelular. CHEN e BUCHANAN (1975) já haviam observado o efeito da trombina em fibroblastos através do aumento na proliferação e migração dessas células. Esses resultados foram confirmados por DAWES *et al.* (1993), onde observaram que a trombina causa a quimiotaxia de fibroblastos e conseqüente migração celular na mesma dosagem que o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A presença de receptores para a trombina em células do ligamento periodontal foi demonstrada no estudo de CHAN *et al.* (1998). Contudo, poucos estudos têm investigado diretamente os efeitos da trombina sobre o metabolismo e o comportamento dos

fibroblastos do PDL e mesmo sobre células-tronco. Dessa forma, nosso objetivo será avaliar, *in vitro*, a produção de TGF- β e de TNF- α pelas células-tronco mesenquimais originárias da medula óssea de cães estimulados por trombina, uma vez, como já apresentado, estudos realizados em nossos laboratórios mostraram resultados mais satisfatórios para a indução do reparo tecidual quando as CTMC foram estimuladas com plasma rico em plaquetas ativados por trombina. No entanto, o papel direto da trombina sobre a ativação e/ou estimulação das células-tronco mesenquimais serão objeto de nosso estudo.

2. Objetivos específicos

2.1 - Avaliar a produção de TGF- β por CTMC estimuladas por trombina e,

2.2 - Avaliar a produção de TNF- α por CTMC estimuladas por trombina.

3. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado no setor de inflamação do laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. Parte deste estudo está relacionado ao projeto de iniciação científica com bolsa FAPESP.

3.1 - Modelo animal

Foram utilizados cães adultos jovens, sem raça definida, com idade aproximada de 1 ano. Durante todo o período experimental, foram mantidos no canil da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – campus de Araçatuba, SP, observando-se os cuidados diários de manipulação, limpeza e alimentação realizadas por pessoal treinado.

3.2 - Coleta do material da medula óssea de cão

Os animais foram sedados para a coleta de material da medula óssea com 0,05 mL/Kg de Xilazina e 0,02 mL/Kg de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam. Em cada cão, foi aspirado 1 mL de material retirado da medula óssea da crista do osso íliaco, utilizando seringa de polietileno de 20 mL. Este material foi etiquetado com o número do respectivo animal doador.

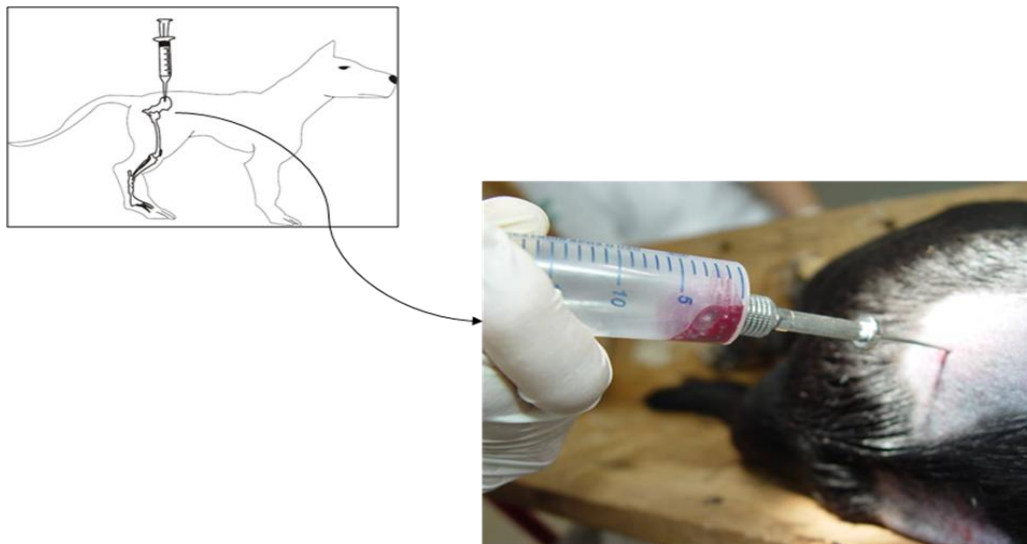


Figura 1 - Diagrama e foto ilustrando a punção ilíaca realizada para obtenção das células-tronco da medula óssea.

3.3 - Separação e cultura das células-tronco derivadas da medula óssea de cão

O material coletado da medula óssea de cão sob condições de assepsia foi coletado da crista ilíaca do cão e misturado com solução salina (0,9%) na proporção 1:1, sendo posteriormente transferido para um tubo de 50ml contendo 15ml de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences) e submetido à centrifugação inicial a 400g/20°C, por 30min. Passada a primeira etapa, a camada mononuclear obtida na centrifugação inicial foi coletada e colocada em um novo tubo, no qual foram acrescidas soluções de Tampão de Lise de hemáceas e salina na proporção 1/1. Após, seguir-se-á mais uma centrifugação por 450g/20°C por 5min, sendo que o sobrenadante resultante desta centrifugação foi descartado. O pellet formado foi, então, ressuspenso no meio de Dulbecco's modificado por Eagle (D-MEM), sendo mantido em incubadora à 37°C/ 5% CO₂.

Após a terceira passagem, as células mesenquimais indiferenciadas foram plaqueadas e estimuladas por trombina.

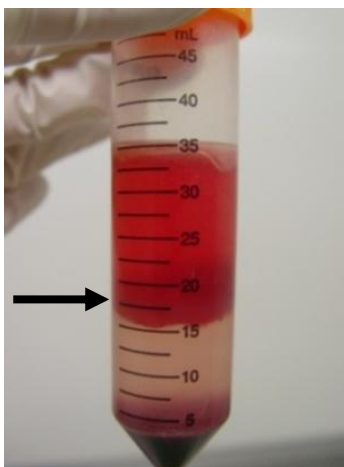


Figura 2 - Separação das células por centrifugação utilizando Ficoll-Paque™. A seta indica a camada das células mononucleares (células-tronco).

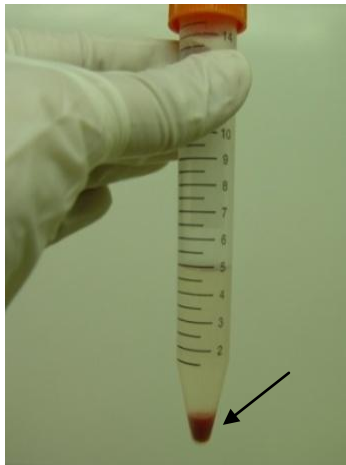


Figura 3 - *Pellet* de células formado após a última centrifugação (seta).

Cultura das células-tronco

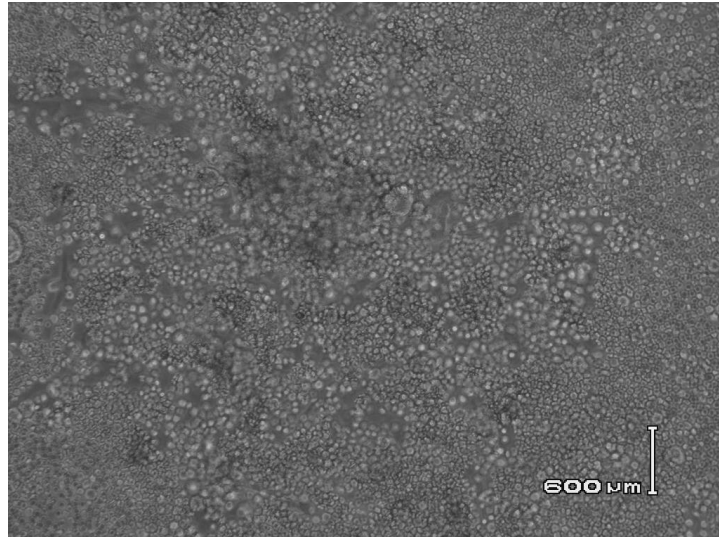


Figura 4: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 3 dias de cultura. Aumento de 3x.

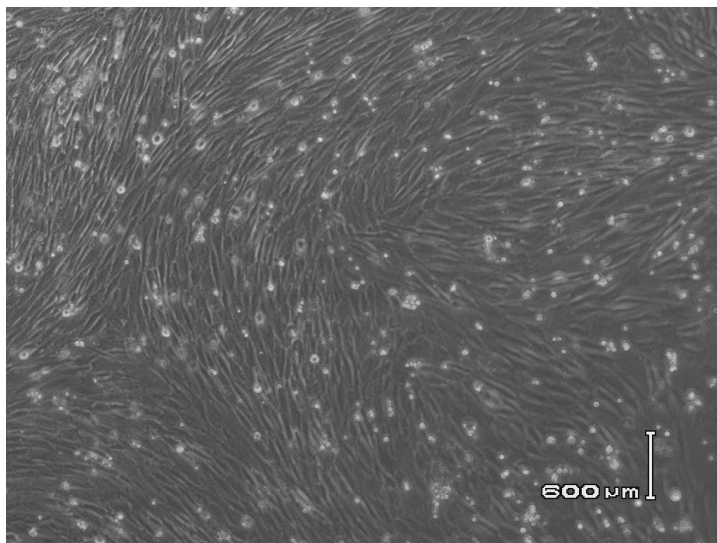


Figura 5: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 8 dias de cultura. Aumento de 10x.

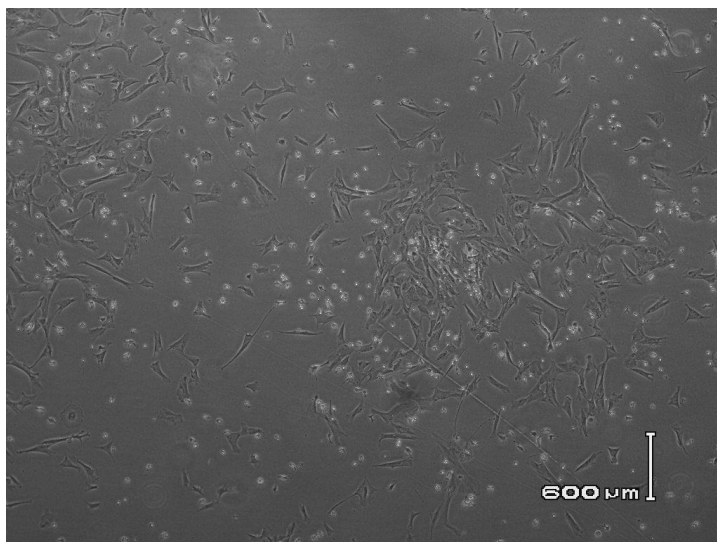


Figura 6: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 11 dias de cultura. Aumento de 4x.

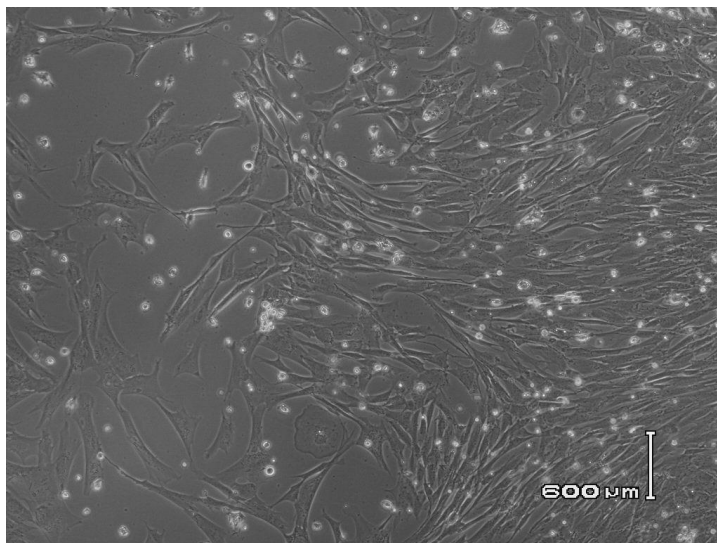


Figura 7: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 11 dias de cultura. Aumento de 10x.

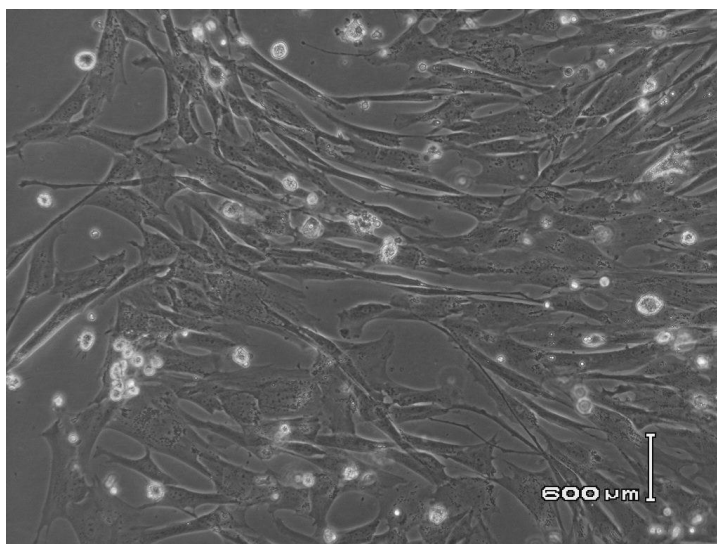


Figura 8 : fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 11 dias de cultura. Aumento de 20x.

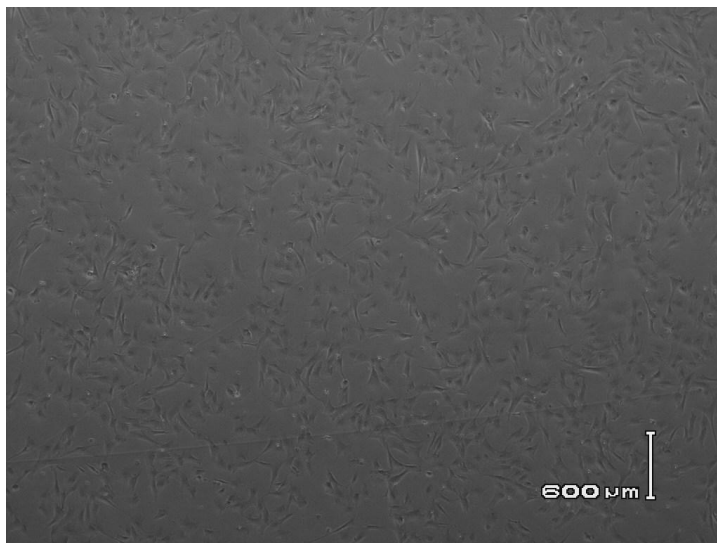


Figura 9: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 15 dias de cultura. Aumento de 4x.

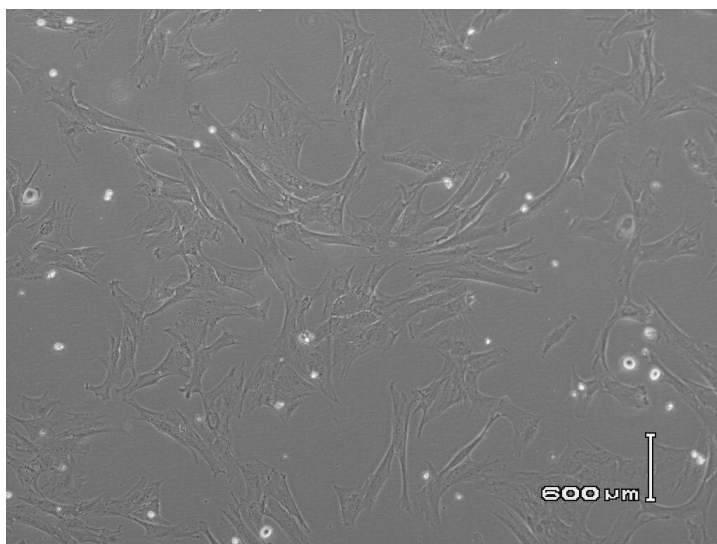


Figura 10: fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 16 dias de cultura. Aumento de 10x.

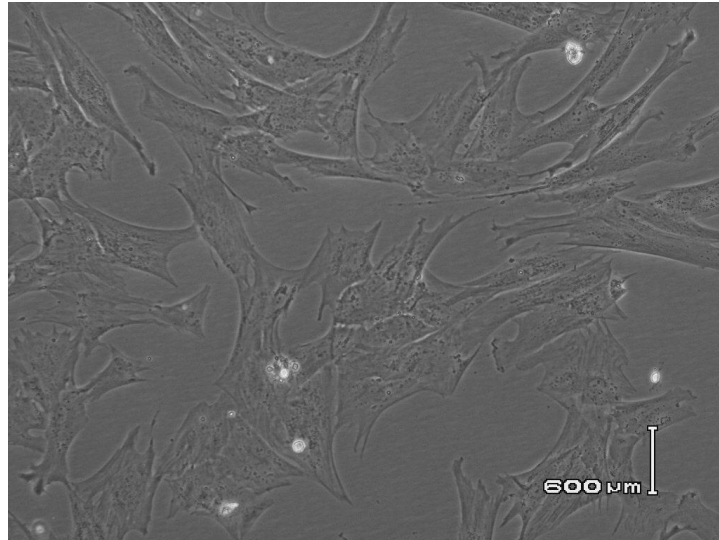


Figura11 : fotomicroscopia da cultura de células-tronco da medula óssea de cão, em meio de cultura DMEM completo, com 16 dias de cultura. Aumento de 20x.

3.4 - Estimulo das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cães.

As células-tronco mesenquimais foram plaqueadas em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram estimuladas com trombina 5, 10 e 50 U/mL. Após um período de 6, 24 e 48 horas o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF- α e TGF- β . Todo o experimento foi feito em triplicata.

3.5 - Avaliação da produção de TNF- α e TGF- β por células-tronco da medula óssea de cães estimuladas por trombina.

Os sobrenadantes das culturas de células-tronco da medula óssea de cão estimulados por trombina foram coletados para avaliação da produção de TNF- α e TGF- β por ELISA. O material coletado foi mantido no freezer -70°C até o momento da realização das dosagens. Brevemente, placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com anticorpos anti-TNF- α e anti-TGF- β diluídos em tampão de fosfato de cálcio, durante 16-24h a 4°C. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e bloqueadores durante 2 horas, em temperatura ambiente, com PBS contendo 1% de BSA. As placas, então, foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes das amostras ou com TNF- α / TGF- β recombinante durante 2 horas à temperatura ambiente. Após este período, as placas

foram lavadas e incubadas com anticorpo biotinilado anti-TNF- α / anti-TGF- β por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e o substrato adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm.

3.6 - Análise estatística

Para análise estatística utilizamos o teste ANOVA one-way test com correção de Bonferoni para determinar a significância da diferença entre os grupos do mesmo ensaio. Outros testes poderão ser aplicados se necessário.

4. Resultados

4.1- Produção de TNF- α pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea de cão estimuladas por trombina.

As células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães foram estimuladas por trombina nas concentrações 5, 10 e 50 U/mL e avaliamos a produção de TNF- α após 6, 24 e 48 horas. Observamos que a produção de TNF- α foi estatisticamente significativa quando estimulada por 10 U/mL de trombina 24 horas após. No entanto necessitamos repetir este ensaio para confirmar este dado, visto que a produção de TNF- α também foi observada já no período de 6 horas após estimulação por 5U/mL de trombina, porem não sendo estatisticamente significativa (Figura 12). Para comprovar a confiabilidade do ensaio de ELISA realizado para dosagem de TNF- α observamos que a curva padrão do ensaio para a proteína se mostrou efetiva tendo o índice de correlação próximo de 1 (Figura 13).

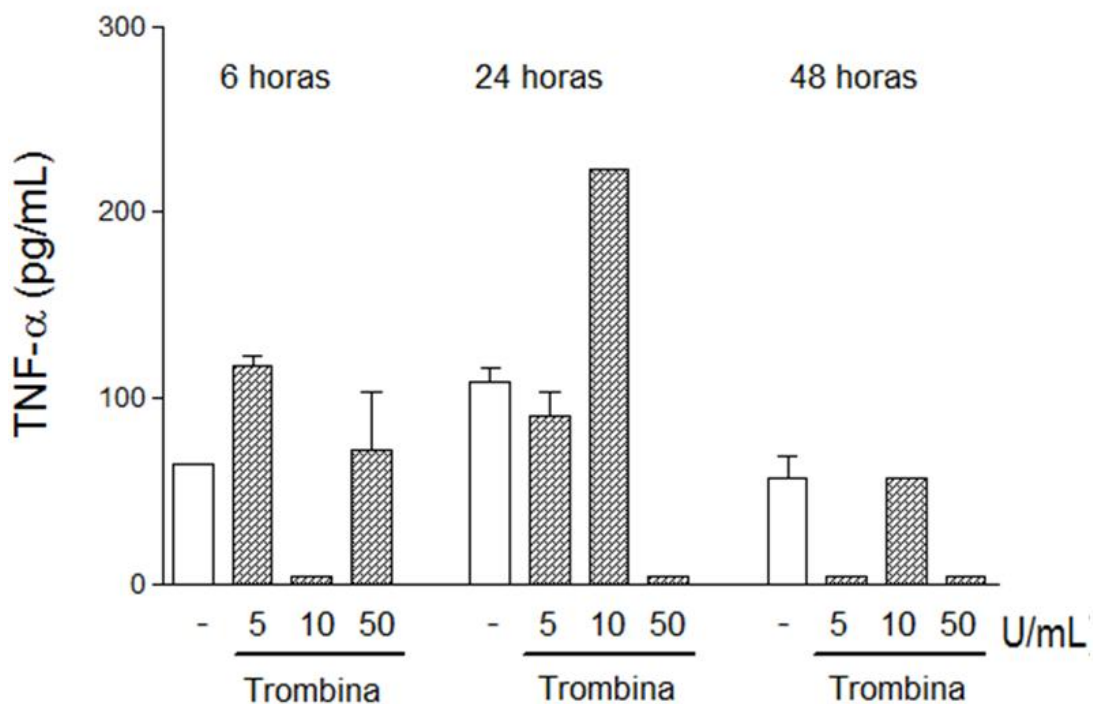


Figura 12: Produção de TNF- α pelas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cão estimuladas por trombina. As células foram estimuladas por trombina nas concentrações de 5, 10 e 50 U/mL e avaliadas 6, 24 e 48 horas após. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de um único experimento com amostras em triplicatas.

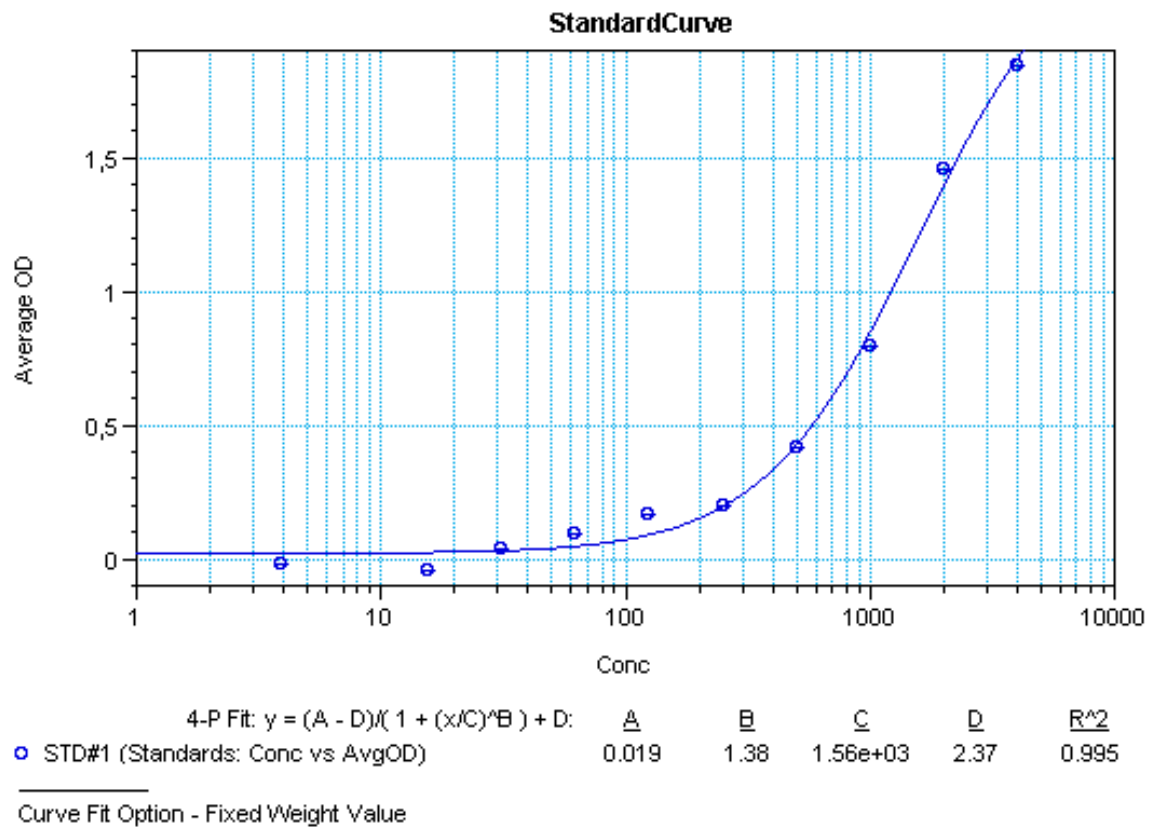


Figura 13: Curva padrão logarítmica da dosagem da proteína TNF- α de cão.

4.2- Produção de TGF- β pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea de cão estimuladas por trombina.

As células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães foram estimuladas por trombina nas concentrações 5, 10 e 50 U/mL e avaliamos a produção de TNF- β após 6, 24 e 48 horas. Observando a figura 14 podemos notar a produção de TGF- β pelas células-tronco mesenquimais quando estimuladas por trombina. No entanto a produção de TGF- β não foi estatisticamente significativa quando estimulada por 5 e 10 U/mL de trombina em todos os grupos analisados. Já quando as CTM foram estimuladas por 50 U/mL de trombina, a produção de TGF- β foi expressiva, ou seja estatisticamente significativa independente do período avaliado.

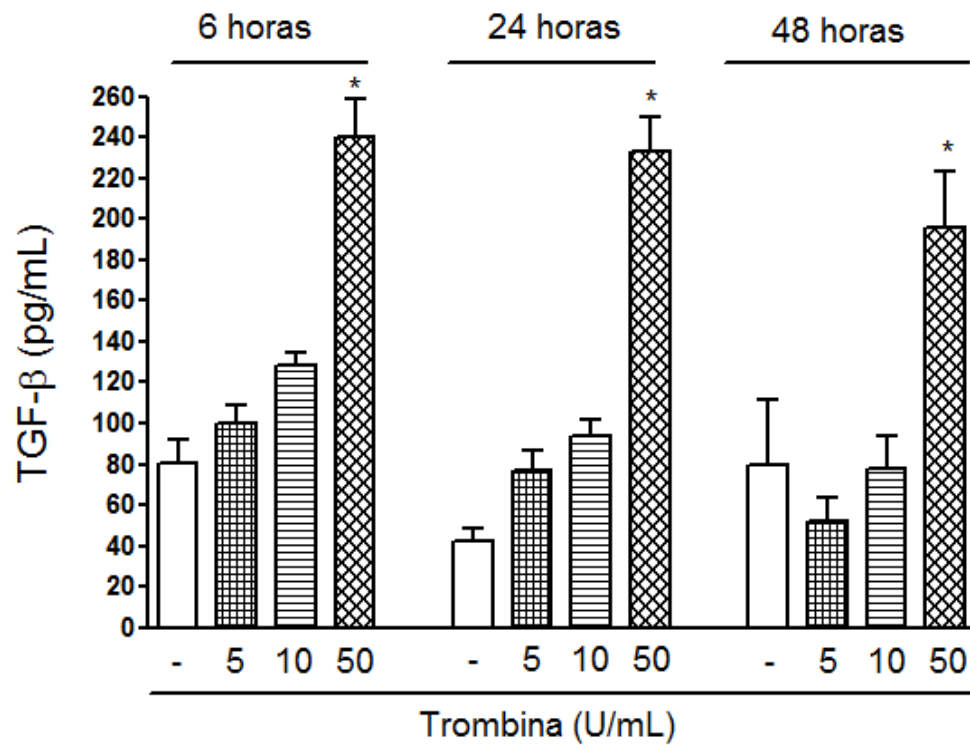


Figura 14: Produção de TGF- β pelas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cão estimuladas por trombina. As células foram estimuladas por trombina nas concentrações de 5, 10 e 50 U/mL e avaliadas 6, 24 e 48 horas após. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de um único experimento com amostras em triplicatas. * $p < 0.001$ (ANOVA One-way following Bonferroni test).

5. Discussão

Nossos dados preliminares demonstram que a trombina foi capaz de estimular a produção de TNF- α e TGF- β pelas células-tronco mesenquimais. De acordo com a literatura a trombina tem um papel importante no crescimento das células do ligamento periodontal (PDL) (POLSON e PROVE, 1983), também pode estimular a proliferação de células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos (DAWES *et al.*, 1993; HERBERT *et al.* 1994; BERK *et al.*, 1991; CHANG *et al.*, 1998a). Além disso, outros estudos na área revelaram que a trombina foi capaz de estimular o crescimento dos fibroblastos do PDL, aumentar a síntese de colágeno e causar significantes alterações morfológicas nessas células, provocando uma maior união entre as células, alterações na orientação das fibras e aumento do espaço intercelular (CHAN *et al.* 1998b). Considerando as múltiplas funções da trombina em regulação da agregação plaquetária, formação de fibrina e outros, a trombina é muito importante para a cicatrização inicial da ferida do periodonto. (WIKESJO *et al.*, 1992). Segundo CHAN, C.P. *et al.*, mostram que a trombina liberada durante uma hemorragia (sangramento) gengival, provocado por uma injúria periodontal, e em condições inflamatória pode ser importante na modulação de resposta de cura do periodonto, já SUNDQVIST *et al.* (1995), tem demonstrado o efeito estimulador da trombina na síntese de colágeno em cultura de células de polpa dental humana. Apesar da grande importância da trombina, poucos estudos têm investigado diretamente os efeitos da trombina sobre a estimulação das células-tronco mesenquimais. A maioria dos estudos já realizados relata o efeito da trombina sobre fibroblastos de diferentes origens. Em 1993 DAWES *et al.*, apartir de um estudo comparando humanos e ratos, observaram que a trombina causa quimiotaxia de fibroblastos da pele e conseqüente migração celular, além do aumento na proliferação do mesmo, TERRANOVA E WIKESJO (1987); KLEINMAN *et al.* (1981) sabendo do efeito da trombina sobre os fibroblastos do ligamento periodontal, tiveram como objetivo através de estudos e pesquisas elucidar o importante papel dos mesmos. Sendo assim, observaram que os fibroblastos podem produzir colágeno, fibronectina e outras proteínas da matriz, que são essenciais na cura de

uma ferida. Várias proteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina, são importantes para a adesão, crescimento, migração e diferenciação celular.

Durante a resposta inflamatória, a liberação do TNF- α pelas células residentes faz com que esta citocina seja capaz de ativar os fibroblastos facilitando a produção de proteínas da matriz para favorecer o processo de reparo tecidual (TAKAHASHI, 1998; ROBBINS *et al.*, 1991), sendo assim o TNF- α é uma importante citocina inflamatória primária que induz a liberação de outras citocinas, inclusive TGF- β (RANG *et al.*, 2003). Em nossos experimentos, os resultados mostram a produção de TNF- α quando as CTM de cão foram estimuladas com trombina 5, 10 e 50 U/mL no período de 6, 24 e 48 horas. Já de início podemos observar a produção de TNF- α (após 6 horas de estímulo), no entanto, não foi estatisticamente significativa. Já no período de 24 horas após o estímulo com trombina 10 U/mL, podemos notar a expressiva produção de TNF- α pelas CTM (Figura 12). Necessitamos repetir esse experimento para confirmação de nosso resultado.

Além da dosagem TNF- α , procuramos também analisar a produção de TGF- β , pois baseado em resultados de um estudo realizado por STEENFOS *et al.*, (1990), vimos que TGF- β é responsável pela proliferação e ativação dos fibroblastos, aumentando a síntese de proteínas de matriz extracelular como os colágenos, fibronectina e laminina, possibilitando a indução do reparo dos tecidos. Observamos que a produção de TGF- β foi significativa quando as CTM foram estimuladas por 50 U/mL de trombina 6, 24 e 48 horas após. Dessa forma, as CTM quando estimuladas por trombina possuem a capacidade de produzir TGF- β , mostrando o grande potencial das CTM de contribuir com o reparo tecidual.

Tomados em conjunto, nossos resultados demonstram que as CTM estimuladas por trombina são capazes de produzir TNF- α e TGF- β tornando-se importante alvo para o disparo do processo de reparo ou reconstituição tecidual no local lesado. Futuramente a utilização dessas CTM juntamente com a trombina pode ser uma importante ferramenta para reconstituição do tecido lesado de maneira controlada.

6. Conclusão

A trombina é um importante fator de estímulo para as CTM, além de todas suas funções podemos observar que ela consegue induzir as CTM a produzir TGF- β e TNF- α . Novos experimentos devem ser conduzidos para a confirmação desses dados.

7. Referências bibliográficas

1. ALTIERI, D.C. Coagulation assembly on leukocytes in transmembrane signaling and cell adhesion. *Blood*, **81**:569-579, 1992.
2. ASSUNÇÃO, L.R., COLENCI, R., FERREIRA DO AMARAL, C.C., SONODA, C.K., BONFIM, S.R., OKAMOTO, R., GOLIM, M.A., DEFFUNE, E., PERCINOTO, C., OLIVEIRA, S.H. Periodontal Tissue Engineering after Tooth Replantation. *J. Periodontol* in press, 2010.
3. BERK, B.C.; TAUBMAN, M.B.; GRIENDLING, K.K. Thrombin stimulated events in vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.*, **274**:799-805, 1991.
4. BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, **414**:118 121, 2001.
5. CASAGRANDE, L. Aplicação de princípios de engenharia tecidual no estudo da diferenciação de células-tronco pulpares. 2008. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008.
6. CHAN, C.P. et al. Effects of thrombin on the growth, protein synthesis, attachment, clustering and alkaline phosphatase activity of cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B, Taiwan*, v.22, n.4, p.137-143, 1998.
7. CHANG, M.C.; JENG, J.H.; LIN, C.P.; LAN, W.H.; TSAI, W.; HSIEH, C. C. Thrombin activates the growth, cell-cycle kinetics and clustering of human dental pulp cells. *J. Endod.* (in press), 1998a.
8. CHANG, M.C.; LIN, C.P.; HUANG, T.F.; LAN, W.H.; LIN, Y.L.; HSIEH, C.C. AND JENG, J.H. Thrombin-induced DNA synthesis of cultured human dental pulp cells is dependent on its proteolytic activity and modulated by prostaglandin E2. *J. Endod.* (in press), 1998b.

9. CHEN, L.B.; BUCHANAN, J.M. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, Washington, v.72, n.1, p.131-135, 1975.
10. DALE, R.A. Dentoalveolar trauma. *Emerg. Med. Clin. North Am.*, v.18, n.3, p.521-539, Aug, 2000.
11. DAWES, K.E., GRAY, A.J.; LAURENT, G.J. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur. J. Cell Biol.*, **61**:126-130, 1993.
12. HERBERT, J.M., DUPUY, E. AND LAPLASE, M.C. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and non-proteolytic pathway. *Biochem. J.*, **303**:227-231, 1994.
13. HOOGDUIJN MJ, POPP F, VERBEEK R, MASOODI M, NICOLAOU A, BAAN C, DAHLKE MH. *Int Immunopharmacol.* **2010** Dec;10(12):1496-500. Epub **2010** Jul 7. Review.
14. KLEINMAN, H. K., KLEBE, R. J. and MARTIN, G. R. (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, **88**:473-485.
15. LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. *Science*, 260 (5110), 920-926, 1993.
16. LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65 (1), 1-8, 2004.
17. PANG, Y.; CHEN, W.; CUI, P. Optimal culture of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.*, 18(3):220-4, May, 2004.
18. PITTINGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284:143-147 April 2, 1999.
19. POLSON, A.M.; PROYE, M.P. Fibrin linkage: a precursor for new

- attachment. *J. Periodontol.*, **54**:141-147, 1983.
20. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Hormônios locais, inflamação e alergia. In *Farmacologia*, 5ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 246-276, 2003.
 21. RISBUD, M. V.; SHAPIRO, I. M. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering*. *Orthod Craniofac Res*, 8:54-59, 2005.
 22. ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Inflamação e reparo. *Patologia Estrutural e funcional*. São Paulo: Guanabara Koogan, 1231p., 1991.
 23. SOARES, I. L.; SOARES, I. J. Técnica do reimplante dentário – Tratamento dos dentes traumatizados e conduta clínica para reimplantação. *RGO*, V. 36, N. 5, P. 331- 336. Set/Out., 1998
 24. STENFOS, H. H.; LOSSING, C.; HANSSON, H. A. Immunohistochemical demonstration of endogeneous growth factor in wound healings. *Wounds*, 2:218-226, 1990.
 25. SUNDQVIST, G., ROSENQUIST, J.B. and LERNER, U.H. (1995) Effects of bradykinin and thrombin on prostaglandin formation, cell proliferation and collagen biosynthesis in human dental pulp fibroblasts. *Arch. Oral Biol.*, **40**:247-256.
 26. TAKAHASHI, H. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular diseases. *Int. Endod. J.*, 31:311-325, 1998.
 27. TATAKIS, D. N. Blood coagulation factors in periodontal pathophysiology: a review with emphasis on the role of thrombin. *Semin. Thromb. Haemostasis*, **18**:28-33, 1992.

28. TERRANOVA, V. P. and WIKESJO, U. M. E. (1987) Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J. Periodontol.*, **58**:371-380.
29. UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. *Nat Rev Immunol.* **2008** Sep;8(9):726-36. Review.
30. WIKESJO, U. M. E.; NILVEUS, R. E.; SELVIG, K. A. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J. Periodontol.*, **63**:158-165, 1992.

8. Anexo

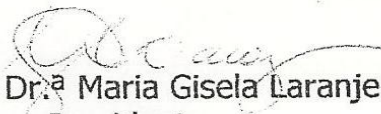
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA)

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Projeto "EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO ORIGINÁRIAS DA MEDULA ÓSSEA E DO LIGAMENTO PERIODONTAL NA REGENERAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL APÓS REIMPLANTE DENTÁRIO: ESTUDO EM CÃES" sob responsabilidade de CÉLIO PERCINOTO, LUCIANA REICHERT DA SILVA ASSUNÇÃO, SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA, SÍLVIO EDUARDO DUAILIBI e MÔNICA DUAILIBI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA em 07 de julho de 2006, de acordo com o protocolo nº 57/06.

Araçatuba, 07 de julho de 2006.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

