

HENRIQUE APARECIDO BUENO DA SILVA

**Expressão do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) em pacientes
com periodontite crônica**

São Paulo

2013

HENRIQUE APARECIDO BUENO DA SILVA

**Expressão do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) em pacientes
com periodontite crônica**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Silva, Henrique Aparecido Bueno da.

Expressão do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) em pacientes com periodontite crônica / Henrique Aparecido Bueno da Silva; orientador Marinella Holzhausen. -- São Paulo, 2013.

84 p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Periodontite crônica. 2. Tratamento periodontal. I. Holzhausen, Marinella. II. Título.

Silva HAB. Expressão do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) em pacientes com periodontite crônica. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho

Aos meus queridos pais, **Humberto** e **Cida**, por me incentivarem, desde pequeno, a buscar o conhecimento e por proporcionarem todas as condições para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigado por me ensinarem, acima de tudo a ser humilde, em especial a minha querida mãe, que sempre esteve ao meu lado, segurando a minha mão. Serei eternamente grato a vocês e espero retribuir todo o carinho e amor que me deram.

Aos meus queridos avós paternos, **João** e **Laura**, que deixaram e ainda deixam muitas saudades, mas que nunca serão esquecidos. Com eles aprendi o que é o respeito e o companheirismo. Obrigado por tudo o que vocês representaram em minha vida durante o tempo em que convivemos juntos.

À minha querida avó materna, **Maria Clarice Dada Gomes**, parte marcante de minha infância e de minha vida, e que mesmo sem condições de estudo, sempre me incentivou a estudar e principalmente a persistir, sem dúvida um exemplo a ser seguido. Obrigado vó, por todos esses anos de apoio incondicional, mesmo quando estava longe de minha família durante a graduação.

À minha querida noiva, e futura esposa, **Karina Moreno da Fonseca**, a primeira e minha maior incentivadora, que me apoiou incondicionalmente durante toda essa empreitada, mesmo que isso significasse abrir mão momentaneamente de outros caminhos a serem seguidos. Você, meu amor, que esteve ao meu lado durante tantas batalhas, em momentos difíceis, mas acima de tudo, em tantas vitórias e alegrias, obrigado por sua cumplicidade, companheirismo e paciência. Você foi fundamental por eu ter chegado onde cheguei, nunca me esquecerei de seu gesto.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me mostrar muitas vezes o caminho a ser seguido, por me confortar e mostrar o caminho da felicidade diante de tantas tormentas que passamos durante as nossas vidas.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira**, por toda a confiança depositada em mim durante o estágio e após o ingresso no mestrado. Por dedicar tempo e trabalho a me orientar em meu trabalho, por acreditar em meu potencial, mesmo quando não achava que era capaz e acima de tudo por confiar em mim. Serei eternamente grato pelo tempo de aprendizado e amadurecimento que obtive durante esses bons anos de convívio.

Ao **Prof. Dr. Mário Taba Jr.**, meu orientador no programa de iniciação científica, durante minha graduação na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) e que atendeu prontamente ao meu convite para ser membro titular de minha banca. Obrigado professor, por ser o responsável pelo meu início na Periodontia, por ter me incentivado a buscar o conhecimento e pelos ensinamentos ministrados em Ribeirão Preto.

Ao **Prof. Titular Giuseppe Alexandre Romito**, por nos incentivar durante as clínicas da pós-graduação, compartilhando seu conhecimento e pelas críticas construtivas durante as apresentações de seminários da disciplina de Periodontia.

Ao **Prof. Dr. João Batista César Neto**, pelo apoio e incentivo, por compartilhar seus conhecimentos, pelas sugestões que contribuíram muito para o resultado final deste trabalho, durante o exame de qualificação, e principalmente pela sua amizade.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, por se mostrar sempre disponível a ajudar em todos os momentos em que necessitei, pelo incentivo na busca pelo conhecimento e principalmente, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao **Prof. Dr. Rui Curi**, por dedicar tempo e trabalho a nossa pesquisa e abrir as portas de seu laboratório no ICB-USP.

Aos Professores: **Prof. Dr. Giorgio de Micheli, Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima, Prof. Dr. Marco Paupério Georgetti, Profa. Dra. Marina Clemente Conde, Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos**, pela dedicação, confiança e por transmitir seus conhecimentos de forma tão clara e objetiva, fundamentais para meu aprendizado.

Ao meu amigo, **Marcelo Sirolli Ferreira**, pela amizade e companhia durante todos esses anos de curso, pelas inúmeras risadas e conversas, foi muito bom trabalhar com você quando tive a oportunidade. Um prazer ter você como amigo.

À minha amiga, **Rogéria Gonçalves**, uma das principais responsáveis pelo meu ingresso na FOUSP. Obrigado pela oportunidade em ajudar em seu projeto de mestrado, e espero retribuir a altura toda a sua amizade e paciência durante esse período. Serei eternamente grato pela chance que tive.

À minha amiga, **Vanessa Tubero Euzebio Alves**, com quem tive a honra de aprender muito. Van, obrigado por me ajudar a crescer como profissional, pelos conselhos e por guiar alguns de meus passos durante a execução desse projeto.

Em especial, aos meus amigos e colegas, **Ieda Santos Abreu** e **Henrique Fukushima**, grandes amigos e companheiros de jornada. Foi um prazer ter vocês como companheiros, e que vocês possam continuar evoluindo durante a reta final do mestrado.

Aos meus amigos e colegas de curso, **Caio Cremonini, Carlos Eduardo Secco Mafra, Mariana Rocha Guglielmetti, Mariana Sousa Rabelo, Priscila Vivas, Michelle de Franco Rodrigues, Verônica Carvalho, Ana Paula Sassá, Livia Tolentino, Gislene Sakata Inoue, Elaine Gomes, Ecinele Rosa, Daniela Yumie Takahashi, Stefania Possamai e Vanessa Almeida**, agradeço a vocês pela companhia, pela amizade, por terem compartilhado dias de aulas e seminário. Desejo muito sucesso a todos vocês.

À **Marcia Maria dos Santos** e **Marília Camargo Gomes**, funcionárias da disciplina de Periodontia, por sempre ajudarem e serem solícitas quando precisei.

À todos os pacientes que nosso grupo de pesquisa atendeu durante esse período, pela paciência e se mostrarem dispostos a seguirem nossas solicitações em favor da ciência.

À FAPESP e à CAPES por terem apoiado este trabalho.

“Não existe um caminho para a felicidade.

A felicidade é o caminho”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Silva HAB. Expressão do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) em pacientes com periodontite crônica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

A ativação do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) pela trombina desempenha um papel fundamental na deposição de matriz vascular após injúria tecidual, reparação óssea e na homeostase dos tecidos periodontais, assim como na proliferação de fibroblastos gengivais. O principal objetivo deste estudo foi investigar a expressão de PAR-1 em pacientes com periodontite crônica, antes e 45 dias após tratamento periodontal não-cirúrgico. Amostras de fluido gengival (FG), de saliva e parâmetros clínicos, como profundidade de sondagem (PS), perda do nível clínico de inserção (NCI), sangramento à sondagem (SS), índice gengival (IG) e índice de placa (IP) foram coletados de pacientes com saúde periodontal (Controle) e pacientes com periodontite crônica moderada antes (PC) e 45 dias após o tratamento não-cirúrgico periodontal (PCT). A expressão gênica de PAR-1 (mRNA) em FG foram avaliadas por qPCR (Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real). A análise por citometria de fluxo foi realizada para identificar quais células expressam PAR-1 em FG. Biomarcadores inflamatórios salivares também foram determinados. Os parâmetros clínicos foram significativamente melhorados após terapia periodontal não-cirúrgica ($p < 0,01$). A análise por qPCR mostrou que antes da terapia, níveis de PAR-1 (mRNA) em periodontite crônica foram menores aos controles. O tratamento periodontal levou ao aumento da expressão de PAR-1 em periodontite crônica ($p < 0,05$). A expressão de PAR-1 foi inversamente correlacionada com a expressão dos níveis salivares de IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , e MMP-2. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a expressão de PAR-1 aumentou após o tratamento periodontal em células do FG, e que a expressão de PAR-1 está associada com a diminuição da expressão dos níveis salivares de biomarcadores inflamatórios. Portanto, dentro dos limites do presente estudo, nossos dados sugerem a importância do papel mediador de PAR-1 na reparação do tecido periodontal.

Palavras-chave: Periodontite Crônica. PAR-1. Inflamação Periodontal. Reparação Tecidual. Humanos.

ABSTRACT

Silva HAB. Expression of Protease-activated receptor-1 (PAR-1) in chronic periodontitis patients after non-surgical periodontal treatment [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Corrigida

Activation of protease-activated receptor type 1 (PAR-1) thrombin plays a key role in matrix deposition after vascular tissue injury, bone repair and homeostasis of periodontal tissues, as well as the proliferation of gingival fibroblasts. The main objective of this study was to investigate the expression of PAR-1 in patients with chronic periodontitis before and 45 days after non-surgical periodontal treatment. Samples of gingival fluid (GF), saliva and clinical parameters such as probing depth (PD), loss of clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), gingival index (GI) and plaque index (PI) were collected from patients with periodontal health (Control) and patients with moderate chronic periodontitis before (PC) and 45 days after non-surgical periodontal treatment (PCT). The gene expression of PAR-1 (mRNA) in GF were assessed by qPCR (Polymerase Chain Reaction in Real Time). The flow cytometry analysis was performed to identify cells which express PAR-1 in GF. Salivary inflammatory biomarkers were also determined. Clinical parameters were significantly improved after therapy ($p < 0,01$). The qPCR analysis showed that before therapy, PAR-1 (mRNA) levels in chronic periodontitis were smallest to controls. Periodontal treatment led to increased PAR-1 expression in chronic periodontitis ($p < 0,05$). PAR-1 expression was inversely correlated to IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , and MMP-2 salivary levels. In conclusion, the present study showed that the expression of PAR-1 increased after periodontal treatment in FG cells, and that expression of PAR-1 is associated with decreased expression of salivary levels of inflammatory biomarkers. Therefore, within the limits of this study, our data suggest the importance of the mediating role of PAR-1 in the repair of periodontal tissue.

Keywords: Chronic Periodontitis. PAR-1. Periodontal Inflammation. Tissue Repair. Humans.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 – Cronograma de execução.....36
- Figura 5.1 - Expressão gênica de PAR-1 (mRNA) nos grupos C, PC e após tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT) (*diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle; ●diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo periodontite crônica; p<0,05).....53
- Figura 5.2 - Dados representativos ilustrando as estratégias de aquisição para análise por citometria de fluxo. Células do FG sem marcação foram usadas para determinar o controle negativo (I). Total de leucócitos (PAR1 x CD45) e células epiteliais (PAR1 x Cyt19) na mesma amostra (II). Expressão de PAR-1 em leucócitos (painel da esquerda) e células epiteliais (painel da direita) (III)54
- Figura 5.3 - Porcentagem de leucócitos e células epiteliais que expressam PAR-1 nos grupos C e PC (*diferença estatisticamente significativa comparado aos leucócitos; ●diferença estatisticamente significativa comparado as células que não expressam PAR-1; #diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo Controle; p<0,05)55
- Figura 5.4 - Esquema representativo dos dados de citometria de fluxo para avaliação das células que expressam PAR-1 (leucócitos e células epiteliais), em FG de pacientes do grupo PC (A, B, C e D) e C (E, F, G e H). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo PC sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (A e C). Representação de leucócitos que não expressam PAR-1 (Q1) e leucócitos que expressam PAR-1 (Q2) no grupo CP (B). Células epiteliais que não expressam PAR-1 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR-1 (Q2) no grupo CP (D). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo Controle sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (E e G). Leucócitos que não expressam PAR-1 (Q1) e leucócitos que expressam PAR-1 (Q2) no grupo de Controle (F). Células epiteliais que não expressam PAR-1 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR-1 (Q2) no grupo Controle (H)57
- Figura 5.5 - Média e desvio padrão (DP) dos níveis salivares de IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-13 em pacientes com periodontite crônica, antes (PC) e após tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT) (*diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, p<0,05).....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sequência de primers usados para amplificação do cDNA46

Tabela 5.1 - Parâmetros clínicos e demográficos do Grupo Periodontite Crônica (PC) (n=38) no início do estudo e 6 semanas após o Tratamento Periodontal Não-Cirúrgico (PCT) comparado ao Grupo Controle (C) (n=37).....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ Ct	Cálculo “Cycle Threshold”
μ g	Microgramas
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
μ mol	Micromol
C	Grupo Controle
CCL39	Fibroblastos Pulmonares de Hamsters
CD45	Anticorpo para Leucócitos
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	Cicloxygenase do Tipo 2
CTGF	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
CXC	Quimiocina da subfamília CXC
CXCL1	Quimiocina da subfamília CXC Ligante 1
CXCL2	Quimiocina da subfamília CXC Ligante 2
CXCL3	Quimiocina da subfamília CXC Ligante 3
CXCL5	Quimiocina da subfamília CXC Ligante 5
CXCL8	Quimiocina da subfamília CXC Ligante 8
Cyt 19	Anticorpo para Células Epiteliais
DEPC	Diethylpyrocarbonate (Dietilpirocarbonato)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Mistura de Trifosfato de Desoxinucleotídeos
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
ET-1	Endotelina do Tipo 1
ETA	Receptor de Endotelina do Tipo 1
EUA	Estados Unidos da América
FG	Fluído Gengival
FGF-1	Fator de Crescimento de Fibroblastos do Tipo 1
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblastos do Tipo 2

FGF-4	Fator de Crescimento de Fibroblastos do Tipo 4
FLLRN	Sequência amino-terminal
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FXa	Fator Xa
g	Gramas
GPRC	Receptor Acoplado a Proteína G
h	Hora
H ₂ O DEPC	Água de Dietilpirocarbonato
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HIV	Vírus da Imunodeficiência da Humana
HRgpA	Cisteína-protease
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular do Tipo 1
IFN- γ	Interferon do Tipo γ
IG	Índice Gengival
IL-1	Interleucina do Tipo 1
IL-1 α	Interleucina do Tipo 1 α
IL-1 β	Interleucina do Tipo 1 β
IL-6	Interleucina do Tipo 6
IL-8	Interleucina do Tipo 8
IP	Índice de Placa
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos do Tipo 1
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias – Macrófago
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MMP-1	Metaloproteinase de Matriz do Tipo 1
MMP-13	Metaloproteinase de Matriz do Tipo 13
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz do Tipo 2
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
n	Número de Participantes

NCI	Nível Clínico de Inserção
n _f	Número Final de Participantes
nm	Nanômetros
NY	Nova Iorque
OH	Ohio
OPG	Osteoprotegerina
PAR	Receptor Ativado por Protease
PAR-1	Receptor Ativado por Protease do Tipo 1
PAR-1 ^{-/-}	Receptor Ativado por Protease do Tipo 1 Nulo
PAR-1 ^{+/+}	Receptor Ativado por Protease do Tipo 1 Presente
PAR-2	Receptor Ativado por Protease do Tipo 2
PAR-3	Receptor Ativado por Protease do Tipo 3
PAR-4	Receptor Ativado por Protease do Tipo 4
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão Fosfato e Salina)
PC	Grupo Periodontite Crônica
PCA	Proteína C Ativada
PCT	Grupo Periodontite Crônica após Tratamento Periodontal
PDGF	Fator de Crescimento de Agregação de Plaquetas
PGE-2	Prostaglandina do Tipo E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares
PRSFLLRN	Sequência amino-terminal
PS	Profundidade de Sondagem
qPCR	Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real
R41	Sítio para clivagem específica de PAR
RANK	Receptor
RANKL	Receptor Ativador de Fator Kappa Nuclear B Ligante
RANK-RANKL	Ligação específica
RgpB	Cisteína-protease
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SFLLRN	Sequência amino-terminal
SS	Sangramento a Sondagem
TCG	Isotiocinato de Guanidina

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFLLR-NH2	Peptídeo Ativador Sintético de PAR-1
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador do Tipo β
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformador do Tipo β 1
TGF- β 2	Fator de Crescimento Transformador do Tipo β 2
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral do Tipo α
tRNA	Ácido Ribonucléico Total
UV	Ultra Violeta
VCAM-1	Molécula-1 de Adesão Celular Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
° C	graus Celsius
=	igual
x	vezes
≠	diferente
≈	quase igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASE DO TIPO 1 (PAR-1)	23
2.2 INFLAMAÇÃO PERIODONTAL E PAR-1	26
2.3 REPARAÇÃO PERIODONTAL E PAR-1	31
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES	36
4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA - SELEÇÃO DOS SÍTIOS PERIODONTAIS	37
4.4 TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICO E REAVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS	38
4.5 COLETA DE AMOSTRA DE FLUÍDO GENGIVAL	39
4.6 COLETA DE AMOSTRA DE SALIVA TOTAL	41
4.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PAR-1 POR REAL TIME-PCR	41
4.7.1 Extração do ácido ribonucléico total (tRNA)	41
4.7.2 Precipitação do tRNA	42
4.7.3 Lavagem do tRNA	42
4.7.4 Digestão do DNA	42
4.7.5 Re-extração do tRNA	43
4.7.6 Quantificação do tRNA	43
4.7.7 Integridade do tRNA	44
4.7.8 Reação de Transcrição do Ácido Desoxirribonucléico complementar (cDNA)	45
4.7.9 Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (Real time PCR) ..	45
4.7.10 Análise dos produtos da Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (Real time PCR)	47

4.8 DETECÇÃO DOS NÍVEIS SALIVARES DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	47
4.9 CONTAGEM DE CÉLULAS EPITELIAIS E NEUTRÓFILOS NO FLUIDO GENGIVAL.....	48
4.10 ANÁLISE DO PAR-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO DO FLUIDO GENGIVAL.....	48
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS.....	51
5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS	51
5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE PAR-1 (mRNA)	52
5.3 ANÁLISE DE PAR-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO	53
5.4 NÍVEIS SALIVARES DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

A destruição dos tecidos de suporte dental (ligamento periodontal e osso alveolar) pela periodontite, doença de característica crônica e inflamatória, ocorre principalmente como resultado das respostas imunoinflamatórias de um hospedeiro susceptível frente a uma ameaça microbiana persistente (Schenkein, 2006). Ainda, a resposta inicial à infecção microbiana se dá através de uma reação inflamatória local que ativa o sistema imune inato. Essa resposta inflamatória resulta na liberação de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores da inflamação, e conseqüentemente, ocorre a propagação e migração de novas células inflamatórias para os tecidos periodontais envolvidos (Page, 1991; Kornman et al., 1997; Graves, 1999).

Proteases bacterianas produzidas por *Porphyromonas gingivalis*, um importante patógeno envolvido no desenvolvimento das doenças periodontais, denominadas gingipaínas, desempenham um papel crítico no início da inflamação através do aumento da permeabilidade vascular, desregulação do plasma e formação de coágulos, ativação de componentes do sistema complemento, e modificação da função de neutrófilos (Wingrove et al., 1992; Imamura et al., 1995; Imamura et al., 1997; Kadowaki et al., 1998; Uehara et al., 2005). Sabe-se atualmente que parte da modulação da resposta inata pelas gingipaínas é explicada pela interação direta destas proteases com os receptores de superfície das células do hospedeiro, como os receptores ativados por protease (PARs) (Travis; Potempa, 2000).

O receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1), foi o primeiro membro clonado da família da proteína G acoplada, com 7 domínios transmembrânicos, e sua ativação ocorre através da clivagem proteolítica do domínio N-terminal a qual pode ser efetuada pela trombina, gingipaína, proteína C ativada (PCA), fator Xa (FXa), granzima A, tripsina e metaloproteinases de matriz do tipo 1 e 13 (MMP-1 e MMP-13) (Lourbakos et al., 2001; Jaffré et al., 2012). A clivagem proteolítica de PAR-1 na ligação Arg41/Ser42 determina uma nova sequência N-

terminal, a qual se liga ao próprio receptor, resultando em sua ativação automática e gerando um padrão de sinalização intracelular (Ossovskaya; Bunnett, 2004). Além do PAR-1, outros receptores integram a família dos receptores ativados por protease (PARs), o PAR-3, o PAR-4, os quais também podem ser ativados por trombina, e o PAR-2, que pode ser ativado por diversos tipos de proteases endógenas e bacterianas, desempenhando papel fundamental na inflamação periodontal (Macfarlane et al., 2001).

O PAR-1 pode ser expresso por plaquetas, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, miócitos, neurônios e astrócitos, e o seu envolvimento no metabolismo do tecido periodontal tem sido sugerido por diversos estudos *in vitro* (Déry et al., 1998; Coughlin 1999; O'Brien et al., 2001; Austin et al., 2013), verificando-se a expressão deste receptor por várias células periodontais, bem como a presença de seus possíveis ativadores no ambiente periodontal. O PAR-1 tem sido demonstrado em fibroblastos gengivais humanos, células epiteliais gengivais, células do ligamento periodontal, osteoblastos e monócitos (Lourbakos et al., 2001; Tanaka et al., 2004; Pagel et al., 2009). Entre os possíveis candidatos que podem ativar o PAR-1 nestas células, a trombina e a gingipaína são as enzimas mais estudadas.

Os efeitos biológicos resultantes da ativação de PAR-1 no metabolismo periodontal ainda não estão bem definidos. Há evidências de que a indução de mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais pode estar relacionada à ativação do PAR-1 em células destes tecidos, associando o PAR-1 a um perfil de destruição periodontal (Lourbakos et al., 2001; Giacaman et al., 2009). No entanto, em estudo conduzido por Wong et al. (2010), camundongos knockout PAR-1^{+/+} e PAR-1^{-/-}, após serem induzidos por cepas de *Porphyromonas gingivalis* para indução da doença periodontal, não demonstraram diferenças com relação a avaliação da perda óssea alveolar, indicando que o PAR-1 não possui um papel relevante na progressão da doença periodontal. Ainda, evidências na literatura, associam a ativação de PAR-1 com a reparação e homeostase dos tecidos periodontais (Song et al., 2005;

Arayatrakoollikit et al., 2008), e a proliferação de fibroblastos gengivais (Ohuchi et al., 2010).

Contudo os efeitos da ativação dos receptores ativados por protease do tipo 1 sobre o metabolismo periodontal ainda não estão bem esclarecidos.

Desta forma, a hipótese do presente estudo foi de que o receptor PAR-1 pode estar associado a reparação tecidual periodontal após tratamento periodontal não-cirúrgico em humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASE DO TIPO 1 (PAR-1)

Os PARs foram descobertos em 1991, em um estudo conduzido por Vu et al., onde o PAR-1, o primeiro a ser identificado da família dos receptores de 7 domínios transmembrâncos acoplados a proteína G, foi detectado como um receptor funcional da trombina em células plaquetárias e endoteliais vasculares humanas. Em outro estudo realizado no mesmo ano, Rasmussen et al. (1991), utilizaram a técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para amplificar seletivamente os membros da família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) por células fibroblásticas do pulmão de hamsters (CCL39), onde um clone de fragmento de DNA foi obtido e isolado com propriedades estruturais e funcionais de um receptor de trombina, assim o fragmento de DNA isolado codificou um receptor de trombina com as características estruturais de um receptor acoplado a proteína G.

Ao todo, quatro PARs foram identificados por clonagem molecular, sendo eles o PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4, os quais podem ser ativados por uma grande variedade de proteases, como o grupo de proteases envolvidas no processo de coagulação sanguínea, células inflamatórias, do sistema digestório e gingipaínas (RgpB e HRgpA), cisteíno-proteases bacterianas produzidas pela *Porphyromonas gingivalis*. A ativação desses receptores pode iniciar uma série de processos de sinalização em muitos tipos celulares, que podem resultar em diversos eventos fisiopatológicos, tais como crescimento, desenvolvimento, inflamação, reparo tecidual e dor (Déry et al., 1998; Coughlin 2000; O'Brien et al., 2001). De acordo com Macfarlane et al. (2001), os PARs podem ser expressos em todos os tecidos humanos e em diversos tipos celulares, e portanto, diferentes vias de sinalização intracelular têm sido identificadas dependendo do tipo celular estudado.

O PAR-1 é expresso por plaquetas, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, miócitos, neutrófilos, macrófagos, células brancas leucêmicas, neurônios e astrócitos (Austin et al., 2013). A expressão do PAR-1 por diversas células, como fibroblastos gengivais humanos, células epiteliais gengivais, células do ligamento periodontal, osteoblastos e monócitos, e a presença de seus possíveis ativadores nos tecidos periodontais também tem sido observada por inúmeros estudos (Lourbakos et al., 2001; Tanaka et al., 2004; Pagel et al., 2009).

Contudo, além da trombina, o PAR-1 pode ser clivado e ativado por diversas proteases como FXa, PCA, granzima A, gingipaínas (Rgp), tripsina, e MMP-1 e MMP-13. Dentre as principais proteases que possuem a capacidade de clivar e ativar PAR-1, a trombina, tem sido a mais estudada. Produzida a partir de protrombina por ação de FXa, atua na formação de fibrina a partir de fibrinogênio (Davie et al., 1991; Stubbs; Bode, 1993) e age sobre o receptor clivando em sítio específico (R41) o domínio amino-terminal de PAR-1, formando uma nova sequência amino-terminal (SFLLRN), que funciona como um ligante ativando o próprio receptor e proporcionando nova sinalização intracelular (Ossovskaya; Bunnett, 2004). Como consequência, a ativação do PAR-1 pela trombina promove a agregação plaquetária, alteração de formato e adesão, proliferação celular, produção de citocinas e migração celular (Macfarlane et al., 2001). Ainda, a ativação de PAR-1 pela trombina, induz a ativação das plaquetas, assim como degranulação e aumento do processo de agregação plaquetária no tecido sanguíneo humano (Vu et al., 1991; Kinlough-Rathbone et al., 1993; Henriksen et al., 1997; Andersen et al., 1999). O processo de ativação de PAR-1 atua ainda em outros tecidos do corpo humano. No sistema circulatório, células do endotélio vascular, por estímulo da ativação de PAR-1 via trombina, aumentam a liberação de fator de von Willebrand, responsável por mediar a adesão das plaquetas ao subendotélio lesado, funcionando como uma ponte entre os receptores da plaqueta e o subendotélio lesado, e aumentam a expressão de P-selectina e moléculas de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1), moléculas essenciais no processo de adesão de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) em endotélio vascular durante o processo inflamatório (Sugama et al.,

1992; Garcia et al., 1993; Godin et al., 1995; Hwa et al., 1996; Storck; Zimmermann, 1996; Emilsson et al., 1997; Jiang et al., 1998). Em células osteoblásticas dos tecidos ósseos, há o aumento da proliferação destas (Jenkins et al., 1993; Abraham; Mackie, 1999), assim como o aumento da expressão de IL-1, IL-6 e TNF- α em monócitos, mastócitos e em linfócitos T do sistema imune (Mari et al., 1994; Naldini et al., 1998; Umarova et al., 2000).

Em estudos recentes, outras vias de ativação de PAR-1 foram descobertas. De maneira interessante metaloproteinases da matriz (MMPs), endopeptidases zinco-dependentes, normalmente responsáveis pelo desenvolvimento e reparação tecidual após injúrias e danos teciduais (Shoulders; Raines, 2009) parecem desempenhar papel importante na clivagem e ativação de PAR-1. Dentre eles, as MMP-1 e MMP-13, colagenases intersticiais, parecem ter uma atividade agonista específica para PAR-1. Estas atuam clivando e ativando PAR-1 de maneira irreversível em sítios específicos distintos da trombina, e como resultado dessa atividade há uma diferenciação no padrão de sinalização intracelular em plaquetas e em outras células do que quando observado com a atividade de trombina (Austin et al., 2013).

A MMP-1, é expressa na maioria dos tecidos humanos, sobretudo em células do endotélio vascular, células inflamatórias e plaquetas, e pode ser considerada uma enzima primária responsável pela degradação tecidual (Brinckerhoff et al., 2000; Galt et al., 2002). A ativação de PAR-1 por MMP-1 ocorre em sítio distinto ou não convencional ao sítio clivado por trombina, onde há a formação de um novo ligante (PRSFLLRN) gerando portanto um padrão de resposta diferente e relativamente fraco comparado a trombina. Como resultado dessa ativação em plaquetas, há a alteração de sua forma, da mesma maneira quando clivado por trombina, mas com baixa estimulação para agregação plaquetária e mobilização intracelular de cálcio, diferentemente do que foi observado quando da ativação por trombina (Trivedi et al., 2009). Em estudo conduzido por Blackburn e Brinckerhoff (2008), foi demonstrado que MMP-1 e trombina, via PAR-1, ativam de maneira diferente proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), responsáveis pela proliferação, expressão gênica,

diferenciação, mitose e apoptose de células endoteliais, onde MMP-1 precisou de mais tempo para realizar o mesmo estímulo realizado pela trombina, demonstrando que a via de ativação de PAR-1 via MMP-1 (MMP-1-PAR-1) pode alterar o fenótipo celular de uma maneira distinta da trombina.

Outra via de ativação para PAR-1 recentemente descoberta, a MMP-13, também cliva o receptor em sítio distinto da trombina e também da MMP-1, formando um novo ligante (FLLRN) que se liga irreversivelmente ao PAR-1, gerando nova sinalização celular com efeitos diferentes de MMP-1 e trombina (Austin et al., 2013). Em experimento em camundongos, Jaffré et al. (2012), observaram que MMP-13 é expressa normalmente em tecidos cardíacos de adultos saudáveis, mas é encontrada de maneira aumentada em fibroblastos cardíacos após a ativação de receptores β -adrenérgicos, uma sequela comum em indivíduos com insuficiência cardíaca. Tais resultados sugerem a participação de PAR-1 por via de ativação de MMP-13 (MMP-13-PAR-1) em episódios de insuficiência cardíaca em modelos animais, mostrando um padrão de resposta completamente diferente da ativação de PAR-1 por trombina e MMP-1. Portanto, MMP-13 mostrou-se capaz de clivar e ativar PAR-1 sobre células cardíacas, o que pode ser uma nova via patogênica que pode contribuir para insuficiência cardíaca precoce. Estes novos achados sugerem que essa nova via de ativação MMPs-PAR-1 podem apresentar uma nova correlação em vários processos patogênicos humanos (Austin et al., 2013).

2.2 INFLAMAÇÃO PERIODONTAL E PAR-1

O processo inflamatório que ocorre durante a doença periodontal é caracterizado principalmente pela presença de infiltração de leucócitos e fatores que contribuem para a migração de células responsáveis para ativar os mecanismos de inflamação, como proteases bacterianas, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, e a interação entre as respostas imunes inata e adaptativa do indivíduo (Graves, 2008). Após o estímulo gerado por proteases bacterianas,

inicialmente há uma resposta inflamatória local responsável por ativar o sistema imune inato, o que resulta na liberação de citocinas e outros mediadores, propagação da inflamação e posterior migração de células inflamatórias para o tecido afetado (Graves, 1999). Em adição aos PMNs contidos no infiltrado inflamatório, células naturais do ambiente periodontal como, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais, podem ser estimuladas por proteases bacterianas (gingipaínas), citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- α) e prostaglandinas E-2 (PGE-2) a participarem do processo de destruição tecidual causado pela doença periodontal (Page, 1991; Hung et al., 2013). Macrófagos e fibroblastos gengivais são estimulados por proteases bacterianas (LPS e gingipaínas) a expressar moléculas ativadoras de plasminogênio, inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMPs), PGE-2 e Elastase, todas moléculas envolvidas no início da degradação tecidual (Page, 1991). Ainda, gingipaínas (RgpB e HRpA) de *Porphyromonas gingivalis*, ativam eficientemente os fatores relacionados a coagulação sanguínea durante o processo inflamatório dos tecidos, onde por ação de RgpB e HRgpA, há a ativação de PAR-1 levando a agregação plaquetária (Lourbakos et al., 2001).

A trombina é a principal protease envolvida na cascata de processos da coagulação sanguínea (Coughlin, 2000), e durante o processo inflamatório dos tecidos, tem seus efeitos inflamatórios associados principalmente a ativação plaquetária, e adicionalmente, atua exercendo efeito direto nas respostas inflamatórias por meio da interação com o endotélio vascular. A trombina é ativada quando há ruptura da integridade vascular, o que permite que fatores de coagulação entrem em contato com o tecido extravascular. Assim, a cascata de coagulação sanguínea aciona um mecanismo de conversão dessa informação sob a forma de danos ao tecido ou extravasamento vascular em informação bioquímica, na forma de protease ativa de trombina, onde esta vai atuar nos mecanismos de ativação e agregação plaquetária, assim como em células endoteliais (Coughlin, 2000). Como parte desse processo, o envolvimento de PAR-1, por via de ativação por trombina no processo inflamatório tem sido alvo de estudos, assim como seus efeitos sobre células endoteliais. Contudo, a trombina atua sobre PAR-1 de células endoteliais de maneira a regular a

expressão de moléculas de adesão de leucócitos incluindo a molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1), ICAM-1 e P-selectina, todas envolvidas na formação da placa aterosclerótica (Minami et al., 2004; Croce; Libby, 2007). A trombina também pode atuar por via PAR-1 aumentando a expressão endotelial de proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), e de fator de inibição de macrófagos. Como consequência, essa via de ativação, provoca a contração de células endoteliais e o aumento da permeabilidade vascular, contribuindo assim para o processo inflamatório (Minami et al., 2004; McLaughlin et al., 2005; Croce; Libby, 2007).

A ativação de PAR-1 via trombina, atua estimulando a secreção de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), envolvido na neoformação vascular (Fälker et al., 2011) e pode ser visto em níveis aumentados em células epiteliais de sítios inflamados obtidos por meio de biópsia em pacientes com periodontite (Pinheiro et al., 2003). Além disso, em estudo *in vitro*, conduzido por Strande e Phillips (2009), foi demonstrado que em células do tecido adiposo humano, a trombina induziu, por via de ativação de PAR-1, a liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e PDGF por adipócitos e pré-adipócitos humanos, e com isso, paralelamente foi observada a liberação de citocinas e moléculas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1 por adipócitos humanos.

Em outro estudo, Ohuchi et al. (2010), também demonstraram, por meio de estudo *in vitro*, que nos fibroblastos gengivais de ratos, a trombina e um peptídeo sintético ativador de PAR-1 induzem a proliferação celular de fibroblastos gengivais mediada por endotelina-1 (ET-1), onde esta também contribui para a proliferação de fibroblastos gengivais por ligação via ETA, um tipo de receptor específico para ET-1. A ET-1 é caracterizada por ser multifuncional, podendo estar envolvida na regulação do tônus vascular, pressão sanguínea, homeostase de água e sódio, e recentemente tem sido implicada em processos inflamatórios. Alguns estudos sugerem que a ET-1 pode atuar estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Ansai et al. (2002), demonstrou que quantidades de ET-1, IL-1 β e IL-8 expressas por células

epiteliais gengivais em cultura, estavam aumentadas em presença de cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Além disso, também foi observado no mesmo estudo o aumento da expressão gênica de ET-1 (mRNA) em tecidos gengivais de pacientes adultos com periodontite em relação a pacientes periodontalmente saudáveis, podendo indicar que a expressão de ET-1 pode estar intimamente envolvida com a regulação de citocinas pró-inflamatórias.

Cisteíno-proteases bacterianas produzidas por *Porphyromonas gingivalis*, as gingipaínas (RgpB e HRgpA), podem ativar o PAR-1 em células monocíticas levando ao aumento a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Lourbakos et al., 2001) e em células plaquetárias levando à agregação plaquetária (Lourbakos et al., 2001). Giacaman et al., 2009, demonstraram em um estudo *in vitro*, que a ativação seletiva de PAR-1 em queratinócitos orais pela gingipaína Rgp aumenta a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , demonstrando assim que a gingipaína, por via de ativação de PAR-1, pode atuar estimulando e aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Ainda, Uehara et al. (2005) demonstraram que a gingipaína Rgp por meio de ativação de PAR-1 e PAR-2, estimula a produção de fator de crescimento de hepatócitos (HGF), por fibroblastos gengivais humanos. O HGF, reconhecido por ser um potente mitógeno para hepatócitos e também conhecido como “fator de dispersão”, atua como um mediador multifuncional de vários tipos de células podendo regular diversos processos biológicos, tais como, crescimento celular, mobilidade celular, morte celular por apoptose, morfogênese de hepatócitos, fibroblastos e queratinócitos (Lee et al., 2011). O HGF pode ainda aumentar a expressão e a atividade de MMPs, sugerindo seu papel na degradação tecidual (Jinnin et al., 2005). Ainda, na periodontite, a produção de HGF pode ser induzida não apenas por fatores derivados do hospedeiro como as citocinas inflamatórias, mas também por componentes bacterianos (Ohnishi; Daikuhara, 2003). Dessa forma, a concentração de HGF pode aumentar proporcionalmente com a progressão da doença periodontal e diminuir significativamente após terapia periodontal não-cirúrgica (Nagaraja; Pradeep, 2007). Segundo Xin et al. (2001), o HGF possui uma correlação positiva com o VEGF, um importante fator

angiogênico, estimulando sua produção e ajudando na formação de novos vasos sanguíneos, sendo assim essencial no processo de inflamação.

Em estudos recentes, foi demonstrado que MMP-1 e MMP-13, tem a capacidade de clivar de maneira irreversível o PAR-1 em sítios não convencionais quando comparadas a proteases regularmente envolvidas nesse processo, como trombina e gingipaína (Trivedi et al., 2009; Jaffré et al., 2012). As metaloproteinases da matriz são as principais proteases fortemente relacionadas com a destruição do colágeno durante a inflamação dos tecidos periodontais (Ingman et al., 1996). Além disso, níveis elevados de MMPs no fluido gengival têm sido demonstrados em pacientes com periodontite crônica sendo associados com a presença de inflamação e degradação teciduais (Uitto et al., 2003). Contudo, os efeitos da ativação de PAR-1 pelas MMPs nos tecidos periodontais ainda não estão devidamente esclarecidos. Recentemente, descobriu-se que a MMP-13 também tem a capacidade de ativar o PAR-1 em fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos resultando na ativação de eventos de sinalização que contribuem para a falha cardíaca. Esses diferentes padrões de sinalização gerados pela ligação de MMP-1 e MMP-13 em PAR-1, podem estar associados com a evolução de uma variedade de processos patológicos, tais como, o início de formação de trombos e trombose, aterosclerose e restenose, sepse, angiogênese, insuficiência cardíaca, e câncer (Jaffré et al., 2012; Austin et al., 2013).

Contudo, em recente estudo, Wong et al. (2010), infectaram camundongos PAR-1^{+/+} e PAR-1^{-/-}, por via oral, com cepas de *Porphyromonas gingivalis*, para a indução da doença periodontal em um modelo experimental. Após análises, não foram encontradas diferenças com relação a perda óssea alveolar entre os dois tipos de camundongos PAR-1^{+/+} e PAR-1^{-/-}, indicando que o PAR-1 não possui um papel relevante na progressão da doença periodontal. Portanto, o papel de PAR-1 nas repostas imunoinflamatórias da doença periodontal não estão esclarecidos, assim como seus mecanismos pró-inflamatórios necessitam ser melhor investigados por futuros estudos.

2.3 REPARAÇÃO PERIODONTAL e PAR-1

Os danos aos tecidos periodontais e conseqüentemente aos capilares sanguíneos presentes nos tecidos durante o tratamento periodontal cirúrgico e não-cirúrgico desencadeiam uma série de respostas inflamatórias e de reparação desses tecidos. Tal processo é caracterizado por formação de coágulos ricos em fibrina, responsáveis principalmente por unir e proteger os tecidos lesados (Martin, 1997). Ainda, os coágulos, formados pela agregação plaquetária, liderada principalmente por proteases como trombina e FXa, funcionam como um reservatório de fatores de crescimento e citocinas, como fatores de crescimento de fibroblastos tipos 1, 2 e 4 (FGF-1, FGF-2 e FGF-4), responsáveis pela proliferação fibroblástica e angiogênese, e sintetizados por macrófagos e células endoteliais; fatores de crescimento transformador $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$), sintetizados por plaquetas e macrófagos, e envolvidos principalmente na quimiotaxia para macrófagos e fibroblastos, e síntese de matriz extracelular; PDGF, sintetizado principalmente por plaquetas e macrófagos, e responsável por quimiotaxia de fibroblastos e macrófagos, proliferação de fibroblastos e síntese de matriz; VEGF, responsável pela angiogênese; e por fim, as citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , sintetizadas por neutrófilos e envolvidas no processo de ativação de macrófagos e fibroblastos. Todos esses mediadores são liberados pelo processo de degranulação das plaquetas ativadas e servem como uma matriz provisória para a migração celular, iniciando o processo de cicatrização tecidual deflagrado após o tratamento periodontal cirúrgico e não cirúrgico (Lynch et al., 1989; Postlethwaite et al., 1992; Pierce et al., 1994; Hübner et al., 1996; Aukhil, 2000).

Como conseqüência do processo de reparação dos tecidos periodontais e pela quantidade de fatores de crescimento e citocinas envolvidos nesse processo regulatório e reparativo desses tecidos, alguns estudos tem sugerido o papel do PAR-1 no envolvimento de mecanismos responsáveis pelo processo de reparação tecidual.

Pagel et al. (2009), demonstraram que a trombina induz o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), a cicloxigenase-2 (COX-2), tenascina C, FGF-1 e FGF-2, fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e expressão de IL-6 em osteoblastos normais, mas não em osteoblastos que não expressam o PAR-1. Além disso, o peptídeo sintético ativador específico do PAR-1 e a trombina induzem a liberação de PGE-2 e IL-6 por osteoblastos. Este estudo sugere que a ativação do PAR-1 pela trombina em osteoblastos resulta no aumento da expressão de múltiplos fatores de secreção responsáveis pelos estágios iniciais da cicatrização óssea. De acordo com Rohani et al. (2010), a ativação do PAR-1 pela trombina leva à indução de quimiocinas CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 e CXCL8) as quais são quimiotáticas para neutrófilos e desempenham importante papel na cicatrização tecidual.

Ainda, em estudo realizado por Song et al. (2005), cujo objetivo principal foi determinar o papel do PAR-1 no reparo ósseo, ratos que não expressam PAR-1 e ratos comuns foram analisados quanto ao reparo ósseo de defeitos ósseos cirurgicamente criados em tibia. Após 7 dias, os defeitos ósseos de ratos que não expressam PAR-1 apresentaram maior quantidade de osteoclastos quando comparados aos defeitos em ratos normais. Ainda, após 9 dias da cirurgia, a área de novo osso mineralizado foi menor no local de perfuração e na superfície periosteal adjacentes em ratos com deficiência de expressão de PAR-1 do que em ratos normais. No mesmo trabalho, em uma análise *in vitro*, a trombina causou um aumento dose-dependente na proliferação de células isoladas do estroma da medula óssea de ratos normais, o que não foi verificado em ratos com deficiência na expressão de PAR-1. A trombina estimulou a sobrevivência de células estromais da medula óssea de ratos tanto do tipo selvagem quanto dos que não expressavam PAR-1, mas não afetou a migração de células da medula óssea ou de células estromais em ambos os ratos. Com isso, os resultados indicam que o PAR-1 desempenha um papel no início da reparação óssea.

A osteoclastogênese, processo responsável pela reabsorção e remodelação do tecido ósseo, realizado por células osteoclásticas é regulado

principalmente por dois tipos de citocinas, fator estimulador de colônias – macrófago (M-CSF), e receptor ativador de fator kappa nuclear B ligante (RANKL), essa última, parte essencial na ativação da atividade de osteoclastos (Udagawa et al., 1999). Ainda, por através de RANK, receptor presente na superfície de osteoclastos não maduros, ocorre a ligação RANK-RANKL, dando início ao processo de atividade osteoclástica (Yasuda et al., 1999). Por fim, tal atividade é contrabalanceada por osteoprotegerina (OPG), a qual inibe a ação de RANKL, sendo esse sistema OPG / RANKL / RANK responsável pela homeostase da atividade de reabsorção óssea (Simonet et al., 1997). Em estudo *in vitro*, Arayatrakoolikit et al. (2008), demonstraram que a ativação de PAR-1 pela trombina induz a síntese de (OPG), portanto, os resultados deste estudo sugerem que a trombina, através da ativação de PAR-1, pode desempenhar um papel significativo na reparação óssea alveolar e homeostase do tecido periodontal, através do sistema OPG / RANKL / RANK.

Alguns estudos indicam que a ativação de PAR-1 via trombina atua estimulando a produção de VEGF, o qual além de exercer importante papel na neoformação vascular (Ma et al., 2005; Liu et al., 2006), também tem sido sugerido como um importante regulador no processo de remodelação óssea por atração de células endoteliais e osteoclásticas, e pela estimulação da diferenciação de osteoblastos e indução da atividade de fosfatase alcalina, essenciais no processo de neoformação óssea (Deckers et al., 2000). Em estudo realizado por Ma et al. (2005), foi investigada a resposta de PAR-1 na liberação de VEGF por plaquetas humanas, onde por intermédio de um agonista específico para PAR-1 (TFLLR-NH2) foi verificada a liberação de VEGF e a supressão de endostatina, um potente inibidor angiogênico.

Contudo, de acordo com os dados disponíveis na recente literatura, pode-se concluir que o PAR-1 e seus mecanismos de ativação parecem ter importante papel na cicatrização tecidual periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

O **objetivo principal** deste estudo foi avaliar a associação do receptor ativado por protease do tipo 1 com a periodontite crônica.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1:

Este estudo avaliou a expressão gênica de PAR-1 (mRNA), pela técnica de qPCR, em células creviculares de sítios periodontais de indivíduos com periodontite crônica antes e após terapia periodontal básica e as comparou com a expressão em indivíduos periodontalmente saudáveis.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

O segundo objetivo deste estudo foi avaliar quais tipos celulares expressam o PAR-1, determinado pela técnica de microscopia celular e citometria de fluxo, em fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3:

O terceiro objetivo deste estudo foi detectar, pelo uso de ensaio Bio-plex, os níveis salivares de interleucinas do tipo 6 e 8 (IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), metaloproteinases de matriz tipo 1, 2, 8 e 13 (MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-13) de pacientes com periodontite crônica submetidos a terapia periodontal não-cirúrgico, de maneira a correlacionar sua presença com a expressão do PAR-1 nas células creviculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram avaliados e selecionados pacientes que se apresentaram para tratamento clínico geral na clínica odontológica da Disciplina de Periodontia do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por meio de anamnese, e exame clínico periodontal. De acordo com os critérios de inclusão pré-estabelecidos, foi realizada a seleção adequada dos pacientes para o presente estudo. Foram incluídos 37 pacientes que apresentaram sítios periodontais saudáveis (ausência clínica de inflamação ou de história pregressa de doença periodontal) e 38 pacientes com periodontite crônica moderada (presença de inflamação gengival, perda de inserção de tecido conjuntivo e perda óssea), com pelo menos um sítio de destruição periodontal de grau moderado (avaliados clínica e radiograficamente) por quadrante, totalizando 75 pacientes selecionados ($n_f=75$). Os parâmetros clínicos periodontais foram associados com a expressão gênica do receptor PAR-1 em células creviculares (avaliados por qPCR) e a identificação dos níveis salivares de interleucinas do tipo 6 e 8 (IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α), interferon do tipo γ (IFN- γ), metaloproteinases de matriz tipo 1, 2, 8 e 13 (MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-13), de maneira a correlacionar sua presença com a expressão do PAR-1 antes e após tratamento periodontal não-cirúrgico (figura 4.1).

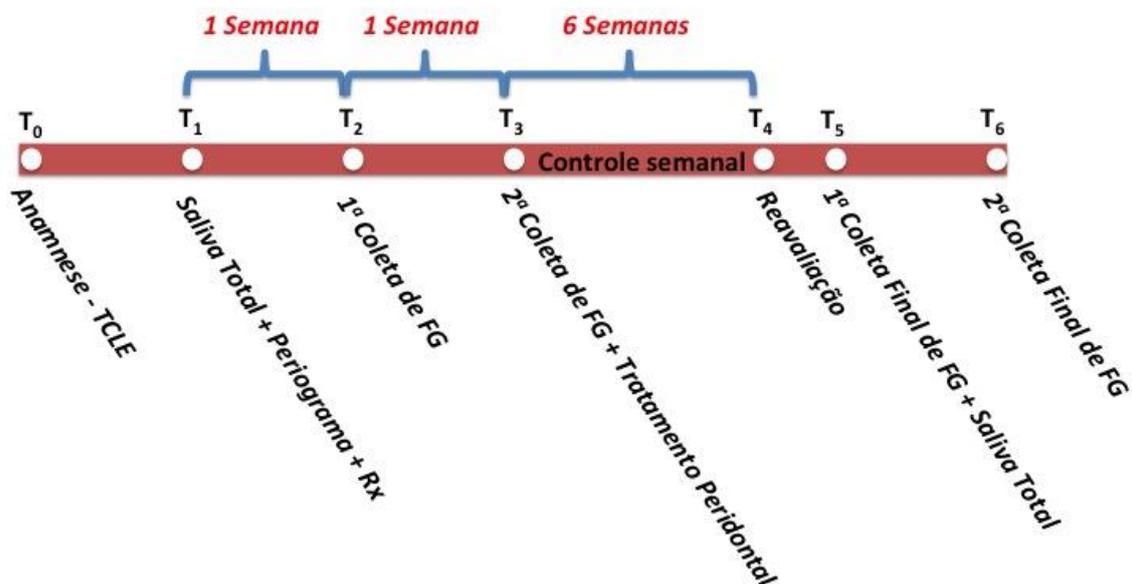


Figura 4.1 - Cronograma de execução

4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Os pacientes, de ambos os sexos e nunca fumantes, com idade entre 30 e 65 anos, apresentando boa saúde geral, foram selecionados de acordo com critérios de exclusão pré-estabelecidos. Para isso, foi realizada a anamnese (ANEXO C) e foram excluídos do presente estudo os pacientes que apresentaram algumas das características como: fazer uso de aparelho ortodôntico; necessidade de medicação antibiótica prévia ao tratamento dental; uso de antibióticos, fenitoína, antagonistas de cálcio, ciclosporina ou drogas anti-inflamatórias 3 meses antes da consulta inicial; uso de contraceptivos orais ou de reposição hormonal, história de diabetes, hepatite ou infecção por HIV ou qualquer outra doença que comprometa as funções imunes; gravidez ou lactação; quimioterapia imunossupressora e/ou tratamento periodontal nos 6

meses antecedentes ao início do estudo. Após terem sido apropriadamente informados sobre a natureza do estudo, os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B) previamente aprovado pelo CEP da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP FOU SP nº106/2010) (ANEXO A). Os pacientes foram submetidos à terapia odontológica geral e periodontal nas clínicas de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, de acordo com as necessidades apresentadas.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA - SELEÇÃO DOS SÍTIOS PERIODONTAIS

Os pacientes foram clinicamente avaliados por um periodontista previamente treinado e calibrado (MHC). Da amostra, 10% foram examinados duas vezes para cada um dos critérios clínicos avaliados, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador aferida pela estatística de Kappa (0.92). Foram determinados o índice de placa e o índice gengival (Løe, 1967), medidas de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem em 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, utilizando-se uma sonda periodontal manual (PCPUNC 15, Hu-Friedy, Chicago, USA). O sangramento à sondagem foi determinado dicotomicamente pela presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado durante 30 segundos após a primeira inserção da sonda na bolsa periodontal (Van der Velden et al., 1985). As mensurações obtidas foram anotadas em ficha clínica periodontal (vide modelo de ficha em ANEXO D).

A presença de indivíduos contendo pelo menos 18 dentes, 30% ou mais dos sítios com presença de sangramento a sondagem, pelo menos 20% dos sítios com presença de profundidade clínica de sondagem igual ou superior a 4mm, 10% ou mais dos sítios com perda clínica de inserção interproximal de pelo menos 2% foram diagnosticados como doença periodontal. Este critério

estabelecido por Mirrielees et al. (2010), foi escolhido para a definição clínica de pacientes que apresentam doença periodontal inequivocamente. Ainda, indivíduos contendo pelo menos 18 dentes, com níveis inferiores a 10% dos sítios com sangramento a sondagem, inferiores a 2% dos sítios com profundidade clínica de sondagem superior ou igual a 5mm, e menos de 1% dos sítios com perda clínica de inserção de até 2mm foram considerados periodontalmente saudáveis. Desta forma, os indivíduos foram subdivididos em dois grupos: (i) controle e (ii) periodontite crônica.

4.4 TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICO E REAVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Em ambos os grupos, os pacientes foram tratados por 2 operadores especialistas em Periodontia (VTEA e HABS). Os pacientes do grupo controle receberam profilaxia oral e orientações de higiene oral. Os pacientes portadores de periodontite crônica receberam tratamento periodontal não-cirúrgico, o qual foi composto de:

1. Instrução de higiene oral para controle de placa bacteriana e remoção de cálculo supragengival com o uso de ultra-som;
2. Eliminação de fatores iatrogênicos (restaurações, próteses, se necessário);
3. Raspagem, alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual e uso de ultra-som por sextante, totalizando de 4 a 6 sessões, concluídas em 2 a 3 semanas;
4. Integração clínica (restauração provisória de cáries, extração de dentes condenados, se necessário);
5. Controle semanal de biofilme até o período de reavaliação;
6. Revisão dos procedimentos básicos.

Foram realizadas de quatro a seis sessões definidas de acordo com as características e condições apresentadas por cada paciente. Finalizada a fase dos procedimentos básicos, deu-se início a fase do pós tratamento, por um período de 6 semanas (Segelnick; Weinberg, 2006). Dentro deste período, os pacientes receberam controle de placa bacteriana profissional semanal (orientação de higiene bucal, raspagem e profilaxia supra gengival) até o momento da reavaliação. Na reavaliação, os pacientes foram reexaminados com os mesmos parâmetros clínicos inicialmente feitos conforme a avaliação clínica acima descrita. Neste momento, foi verificado se os pacientes apresentaram controle de placa satisfatório e ausência de inflamação dos tecidos periodontais. Os pacientes que não se encaixaram neste perfil foram excluídos do estudo.

4.5 COLETA DE AMOSTRA DE FLUÍDO GENGIVAL

Foi realizada a coleta de amostra de fluído gengival nos sítios periodontais de pacientes controle e nos sítios de pacientes com doença periodontal antes e após 6 semanas do término da terapia periodontal não-cirúrgico. Após a remoção da placa supragengival com uma cureta periodontal, os sítios foram isolados com rolos de algodão estéreis e um sugador de saliva foi utilizado para diminuir o risco de contaminação salivar. Os dentes foram delicadamente secos com jato de ar por 10 segundos. Foi utilizado um filtro especial para fluido gengival, perio-paper (Periopaper Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA), que após o isolamento do campo foi introduzido no sulco gengival/bolsa periodontal onde permaneceu por durante 30 segundos. Para a coleta com perio-paper, foram escolhidos 4 sítios de cada indivíduo, onde pacientes do grupo PC, tiveram o sítio mais profundo ($4\text{mm} \leq \text{PD} \leq 6\text{mm}$) de cada quadrante escolhido para a coleta. Em adição, no grupo Controle, um sítio sem perda de inserção clínica foi selecionado por quadrante para a coleta de FG em pacientes controle. O perio-paper foi colocado em tubos (Eppendorf) contendo 400 μl de solução tampão fosfato (pH 7,4), os quais foram agitados em vortex por 30 segundos. As

amostras foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada por 10 minutos a 6000g, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. O precipitado foi armazenado a -80°C em tubos codificados contendo 1ml de reagente estabilizador de RNA, Tri-Reagente (Sigma, USA) para posterior realização das análises pretendidas.

Para a contagem diferencial de células do fluido gengival em câmara de Neubauer por intermédio de microscopia de luz e análise por citometria de fluxo, para a determinação da imunolocalização do receptor nas células do fluido gengival, foi realizado o método de lavagem intracrevicular modificado (Salonen; Paunio, 1991), com a seleção de 10 pacientes com periodontite crônica (n=10) pertencentes ao grupo PC e 7 pacientes periodontalmente saudáveis do grupo Controle (n=7) para as análises. Em pacientes do grupo PC, 6 sítios foram escolhidos para a coleta de FG, onde no mínimo 1 sítio por quadrante foi selecionado. Adicionalmente, em indivíduos do grupo Controle, foram selecionados para a coleta 10 sítios sem perda clínica de inserção, com no mínimo 1 sítio por quadrante selecionado. Tal diferença na quantidade de sítios selecionados se deu, devido a fase de padronização da técnica, onde houve uma diferença significativa do número de células viáveis conseguidas nos dois grupos, havendo a necessidade de se estabelecer um número equivalente ou mínimo de células para as análises em citômetro de fluxo. Brevemente, este método foi realizado por intermédio de utilização de uma seringa de injeção de 1mL (Becton, Dickinson and Company, EUA) acoplada a uma microcânula flexível plástica (Tygon®, Saint-Gobain Performance Plastics, Akron, OH, USA). A introdução da microcânula foi realizada delicadamente no sítio alvo e a ejeção de 100µL de solução PBS, pH 7,2 (PBS, pH 7,2 Gibco®, Invitrogen) foi feita por 5 vezes seguidas, totalizando 500µL de solução injetada em cada sítio. Simultaneamente, foi utilizada outra seringa (Becton, Dickinson and Company EUA, 1mL) para a aspiração do lavado da técnica e depósito em tubo do tipo Falcon 15ml (Biolix, EUA) estéril. Após o processo, o material coletado foi acondicionado em gelo picado e levado imediatamente para análise laboratorial.

4.6 COLETA DE AMOSTRA DE SALIVA TOTAL

As amostras de saliva total foram coletadas de pacientes no período da manhã antes do exame periodontal. Os pacientes fizeram bochecho com água destilada por 1 minuto e, em seguida, a saliva não estimulada foi coletada por durante 5 minutos (Dawes, 1987). As amostras foram colocadas em tubo tipo Falcon de 15ml e armazenadas a -80°C para subsequente análise laboratorial.

4.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PAR-1 POR REAL TIME-PCR

A expressão gênica do receptor PAR-1 presente em amostras de fluido gengival, antes e pós-tratamento periodontal básico, foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) nas amostras de fluido gengival.

4.7.1 Extração do ácido ribonucléico total (tRNA)

O RNA total (tRNA) foi obtido pela homogeneização das amostras do fluido gengival em Trizol [isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol Invitrogen Brasil LTDA (1mL/100µL de amostra)]. Após a homogeneização as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e, então, centrifugadas a 12000g (15 min, 4°C - Eppendorf Centrifuge 5417 R – Eppendorf, Califórnia, EUA). Posteriormente, 0,8mL da fase superior foi transferida para um novo tubo no qual foi adicionado 0,2mL de clorofórmio. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão, os tubos foram deixados em repouso por 2-3 min à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugados a 12000g (15 min a 4°C). A fase aquosa sobrenadante (≈600 µL) foi, então, separada para novo tubo.

4.7.2 Precipitação do tRNA

O tRNA foi precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol 100% para cada volume de sobrenadante. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão os tubos foram incubados por 10 min a temperatura ambiente , então, centrifugados a 12000g (10 min a 4°C).

4.7.3 Lavagem do tRNA

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

4.7.4 Digestão do DNA

Para a digestão do DNA, os pellets secos foram ressuspendidos em 43,5 µL de água DEPC inativa 0,01%. Posteriormente, 6,5µL do mix para digestão do DNA foram adicionados (5µL do Tampão 10X, 0,5µL de inibidor de RNase e 1µL de DNase I – Invitrogen Brasil LTDA), sendo o volume final de 50µL. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, foi

adicionado 1µL de solução de parada (EDTA 25mM) e em seguida a re-extração do tRNA foi realizada.

4.7.5 Re-extração do tRNA

Para a re-extração do tRNA foi adicionado 50µL de água DEPC inativa 0,01% às amostras previamente submetidas ao ensaio de digestão do DNA. Posteriormente, foram adicionados 200µL da mistura fenol saturado em tampão (Invitrogen Brasil LTDA) / clorofórmio 1:1 e, após agitação por inversão, incubados por 2-3 minutos a temperatura ambiente; por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000g (15 min a 4°C). A seguir, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e adicionados 200µL de isopropanol 100% (para nova precipitação do RNA). Após agitação por 15 seg e incubação por 10 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000g (10 min a 4°C), sendo o sobrenadante, então, descartado (vertido). Posteriormente foi adicionado 500µL de etanol 100% (para lavagem do pellet), as amostras centrifugadas a 7600g, (5min, 4°C) e o sobrenadante foi novamente descartado (vertido). Foi adicionado então, 500µL de etanol 75% (para lavagem do pellet) precedendo nova centrifugação a 7600g, (5min, 4°C), bem como nova remoção do sobrenadante, e adicionado por fim 500µL de etanol 75%, com posterior congelamento das amostras a -20°C.

4.7.6 Quantificação do tRNA

Para a quantificação do tRNA, as amostras contendo etanol 75% foram centrifugadas e o pellet de tRNA foi seco. Posteriormente, o pellet de tRNA foi ressuscitado em volume adequado (≈20-30µL) de água DEPC inativa 0,01%. As absorbâncias foram então medidas a 260 nm em espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer – Eppendorf, Califórnia, EUA), sendo as

concentrações de tRNA calculadas considerando a relação $1\text{AU} = 40 \mu\text{g/mL}$, conforme a fórmula:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ mL}] = \text{Abs} \times \text{Fator de diluição} \times 40$$

Foram consideradas adequadas aquelas razões $260^{\text{RNA}}/280^{\text{PROT}}$ entre 1,8 e 2,0.

4.7.7 Integridade do tRNA

A integridade do tRNA isolado foi verificada através da eletroforese em gel de agarose 1% diluído em tampão TRIS acetato EDTA, contendo $2\mu\text{L}/100\text{mL}$ de brometo de etídio ($0,5\mu\text{g/mL}$), Invitrogen Brasil LTDA, aplicando-se em cada poço (“lane”), $5\mu\text{L}$ de uma solução contendo: $0,5\mu\text{L}$ de amostra de RNA; $3,5\mu\text{L}$ de H_2O DEPC 0,01% e $1\mu\text{L}$ de tampão de amostra (contendo glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25% e 1mM de EDTA pH 8,0), fixando-se uma voltagem de 70 V por aproximadamente 1 h (até correr 2/3 do gel).

Posteriormente, os géis foram revelados sob luz ultravioleta (UV) e as imagens capturadas com detector de imagem Chime-Imager 5500 - Alpha innotech Corporation. O tempo de exposição foi ajustado pela autoexposição do aparelho (exposição normal para saturação da imagem em torno de alguns milissegundos). Por fim, foram visualizadas as bandas 28S e 18S, indicadoras da integridade do RNA.

4.7.8 Reação de Transcrição do Ácido Desoxirribonucléico complementar (cDNA)

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

A mistura foi posteriormente homogeneizada e incubada a 42°C durante 50 min em banho-maria, e incubada a 70°C durante 15 min em banho-maria para inativação da enzima. As amostras foram, então, mantidas a -20°C até serem submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR).

4.7.9 Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (Real time PCR)

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (real time PCR) foi realizada em um volume final de 12,5µL contendo 1µL de cDNA (transcrito anteriormente), 0,5µL do oligonucleotídeo sense (10^{-5} M), 0,5µL do oligonucleotídeo antisense (10^{-5} M); 4,25µL de H₂O DEPC autoclavada e por fim 6,25µL de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), o qual contém Platinum[®] Taq DNA polimerase, corante SYBR[®] green I, TRIS-HCl, KCl, 6mM MgCl₂, 400µM dGTP, 400µM dATP, 400µM dCTP, 800µM dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e agentes estabilizadores.

Os oligonucleotídeos para o PAR-1 foram extraídos do GenBank e desenhados com o auxílio do software Primer3. As seqüências geradas no programa Primer3 também foram analisadas no Blast quanto à especificidade e tamanho do fragmento. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cDNA, bem como o número de acesso ao GeneBank são apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Sequência de primers usados para amplificação do cDNA

GENE	Sequências Forward (F) e Reverse (R)	GenBank	Tamanho
PAR ₁ (F)	5'-AGTCTGTGCGGCCCGCTGTT-3'	NM_001992.3	90pb
PAR ₁ (R)	5'-AAATGACCGGGGATCTAAGGTGGCA-3'		
GAPDH (F)	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'	NM_002046	80pb
GAPDH (R)	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'		

As condições do PCR utilizadas para amplificar GAPDH e o PAR-1 foram: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C; seguindo-se 40 ciclos na seguinte seqüência: 15 s a 95°C, 1 min a temperatura de anelamento (ver tabela acima), e 20 s a 72°C. Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Austrália). A expressão gênica foi quantificada utilizando o cálculo do ΔC_t ("cycle threshold"). A expressão do gene GAPDH foi utilizada como controle interno (housekeeping) para normalização das amostras. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias referente à variação da taxa de indução (fold increase) em relação ao grupo controle (normalizadas pelo GAPDH).

4.7.10 Análise dos produtos da Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (Real time PCR)

A análise da expressão dos produtos da reação em cadeia de polimerase em tempo real (real time PCR) foi realizada através da especificidade da reação com SYBR green confirmada pela curva de dissociação. A linearidade e eficiência do teste foram avaliadas previamente através da curva de diluição da amostra, pois se partindo do princípio que os “amplicons” duplicam-se a cada ciclo foi possível determinar a eficiência de cada reação calculando-se a inclinação (slope) da curva padrão. As reações foram consideradas aceitáveis quando apresentaram inclinação e eficiência próximas ao ótimo (-3,322 e 1 respectivamente). Este procedimento indica a eficiência dos oligonucleotídeos e a melhor diluição do produto de RT para utilização nos ensaios.

4.8 DETECÇÃO DOS NÍVEIS SALIVARES DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

Um kit de ensaio de citocina do tipo Bio-Plex (Human Versamap multiplex system development, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foi utilizado para determinar os níveis salivares de IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-13. O experimento foi realizado em duplicata através do sistema Bio-Plex (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad, EUA), e os dados foram analisados com o auxílio do software Bio-Plex Manager, versão 4.0.

4.9 CONTAGEM DE CÉLULAS EPITELIAIS E NEUTRÓFILOS NO FLUIDO GENGIVAL

Após a coleta do fluido gengival pela técnica de lavagem intracrevicular com 500µL de solução PBS, pH 7,2, a solução foi depositada em tubos do tipo Falcon estéreis, e foi realizada agitação em um vortex por durante 20 segundos. Para a contagem de células e confecção das lâminas os tubos Falcon com as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, 4°C, por durante 5 minutos e a solução ressuspensa em 200µl de solução PBS, pH 7,2, para a homogeneização das amostras.

Para contagem celular, para determinação dosagem de anticorpos para posterior análise em citômetro de fluxo, 10µl da solução de amostras foram colocados em uma câmara de Neubauer e Thomas. Para a contagem diferencial de células, 30µl de solução foram depositadas em microcentrífuga (Cytospin, Thermo Scientific Shandon) para a adesão celular em lâminas, e a contagem foi realizada em microscopia de luz com um aumento de 100x. Foram contadas ao todo 300 tipos celulares em cada lâmina, diferenciando neutrófilos de células epiteliais por suas características morfológicas e determinando sua proporção para cada indivíduo.

4.10 ANÁLISE DO PAR-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO DO FLUIDO GENGIVAL

A técnica de citometria de fluxo foi usada para detectar a expressão de PAR-1 na superfície de células de FG. As amostras de FG foram coletadas pela técnica de lavagem intracrevicular (Salonen e Paunio, 1991) e depositadas em tubos Falcon 15ml para realização das análises. As amostras foram centrifugadas a 1800 rpm, 4°C, por durante 10 min, e ressuspensas em 200µl de PBS (pH 7,2, Gibco Invitrogen®). 10µl de cada amostra foram usadas para

realizar a contagem de células utilizando uma câmara de Neubauer. Após a realização da contagem celular total de cada amostra, as células contidas nas amostras foram incubadas com 2,5µl de solução (Human TruStain FCX™, 5µg/ml, BioLegend, Califórnia, EUA) de bloqueio para ligações inespecíficas e mantidas em gelo picado por durante 10 min em câmara escura. Após o período de incubação, as amostras passaram pelo processo de lavagem com PBS, pH 7,2, e foram novamente incubadas por 45 min em câmara escura e mantidas em gelo picado com os anticorpos específicos. Foram adicionados em cada amostra a ser analisada por citometro de fluxo, 2µl de anticorpo específico para células epiteliais (Citokeratin 19, PerCP, 200µg/ml), receptor de PAR-1 (Thrombin R/ATAP2, FITC, 200µg/ml), e 1,5 µL de anticorpo para os leucócitos (CD45, PE, 200µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) de acordo com a fase de padronização da técnica prévia ao estudo. Após novo processo de lavagem com PBS, pH 7,2, as amostras foram imediatamente submetidas a aquisição por citometria de fluxo, utilizando o citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton, Dickinson Company, EUA). Para cada amostra analisada, até 10.000 eventos foram adquiridos e os eventos registrados foram analisados usando o software da Cell Quest (Becton Dickinson Company, EUA). A expressão de PAR-1 em células epiteliais e leucócitos foi determinada como a porcentagem de células positivas (%).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t pareado foi utilizado para realizar as comparações entre os grupos, antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico. As diferenças entre o grupo Periodontite Crônica e grupo Controle foram analisados pelo teste t não pareado. Para a análise de correlação de risco foi utilizado o teste de correlação linear. Por fim, o coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para calcular as correlações bivariadas entre as co-variáveis PAR-1 (mRNA) e PS, PAR-1 (mRNA) e NCI, e PAR-1 (mRNA) e níveis dos biomarcadores salivares.

A análise e gráficos deste estudo foram realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 4.0. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os dados são expressos como média \pm de desvio padrão (DP).

5 RESULTADOS

Entre julho de 2010 a abril de 2013, um total de 418 pacientes foram triados no serviço de clínica odontológica da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Entre os pacientes submetidos a triagem para o presente estudo, 87 eram fumantes, 60 possuíam alguma doença ou condição sistêmica que poderia interferir na doença periodontal, 2 pacientes estavam gestantes ou lactantes, 29 já haviam feito tratamento periodontal prévio em período inferior a 6 meses, 81 faziam uso de fármacos que poderiam interferir na doença periodontal, 79 indivíduos não apresentavam o padrão de periodontite crônica estabelecido para esse estudo e 5 indivíduos estavam em tratamento ortodôntico. Para a realização do presente estudo, de um universo de 418 pacientes triados, 38 pacientes com periodontite crônica moderada generalizada foram selecionados (PC), e 37 indivíduos considerados periodontalmente saudáveis, foram selecionados para o grupo Controle (C).

5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS

De acordo com a tabela 5.1, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo PC e C no que diz respeito à média de idade ($p=0,77$). Antes da realização do tratamento periodontal não-cirúrgico em pacientes do grupo PC, foi verificado que os valores médios de PS, NCI, SS, IP e IG apresentaram-se estatisticamente superiores ($p<0,0001$) quando comparados com indivíduos do grupo C, e que após o tratamento periodontal não-cirúrgico, os indivíduos apresentaram uma melhora significativa de todos os parâmetros clínicos em relação ao início do tratamento (PCT contra PC, $p<0,0001$). No entanto, o grupo PCT apresentou valores médios para os parâmetros clínicos avaliados superiores aos valores do grupo controle (PS, NCI, IG, $p<0,0001$, SS, $p=0,0017$, e IP, $p=0,0407$).

Tabela 5.1 - Parâmetros clínicos e demográficos do Grupo Periodontite Crônica (PC) (n=38) no início do estudo e 6 semanas após o Tratamento Periodontal Não-Cirúrgico (PCT) comparado ao Grupo Controle (C) (n=37)

Características	Grupos (Média ± DP)		
	Periodontite Crônica Moderada (PC)	Controle (C)	
N	38	37	
Idade (anos)	42.87 ± 11.50 ^{NS}	44.37 ± 12.94	
Gênero (masculino/feminino)	19/19	18/19	
Parâmetros Clínicos	Início do Estudo	Pós Tratamento	
Profundidade sondagem (mm)	3.15 ± 0.57 ^a	2.23 ± 0.25 ^{a, b}	1.83 ± 0.25
Nível clínico de inserção (mm)	3.85 ± 0.61 ^a	3.40 ± 0.54 ^{a, b}	2.06 ± 0.34
Sangramento a sondagem (%)	62.78 ± 22.42 ^a	10.77 ± 8.48 ^{a, b}	3.06 ± 2.53
Índice de placa	1.24 ± 0.33 ^a	0.22 ± 0.25 ^{a, b}	0.14 ± 0.09
Índice gengival	1.66 ± 0.34 ^a	0.53 ± 0.36 ^{a, b}	0.06 ± 0.06

N, número de participantes; DP, desvio padrão

^{NS} Sem diferença estatisticamente significativa comparado ao Grupo Controle.

^a Diferença estatisticamente significativa comparado ao Grupo Controle, p<0.05.

^b Diferença estatisticamente significativa comparado ao Início do Estudo, p<0.0001.

5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE PAR-1 (mRNA)

De acordo com a figura 5.1, a expressão gênica de mRNA PAR-1 em pacientes do grupo PC em células do FG, foi significativamente menor quando comparados aos níveis de PAR-1 em pacientes do grupo C (p=0,0003). Após o tratamento periodontal não-cirúrgico desses pacientes e o seu período de reavaliação (45 dias), os níveis de mRNA PAR-1 (PCT) foram duplicados ou significativamente aumentados quando comparados ao início do tratamento periodontal não-cirúrgico (p<0,05). Ainda, foi verificado um aumento estatisticamente significativo desses níveis quando comparados a indivíduos do grupo C (p<0,05). Além disso, uma forte correlação negativa entre mRNA PAR-1 e PS média (r=-0,66, p<0,0001) e NCI média (r=-0,67, p<0,0001) foi vista.

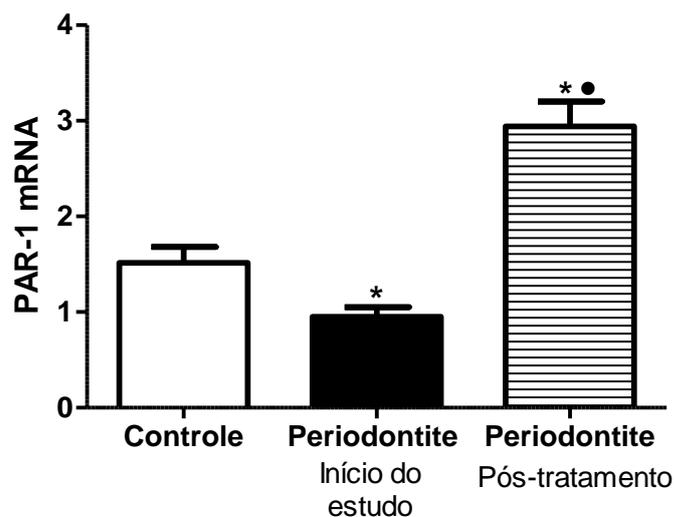


Figura 5.1 - Expressão gênica de PAR-1 (mRNA) nos grupos C, PC e após tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT) (*diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle; *diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo periodontite crônica; $p < 0,05$)

5.3 ANÁLISE DE PAR-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Na figura 5.2, as populações de células do FG, tratadas apenas com anticorpos para bloqueio de ligações inespecíficas (Human TruStain FCX™, 5µg/ml, BioLegend, Califórnia, EUA) e não tratadas com anticorpos específicos foram determinadas para cada indivíduo submetido a análise por citometria de fluxo (controle negativo). Após a determinação desses controles, amostras do mesmo indivíduo foram tratadas com anticorpos específicos para a determinação da expressão de PAR-1 em células epiteliais e leucócitos e descontadas dos dados do controle negativo para cada indivíduo, onde foi determinada a população (%) de células epiteliais e leucocitárias que expressam PAR-1 em suas superfícies.

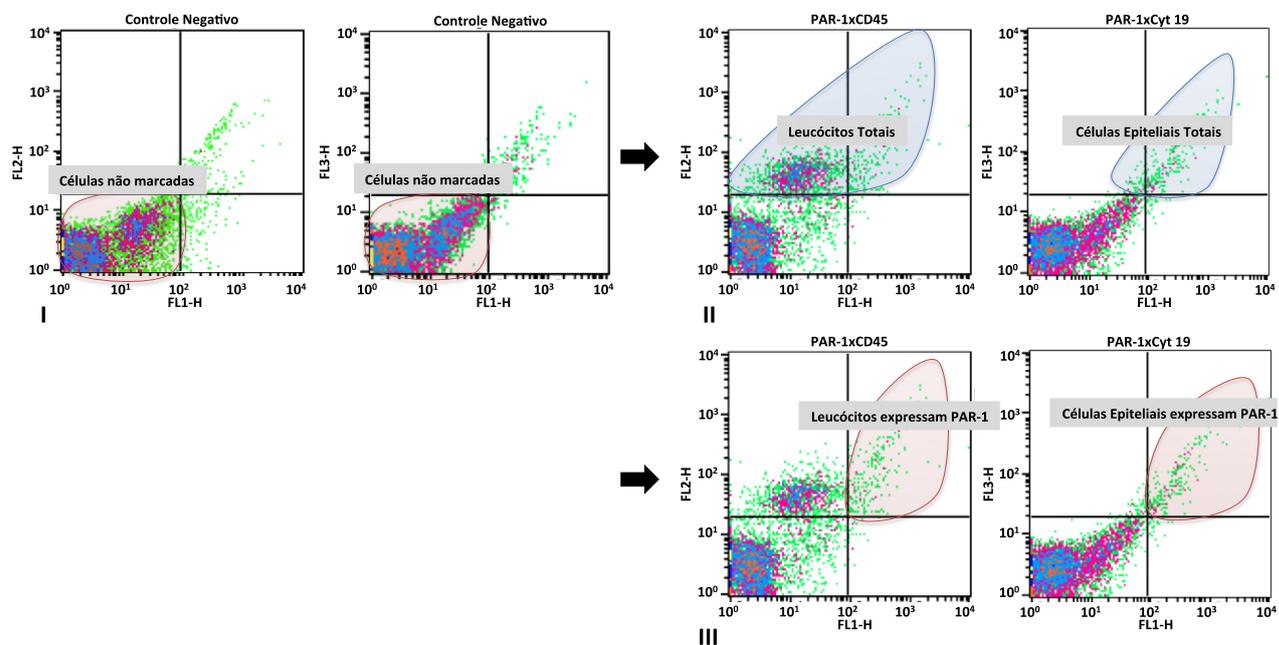


Figura 5.2 - Dados representativos ilustrando as estratégias de aquisição para análise por citometria de fluxo. Células do FG sem marcação foram usadas para determinar o controle negativo (I). Total de leucócitos (PAR1 x CD45) e células epiteliais (PAR1 x Cyt19) na mesma amostra (II). Expressão de PAR-1 em leucócitos (painel da esquerda) e células epiteliais (painel da direita) (III)

Na figura 5.3, a análise de citometria de fluxo demonstrou que pacientes do grupo PC demonstraram níveis menores de leucócitos que expressam PAR-1 quando comparados com os pacientes do grupo C ($p < 0,001$). Ainda, de maneira interessante, não foram encontradas diferenças entre os pacientes periodontalmente saudáveis e pacientes do grupo PC no que diz respeito à porcentagem de células epiteliais que expressam PAR-1 e que grande parte da população de células epiteliais demonstram expressar PAR-1, o que não foi observado na população de leucócitos (Figura 5.3).

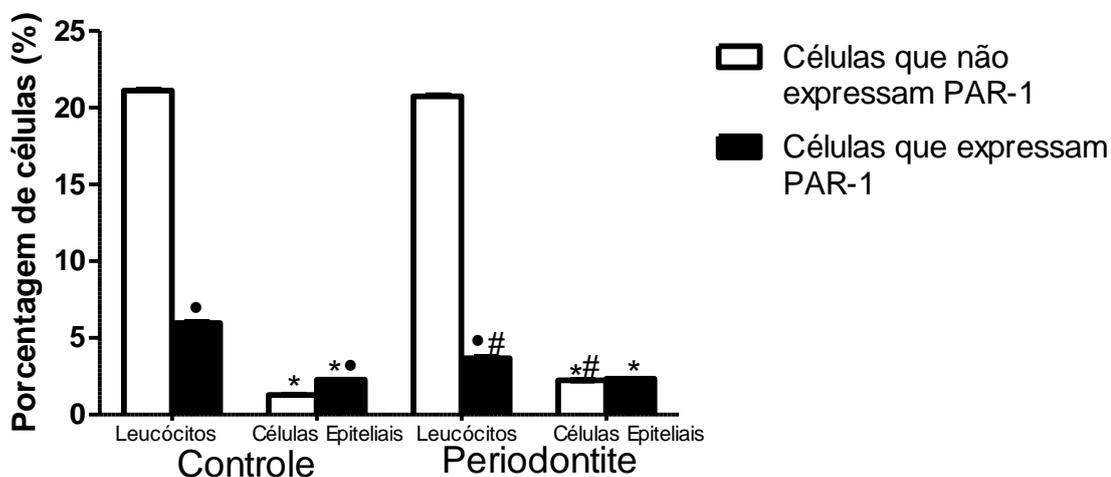


Figura 5.3 - Porcentagem de leucócitos e células epiteliais que expressam PAR-1 nos grupos C e PC (*diferença estatisticamente significante comparado aos leucócitos; •diferença estatisticamente significante comparado as células que não expressam PAR-1; #diferença estatisticamente significante comparado ao grupo Controle; $p < 0,05$)

A figura 5.4 demonstra um exemplo da população celular de pacientes do grupo PC (A, B, C e D) e pacientes do grupo C (E, F, G e H). Onde nas figuras A e C (PC), e figuras E e G (C) é possível identificar os experimentos de controle negativo, sem a marcação celular para as células alvo. E nas figuras B e D (PC), e figuras F e H (C) é possível visualizar a população de células marcadas com anticorpos específicos, onde Q₁ corresponde a população de células epiteliais (Figuras D e H) ou leucócitos (Figuras B e F) que não expressam PAR-1, e Q₂

corresponde a população celular de células epiteliais e leucócitos que expressam PAR-1 nas mesmas figuras. Por fim, a população total de células epiteliais ou leucócitos é representada pela soma de Q_1 e Q_2 . Ainda, pode-se notar um perfil diferente da população celular de indivíduos dos dois grupos, onde a população de células de indivíduos do grupo C (Figuras E, F, G e H) parece ser mais homogênea e com menor número de células, principalmente leucócitos, quando comparados com indivíduos do grupo PC (Figuras A, B, C e D)

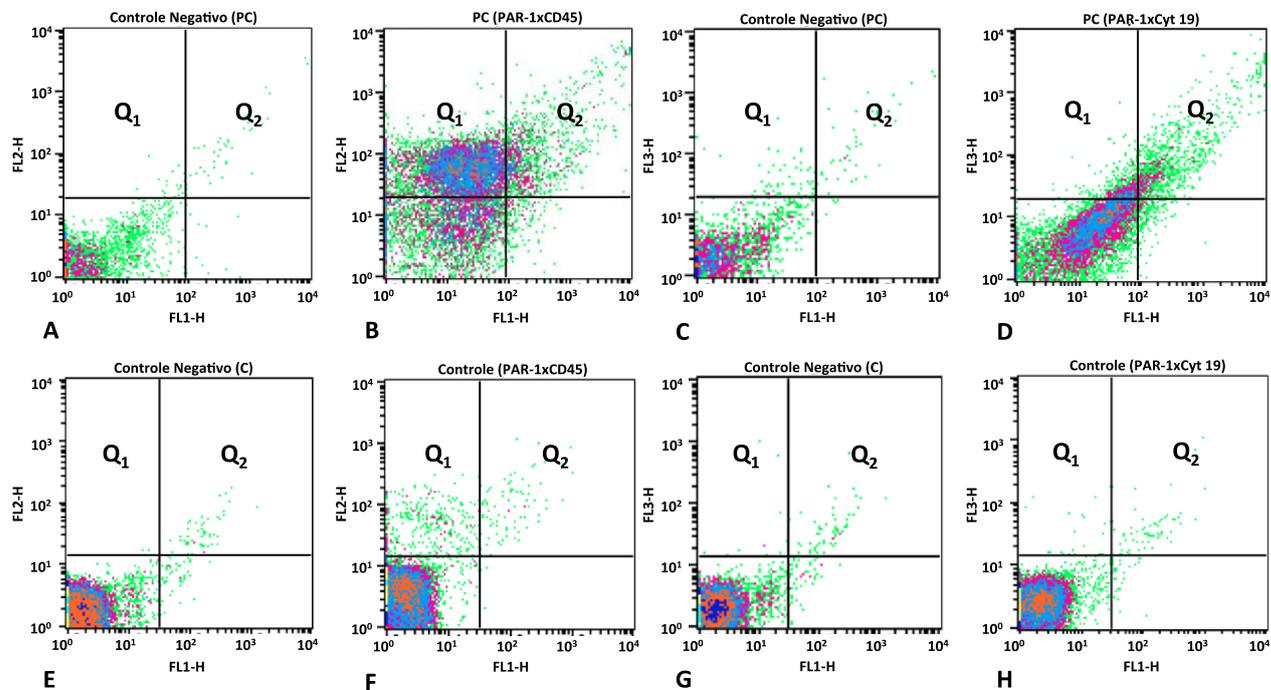


Figura 5.4 - Esquema representativo dos dados de citometria de fluxo para avaliação das células que expressam PAR-1 (leucócitos e células epiteliais), em FG de pacientes do grupo PC (A, B, C e D) e C (E, F, G e H). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo PC sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (A e C). Representação de leucócitos que não expressam PAR-1 (Q1) e leucócitos que expressam PAR-1 (Q2) no grupo PC (B). Células epiteliais que não expressam PAR-1 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR-1 (Q2) no grupo CP (D). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo Controle sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (E e G). Leucócitos que não expressam PAR-1 (Q1) e leucócitos que expressam PAR-1 (Q2) no grupo de Controle (F). Células epiteliais que não expressam PAR-1 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR-1 (Q2) no grupo Controle (H)

5.4 NÍVEIS SALIVARES DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

Os níveis salivares de IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , MMP-2, e MMP-8 foram significativamente reduzidos após o tratamento periodontal não-cirúrgico (Figura 5.5, $p < 0,05$). O que não foi verificado com relação aos níveis salivares de MMP-1 e MMP-13 após o tratamento periodontal não-cirúrgico ($p > 0,05$). Interessantemente, foi encontrada uma forte correlação negativa entre mRNA PAR-1 e os níveis salivares de IL-6 ($r = -0,60$, $p = 0,01$), IL-8 ($r = -0,62$, $p = 0,01$), TNF- α ($r = -0,66$, $p = 0,007$), IFN- γ ($r = -0,61$, $p = 0,01$), e MMP-2 ($r = -0,61$, $p = 0,006$) após o tratamento periodontal.

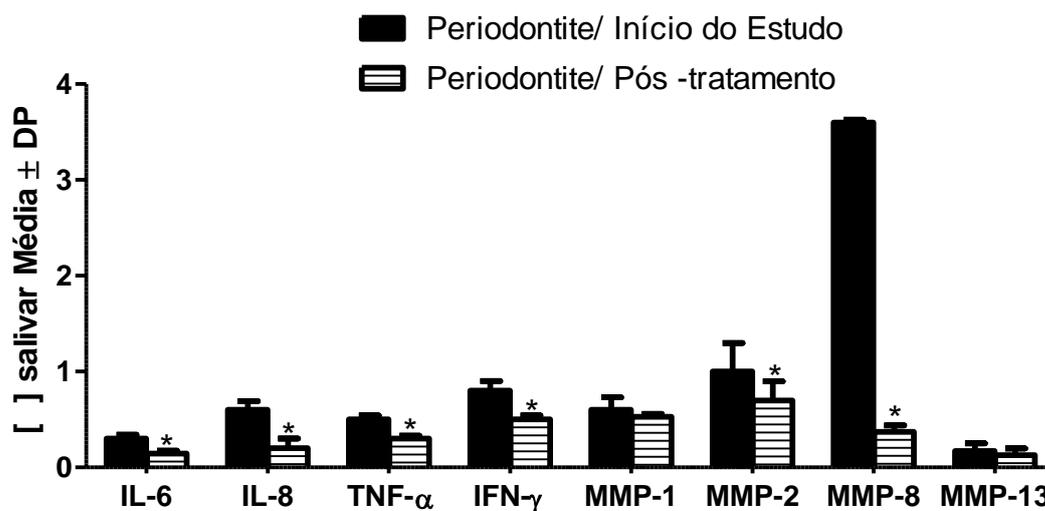


Figura 5.5 - Média e desvio padrão (DP) dos níveis salivares de IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-13 em pacientes com periodontite crônica, antes (PC) e após tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT) (*diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Os receptores ativados por protease são receptores acoplados a proteína G, que desempenham um papel ativo na imunidade inata. Dentre os membros conhecidos dessa família (PARs), PAR-1 e PAR-2 são os receptores mais expressos nos tecidos periodontais (Déry et al., 1998; Coughlin 1999; O'Brien et al., 2001; Austin et al., 2013). Estudos prévios demonstraram que os mecanismos de ativação e a ação de PAR-2 promovem a inflamação dos tecidos periodontais em animais e humanos (Holzhausen et al., 2005; Holzhausen et al., 2006; Holzhausen et al., 2010; Fagundes et al., 2011; Euzébio Alves et al., 2013). Ainda, estudos demonstram que os mecanismos de ativação de PAR-1 e seus efeitos podem estar envolvidos tanto em processos que envolvem a expressão de biomarcadores inflamatórios, envolvidos na inflamação dos tecidos periodontais (Ansai et al., 2002; Giacaman et al., 2009; Strande; Phillips, 2009), como em processos que regulam a reparação dos tecidos periodontais (Arayatrakoolikit et al., 2008; Pagel et al., 2009; Rohani et al., 2010). Contudo, no presente estudo, nossos dados apontam para o papel de reparação tecidual de PAR-1 nos tecidos periodontais.

Adicionalmente, a expressão de PAR-1 em células do FG é diminuída em pacientes com periodontite crônica (PC), quando comparada aos pacientes periodontalmente saudáveis. Ainda, o tratamento periodontal não-cirúrgico levou a um aumento significativo da expressão de PAR-1 em células do FG (PCT), e os níveis de biomarcadores da inflamação periodontal foram diminuídos após o tratamento periodontal e foram inversamente correlacionados ao aumento da expressão de PAR-1 em células do FG.

O PAR-1 é ativado principalmente por trombina em diversos tipos celulares, incluindo as plaquetas humanas, fibroblastos, células endoteliais e do ligamento periodontal (Coughlin, 2000; Griffin et al., 2001; Yin et al., 2003; Ma et al., 2005). A ativação de PAR-1 pela trombina ocorre através da ligação irreversível entre Arg41 e Ser42 no domínio N-terminal extracelular do receptor,

constituindo um novo domínio que se liga ao próprio receptor, funcionando como um ligante e desencadeando nova sinalização celular (Ossovskaya; Bunnett, 2004). Outras proteases, como gingipaínas Rgp de *P. gingivalis*, e MMPs, tais como MMP-1 e MMP-13, as quais encontram-se aumentadas durante a inflamação periodontal, também demonstraram a capacidade de ativar PAR-1 (Lourbakos et al., 2001; Austin et al., 2013). Ainda as MMP-1 e MMP-13, e gingipaínas, ativam o PAR-1 em diferentes sítios quando comparados com a trombina, uma vez que são cisteíno-proteases, e a trombina, uma serina-protease, e acredita-se que os efeitos celulares da ativação de PAR-1 dependem parcialmente da protease específica envolvida. As MMPs são capazes de clivar PAR-1 em sítios não convencionais, distintos dos sítios em que a trombina atua, gerando um ligante único capaz de ativar vias de sinalização celular envolvidas em processos fisiopatológicos como o início da formação de trombo e trombose, aterosclerose e restenose, sepse, angiogênese, insuficiência cardíaca, e até câncer (Austin et al., 2013). Por outro lado, Giacaman et al. (2009) demonstraram que a clivagem seletiva de PAR-1 em células epiteliais bucais por gingipaína do tipo Rgp regula positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α . No entanto, no presente estudo, as MMP-1 e MMP-13, as quais se mostram capazes de clivar PAR-1, não sofreram alterações significativas após o tratamento periodontal (Figura 5.5) e não se correlacionaram com a expressão de PAR-1 (mRNA).

A trombina pode ser encontrada durante o processo de inflamação dos tecidos periodontais, seguida pela injúria tecidual (Jeng et al., 2006). Contudo, após o procedimento de escovação, onde há o sangramento dos tecidos gengivais inflamados, a trombina é produzida a partir de protrombina para promover a coagulação sanguínea e diminuir o sangramento causado pelo processo mecânico (Tatakis, 1992). Tal processo pode desencadear a ativação de PAR-1, que é irreversível e resulta em endocitose e degradação desse receptor nos lisossomos, assim, após a ativação de PAR-1, é impossível a reativação deste na membrana celular (Ossovskaya; Bunnett, 2004). Por isso, sugerimos que as não-serinas proteases, como MMPs e, particularmente gingipaínas, que precedem cronologicamente a introdução da trombina na

configuração inflamatória periodontal, podem desempenhar um papel terminal na sinalização de PAR-1 para ser exposta posteriormente a trombina. Juntos, esses achados sugerem que em sítios periodontais inflamados, proteases que ativam PAR-1 principalmente em sítios não-convencionais, podem contribuir para uma inflamação desproporcional ou anormal nesses tecidos.

Os principais objetivos da terapia periodontal visam diminuir a inflamação gengival, assim como promover a reparação e regeneração do tecido periodontal (Takata, 1994). A raspagem e alisamento radiculares, é seguida pelo processo de reparação do tecido periodontal, o qual constitui um processo complexo e dinâmico, determinado por uma série de fases como inflamação, angiogênese, nova formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação tecidual (Takata, 1994). Os eventos iniciais são caracterizados por processos, como grande migração de PMNs, dilatação dos vasos sanguíneos, formação de edema e necrose na parede lateral da bolsa periodontal. Ainda, em uma fase mais avançada durante o processo de reparação periodontal, a infiltração de células inflamatórias é diminuída e conseqüentemente há uma diminuição no processo de angiogênese para a formação de novos vasos sanguíneos (Takata, 1994). A orquestração destes eventos reside na regulação dos mediadores que modulam os diferentes eventos celulares, tais como migração, proliferação e diferenciação. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a trombina possui atividades biológicas que são essenciais no processo de cicatrização tecidual e regeneração dos tecidos periodontais (Liu et al., 1979; Sundqvist et al., 1995; Hou et al., 1998; Coughlin; Camerer, 2003). Várias atividades anabólicas da trombina foram descritas além da formação de fibrina sobre a superfície da raiz do dente, tais como a proliferação de fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, síntese de colágeno, e promoção da adesão de células endoteliais (Liu et al., 1979; Sundqvist et al., 1995; Hou et al., 1998; Coughlin; Camerer, 2003). Interessantemente, o plasma rico em plaquetas e trombina, os quais contêm trombina e outros fatores biológicos ativos, têm sido sugeridos para potencializar os resultados de cirurgia periodontal regenerativa (Kassolis et al., 2000; Tözüm; Demiralp, 2003).

O PAR-1, quando ativado pela trombina, pode mediar algumas das funções iniciais e posteriores de reparo tecidual. Em estudo conduzido por Rohani et al. (2010), foi demonstrado que a ativação de PAR-1 por trombina em células epiteliais gengivais leva à indução de quimiocinas CXC que são quimiotáteis para neutrófilos, desempenhando um importante papel na cicatrização tecidual. Ainda, Pagel et al. (2009) demonstraram que a trombina induz a secreção de FGT- β , COX-2, tenascina C, FGF-1 e FGF-2, CTGF e expressão de IL-6 em osteoblastos normais, mas não em osteoblastos de camundongos que não expressam PAR-1. Além disso, a ativação de PAR-1 em osteoblastos resulta no aumento da expressão de vários fatores de crescimento, sugerindo a participação do receptor nas primeiras fases da cicatrização óssea. Ainda, a ativação de PAR-1 pela trombina em células do ligamento periodontal induz a síntese de OPG, que é uma das moléculas chave que regulam a homeostase óssea, prevenindo o processo de osteoclastogênese (Arayatrakoollikit et al., 2008). Ohuchi et al. (2010), também demonstraram que, em fibroblastos gengivais, a trombina e um peptídeo ativador sintético de PAR-1 induzem a proliferação de ET-1, responsável pela proliferação droga-induzida de fibroblastos gengivais. Além disso, os fibroblastos dos ligamentos periodontais e fibroblastos gengivais expressam PAR-1, o qual atua em processos de crescimento e agregação celular, e ainda, promove a contração do gel de colágeno destas células por via de ativação por trombina e um peptídeo agonista de PAR-1 (Chan et al., 1998; Chang et al., 2001). Por fim, estes resultados revelam o papel da ativação de PAR-1 pela trombina na regulação da cicatrização tecidual gengival em tecidos periodontais não-inflamados.

Em estudo conduzido por Ellis et al. (1999), foi visto que a ativação de PAR-1, induzida por trombina, aumenta a expressão de PAR-1 mRNA em células endoteliais. Este fato pode explicar o aumento da expressão de PAR-1 mRNA observado nas células do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica após o tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT) demonstrado em nosso estudo. Ainda, no presente estudo, a expressão de PAR-1 foi inversamente correlacionada com a expressão dos níveis salivares de IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , e MMP-2, importantes biomarcadores inflamatórios. Nossos resultados

revelaram que PAR-1 executa um possível papel protetor durante o reparo tecidual periodontal após o tratamento periodontal não-cirúrgico em pacientes com periodontite crônica. Além disso, nossos dados levantam a possibilidade de que drogas como etexilato de dabigatran (Pradaxa), um inibidor de trombina, usado em pacientes para a prevenção da formação de coágulos e derrame (Connolly et al., 2009; Antoniak et al., 2013), e Vorapaxar, inibidor seletivo para PAR-1 com função antiplaquetária em pacientes que sofrem de doenças cardíacas isquêmicas (Morrow et al., 2012; Tricoci et al., 2012), podem resultar em prejuízo na reparação e regeneração tecidual periodontal após o tratamento periodontal.

Em conclusão, dentro dos limites do presente estudo, demonstramos que o tratamento periodontal não-cirúrgico em pacientes com periodontite crônica está associado com um aumento da expressão de PAR-1 em células epiteliais e leucocitárias do FG. Além disso, mostramos que o aumento da expressão de PAR-1 está associada com a diminuição da expressão de biomarcadores inflamatórios na saliva. Portanto, nossos dados sugerem a importância das ações anabólicas da trombina na ativação de PAR-1 nos tecidos periodontais. Por fim, mais estudos são necessários para determinar os mecanismos e quais os tipos celulares envolvidos diretamente nas ações de PAR-1 durante o processo de reparação dos tecidos periodontais.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que:

A expressão gênica de PAR-1 (mRNA) em células do FG de indivíduos com periodontite crônica apresentou-se diminuída em relação à de indivíduos periodontalmente saudáveis. O tratamento periodontal não-cirúrgico levou a um aumento dessa expressão.

Leucócitos e células epiteliais presentes no FG expressam o PAR-1. No entanto, uma porcentagem menor de leucócitos de indivíduos com periodontite crônica expressa o receptor PAR-1 quando comparado à porcentagem de expressão em leucócitos de indivíduos periodontalmente saudáveis.

Os níveis salivares dos biomarcadores inflamatórios IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ e MMP-2 apresentaram-se inversamente correlacionados com os níveis de expressão do receptor PAR-1 após a terapia periodontal não-cirúrgica.

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que o PAR-1 pode estar envolvido na reparação dos tecidos periodontais após terapia periodontal não-cirúrgica em pacientes com periodontite crônica.

REFERÊNCIAS¹

- Abraham LA, MacKie EJ. Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *J Bone Miner Res.* 1999 Aug;14(8):1320-9;
- Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11189-93;
- Ansai T, Yamamoto E, Awano S, Yu W, Turner AJ, Takehara T. Effects of periodontopathic bacteria on the expression of endothelin-1 in gingival epithelial cells in adult periodontitis. *Clin Sci (Lond).* 2002 Aug;103 Suppl 48:327S-331S.
- Antoniak S, Owens AP 3rd, Baunacke M, Williams JC, Lee RD, Weithäuser A, Sheridan PA, Malz R, Luyendyk JP, Esserman DA, Trejo J, Kirchhofer D, Blaxall BC, Pawlinski R, Beck MA, Rauch U and Mackman N. PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection. *J Clin Invest.* 2013 Mar 1;123(3):1310-22.
- Arayatrakoollikit U, Pavasant P, Yongchaitrakul T. Thrombin induces osteoprotegerin synthesis via phosphatidylinositol 3'-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2008 Oct;43(5):537-43;
- Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontol 2000.* 2000 Feb;22:44-50.
- Austin KM, Covic L, Kuliopulos A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood.* 2013 Jan 17;121(3):431-9.
- Blackburn JS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis. *Am J Pathol.* 2008 Dec;173(6):1736-46.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4823-30.

Chan CP, Lin CP, Chang MC, Hsieh CC, Hsu CC, Lin CL and Jeng JH. 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.* 1998 Oct;22(4):137-43.

Chang MC, Chan CP, Wu HL, Chen RS, Lan WH, Chen YJ, Jeng JH. Thrombin-stimulated growth, clustering, and collagen lattice contraction of human gingival fibroblasts is associated with its protease activity. *J Periodontol.* 2001 Mar;72(3):303-13.

Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener HC, Joyner CD, Wallentin L and RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.* 2009 Sep 17;361(12):1139-51.

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

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

Coughlin SR, Camerer E. Participation in inflammation. *J Clin Invest.* 2003 Jan;111(1):25-7.

Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol.* 2007 Jan;14(1):55-61.

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry.* 1991 Oct 29;30(43):10363-70.

Dawes C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res.* 1987 Feb;66 Spec No:648-53.

Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2000 May;141(5):1667-74.

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

Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T, Tiruppathi C. Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):13718-27.

Emilsson K, Wahlestedt C, Sun MK, Nystedt S, Owman C, Sundelin J. Vascular effects of proteinase-activated receptor 2 agonist peptide. *J Vasc Res*. 1997 Jul-Aug;34(4):267-72.

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

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

Fälker K, Haglund L, Gunnarsson P, Nylander M, Lindahl TL, Grenegard M. Protease-activated receptor 1 (PAR1) signalling desensitization is counteracted via PAR4 signalling in human platelets. *Biochem J*. 2011 Jun 1;436(2):469-80.

Galt SW, Lindemann S, Allen L, Medd DJ, Falk JM, McIntyre TM, Prescott SM, Kraiss LW, Zimmerman GA, Weyrich AS. Outside-in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. *Circ Res*. 2002 May 31;90(10):1093-9.

Garcia JG, Patterson C, Bahler C, Aschner J, Hart CM, English D. Thrombin receptor activating peptides induce Ca²⁺ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. *J Cell Physiol*. 1993 Sep;156(3):541-9.

Giacaman RA, Asrani AC, Ross KF, Herzberg MC. Cleavage of protease-activated receptors on an immortalized oral epithelial cell line by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Microbiology*. 2009 Oct;155(Pt 10):3238-46.

Godin D, Rioux F, Marceau F, Drapeau G. Mode of action of thrombin in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol*. 1995 Jul;115(6):903-8.

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

Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis*. 1999 Mar;28(3):482-90.

Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*. 2001 Aug 31;293(5535):1666-70.

Henriksen RA, Samokhin GP, Tracy PB. Thrombin-induced thromboxane synthesis by human platelets. Properties of anion binding exosite I-independent receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Dec;17(12):3519-26.

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

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

Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2005 Feb;84(2):154-9.

Hou L, Ravenall S, Macey MG, Harriott P, Kapas S, Howells GL. Protease-activated receptors and their role in IL-6 and NF-IL-6 expression in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 1998 May;33(4):205-11.

Hübner G, Hu Q, Smola H, Werner S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev Biol.* 1996 Feb 1;173(2):490-8.

Hung SL, Lee NG, Chang LY, Chen YT, Lai YL. Stimulatory Effects of Glucose and Lipopolysaccharide of *Porphyromonas Gingivalis* on the Secretion of Inflammatory Mediators From Human Macrophages. *J Periodontol.* 2013 Mar 28. [Epub ahead of print].

Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chintala M, Zhang R, Chatterjee M, Sybertz E. Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1996 Apr;78(4):581-8.

Imamura T, Potempa J, Pike RN, Moore JN, Barton MH, Travis J. Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontitis sites. *Infect Immun.* 1995 Dec;63(12):4877-82.

Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):16062-7.

Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996 Dec;23(12):1127-32.

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

Jeng JH, Lan WH, Wang JS, Chan CP, Ho YS, Lee PH, Wang YJ, Wang TM, Chen YJ, Chang MC. Signaling mechanism of thrombin-induced gingival fibroblast-populated collagen gel contraction. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147:188-98.

Jenkins AL, Bootman MD, Taylor CW, Mackie EJ, Stone SR. Characterization of the receptor responsible for thrombin-induced intracellular calcium responses in osteoblast-like cells. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):21432-7.

Jiang KY, Ruan CG, Gu ZL, Zhou WY, Guo CY. Effects of tanshinone II-A sulfonate on adhesion molecule expression of endothelial cells and platelets in vitro. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1998 Jan;19(1):47-50.

Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Matrix metalloproteinase-1 up-regulation by hepatocyte growth factor in human dermal fibroblasts via ERK signaling pathway involves Ets1 and Fli1. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jun 21;33(11):3540-9.

Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*. 1998 Oct 30;273(44):29072-6.

Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1654-61.

Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Guccione MA, Rand ML, Packham MA. Degranulation of human platelets by the thrombin receptor peptide SFLLRN: comparison with degranulation by thrombin. *Thromb Haemost*. 1993 Dec 20;70(6):1019-23.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:33-53.

Lee WJ, Park SE, Rah DK. Effects of hepatocyte growth factor on collagen synthesis and matrix metalloproteinase production in keloids. *J Korean Med Sci*. 2011 Aug;26(8):1081-6;

Liu CY, Nossel HL, Kaplan KL. The binding of thrombin by fibrin. *J Biol Chem*. 1979 Oct 25;254(20):10421-5.

Liu J, Schuff-Werner P, Steiner M. Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Apr 28;343(1):183-9.

Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol.* 1967 Nov-Dec;38(6):Suppl:610-6.

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

Lourbakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, Potempa J, Pike RN. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood.* 2001 Jun 15;97(12):3790-7.

Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989 Aug;84(2):640-6.

Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 4;102(1):216-20.

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

Mari B, Imbert V, Belhacene N, Far DF, Peyron JF, Pouysségur J, Van Obberghen-Schilling E, Rossi B, Auberger P. Thrombin and thrombin receptor agonist peptide induce early events of T cell activation and synergize with TCR cross-linking for CD69 expression and interleukin 2 production. *J Biol Chem.* 1994 Mar 18;269(11):8517-23.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75-81.

McLaughlin JN, Mazzoni MR, Cleator JH, Earls L, Perdigoto AL, Brooks JD, Muldowney JA 3rd, Vaughan DE, Hamm HE. Thrombin modulates the expression of a set of genes including thrombospondin-1 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):22172-80.

Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama T, Aird WC. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):41-53.

Mirrielees J, Crofford LJ, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2010 Dec;37(12):1068-74.

Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, Fox KA, Lipka LJ, Liu X, Nicolau JC, Ophuis AJ, Paolasso E, Scirica BM, Spinar J, Theroux P, Wiviott SD, Strony J, Murphy SA; TRA 2P–TIMI 50 Steering Committee and Investigators. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2012 Apr 12;366(15):1404-13.

Nagaraja C, Pradeep AR. Hepatocyte growth factor levels in gingival crevicular fluid in health, disease, and after treatment. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):742-7.

Naldini A, Sower L, Bocci V, Meyers B, Carney DH. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *J Cell Physiol.* 1998 Oct;177(1):76-84.

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

Ohnishi T, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues. *Arch Oral Biol.* 2003 Dec;48(12):797-804.

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

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

Page CP. Inhibition of natural anti-inflammatory mechanism by beta 2-agonists. *Lancet.* 1991 May 25;337(8752):1285-6.

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

Pierce GF, Tarpley JE, Allman RM, Goode PS, Serdar CM, Morris B, Mustoe TA, Vande Berg J. Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB. *Am J Pathol*. 1994 Dec;145(6):1399-410.

Pinheiro ML, Feres-Filho EJ, Graves DT, Takiya CM, Elsas MI, Elsas PP, Luz RA. Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingiva of periodontitis patients. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):323-8.

Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest*. 1992 Oct;90(4):1479-85.

Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pagès G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouysségur J, Van Obberghen-Schilling E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett*. 1991 Aug 19;288(1-2):123-8.

Rohani MG, Beyer RP, Hacker BM, Dommisch H, Dale BA, Chung WO. Modulation of expression of innate immunity markers CXCL5/ENA-78 and CCL20/MIP3alpha by protease-activated receptors (PARs) in human gingival epithelial cells. *Innate Immun*. 2010 Apr;16(2):104-14.

Salonen JI, Paunio KU. An intracrevicular washing method for collection of crevicular contents. *Scand J Dent Res*. 1991 Oct;99(5):406-12.

Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:77-93.

Segelnick SL, Weinberg MA. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1598-601.
Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-58.

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

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

Storck J, Zimmermann ER. Regulation of the thrombin receptor response in human endothelial cells. *Thromb Res*. 1996 Jan 1;81(1):121-31.

Strande JL, Phillips SA. Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. *J Inflamm (Lond)*. 2009 Mar 6;6:4.

Stubbs MT, Bode W. A model for the specificity of fibrinogen cleavage by thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 1993;19(4):344-51.

Sugama Y, Tirupathi C, offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW 2nd, Malik AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol*. 1992 Nov;119(4):935-44.

Sundqvist G, Rosenquist JB, Lerner UH. Effects of bradykinin and thrombin on prostaglandin formation, cell proliferation and collagen biosynthesis in human dental-pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 1995 Mar;40(3):247-56.

Takata T. Oral wound healing concepts in periodontology. *Curr Opin Periodontol*. 1994:119-27.

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

Tatakis DN. Blood coagulation factors in periodontal pathophysiology: a review with emphasis on the role of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 1992 Jan;18(1):28-33.

Tözüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc*. 2003 Nov;69(10):664.

Travis J, Potempa J. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):35-50.

Tricoci P, Huang Z, Held C, Moliterno DJ, Armstrong PW, Van de Werf F, White HD, Aylward PE, Wallentin L, Chen E, Lokhnygina Y, Pei J, Leonardi S, Rorick TL, Kilian AM, Jennings LH, Ambrosio G, Bode C, Cequier A, Cornel JH, Diaz R, Erkan A, Huber K, Hudson MP, Jiang L, Jukema JW, Lewis BS, Lincoff AM, Montalescot G, Nicolau JC, Ogawa H, Pfisterer M, Prieto JC, Ruzyllo W, Sinnaeve PR, Storey RF, Valgimigli M, Whellan DJ, Widimsky P, Strony J, Harrington RA, Mahaffey KW; TRACER Investigators. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2012 Jan 5;366(1):20-33.

Trivedi V, Boire A, Tchernychev B, Kaneider NC, Leger AJ, O'Callaghan K, Covic L, Kuliopulos A. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*. 2009 Apr 17;137(2):332-43.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. 1999 Nov;25(5):517-23.

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

Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:77-104.

Umarova BA, Dugina TN, Shestakova EV, Gluza E, Strukova SM. Activation of rat mast cells upon stimulation of protease-activated receptor (PAR-1). *Bull Exp Biol Med.* 2000 Apr;129(4):314-7.

Van der Velden U, Winkel EG, Abbas F. Bleeding/plaque ratio. A possible prognostic indicator for periodontal breakdown. *J Clin Periodontol.* 1985 Nov;12(10):861-6.

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991 Mar 22;64(6):1057-68.

Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Biol Chem.* 1992 Sep 15;267(26):18902-7.

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

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Mochizuki SI, Tsuda E, Morinaga T, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, Higashio K. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone.* 1999 Jul;25(1):109-13.

Yin YJ, Salah Z, Maoz M, Even Ram SC, Ochayon S, Neufeld G, Katzav S, Bar-Shavit R. Oncogenic transformation induces tumor angiogenesis: a role for PAR1 activation. *FASEB J.* 2003 Feb;17(2):163-74.

Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, Schwall R, Ferrara N, Gerritsen ME. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):1111-20.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP)

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****Comitê de Ética em Pesquisa****PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 337902
Protocolo 106/2010**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) em pacientes com periodontite crônica**", de responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Marinella Holzhausen.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 01 de julho de 2010.


Profa. Dra. Marcia Turolia Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, por favor, assine ao final deste documento, elaborado em duas vias de um só teor. Uma das vias é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa em participar do presente estudo, você não será penalizado (a) de forma alguma.

TÍTULO: “EXPRESSÃO DO RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASE (PARs) EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA”.

RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Marinella Holzhausen.

JUSTIFICATIVA: A doença periodontal (gengival) é uma inflamação que deixa a gengiva inchada, vermelha e, em alguns casos, pode causar o amolecimento e perda do dente. Essa é uma doença muito comum, pois oito em cada dez adultos brasileiros apresentam alguma forma de doença da gengiva. A inflamação da gengiva é causada por bactérias (germes) da boca que vivem ao redor dos dentes e gengiva. Estas bactérias produzem algumas substâncias que, de alguma forma, irritam a gengiva.

O objetivo deste presente estudo é avaliar se a irritação da gengiva acontece por causa da união das substâncias produzidas pelas bactérias da boca com uma proteína da gengiva chamada receptor tipo 1 ativado por protease.

Neste estudo serão examinados pacientes adultos, entre 20 e 45 anos de idade, para saber se apresentam doença da gengiva. Também será avaliado se estes pacientes têm na boca uma proteína chamada receptor tipo 1 ativado por protease. Todos os dentes serão examinados e será coletado um pouco de líquido da gengiva com uma cone de papel e uso de solução salina. O exame leva aproximadamente 20 minutos, não dói e não causa qualquer problema para a pessoa. Se o paciente não quiser participar deste estudo será feito apenas um exame mais rápido para ver que tipo de tratamento dentário a pessoa precisa. Se o senhor (a) quiser participar, mas durante o exame não gostar de alguma coisa é só falar com o dentista que ele irá parar na mesma hora. O tratamento

dentário será realizado mesmo que o senhor (a) não queira participar do trabalho.

CUSTO E PAGAMENTO: Não haverá nenhum custo para participar deste trabalho. Todo o material necessário será fornecido pelos professores.

SIGILO: Caso você aceite participar deste estudo será feito um cadastro numa ficha que pertence ao professor responsável pela pesquisa. Será mantido segredo do seu nome e não será divulgado o seu nome em trabalhos apresentados na faculdade, congressos etc.

INDENIZAÇÃO E DANOS: Você deve saber que a coleta do líquido da bochecha e língua com um cotonete de algodão ou da gengiva com uma cone de papel não vai causar nenhum dano a você, assim, não haverá qualquer tipo de pagamento pelo exame.

CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO: Você deve ter entendido tudo o que leu. Uma cópia deste Termo será entregue para você e outra ficará arquivada com o professor responsável. A assinatura abaixo significa que você concorda em participar deste estudo.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr.(a) poderá contatar os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal pesquisador é a Profa Dra. Marinella Holzhausen que pode ser encontrada na Faculdade de Odontologia da USP, localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, (11) 3091-7833.

Se o Sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o comitê de ética em pesquisa da FOU SP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária.

DECLARAÇÃO

Eu,.....

Nacionalidade.....,

Estado civil.....

Profissão....., nascido (a) em / /

Na cidade de....., estado

de.....

Portador da cédula de identidade

Número.....

CPF.....,

Residente a.....

Declaro ter sido inteiramente esclarecido (a) sobre o estudo e ter lido e entendido o termo que estou assinando abaixo.

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

São Paulo, _____ de _____ 201_.

ANEXO C - Ficha de anamnese

<i>FICHA DE ANAMNESE</i>					
Paciente nº	Data do exame / /				
Nome -					
Endereço -					
Cidade	Cep	Fone			
Ocupação -					
Data nascimento / /	Idade	Gênero (F) (M)			
Está sob tratamento médico?					
Qual tratamento?					
Qual médico?		Fone			
Há quanto tempo?					
Está tomando alguma medicação?		Há quanto tempo?			
Qual?					
Já foi submetido a tratamento periodontal?					
Qual tipo?					
Há quanto tempo?					
Fez uso de antibiótico nos últimos 6 meses?					
Qual?		Por quê?			
Possui algum problema de saúde como:					
Diabete	()	Alteração PA	()	Problemas sangüíneos	()
Anemia	()	Neutropenia	()	Problemas cardíacos	()
Epilepsia	()	Problema hormonal	()	Doença infecciosa	()
Hepatite	()	Problemas SNC	()	Doença contagiosa	()
SIDA	()	Problemas renais	()	Doença auto-imune	()
OBS:					
Está grávida?		Quantos meses?			
É fumante? _____		Cigarros/ dia	Há quanto tempo?		
Obs:					

Modelo de ficha clínica para registro do índice de gengival (IG):

ÍNDICE GENGIVAL

INICIAL	Data:	
---------	-------	--

Maxila

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
V														
M														
L														
D														

Mandíbula

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
V														
M														
L														
D														

FINAL	Data:	
-------	-------	--

Maxila

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
V														
M														
L														
D														

Mandíbula

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
V														
M														
L														
D														

n DENTES AUSENTES	
-------------------	--

SUPERF

IG INICIAL	#DIV/0!
IG FINAL	#DIV/0!

IGF/IGI	#DIV/0!
% de Red.	#DIV/0!

Modelo de ficha clínica para registro do índice de placa (IP):

ÍNDICE DE PLACA

INICIAL	Data:	
----------------	--------------	--

Maxila

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
V														
M														
L														
D														

Mandíbula

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
V														
M														
L														
D														

FINAL	Data:	
--------------	--------------	--

Maxila

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
V														
M														
L														
D														

Mandíbula

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
V														
M														
L														
D														

n DENTES AUSENTES	
--------------------------	--

SUPERF

IP INICIAL	#DIV/0!
IP FINAL	#DIV/0!

IPF/IPI	#DIV/0!
% de Red.	#DIV/0!