

KAMILLA FARIA MACIEL

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM RESPOSTA À
INFECÇÃO ENDODÔNTICA EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS ISENTOS DE GERMES**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2011

KAMILLA FARIA MACIEL

EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO ENDODÔNTICA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS ISENTOS DE GERMES

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação
da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Odontologia – área de
concentração em endodontia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Leda Quercia Vieira.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2011

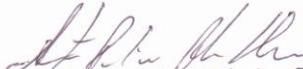
M152e Maciel, Kamilla Faria
2011 Expressão de citocinas em resposta à infecção endodôntica experimental
T em camundongos isentos de germes / Kamilla Faria Maciel. 2011.
71 f.: il.
Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
Co-orientadora: Leda Quercia Vieira
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Odontologia.
1. Endodontia – Teses. 2. Citocinas – Teses. I. Ribeiro Sobrinho,
Antônio Paulino. II. Vieira, Leda Quercia. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

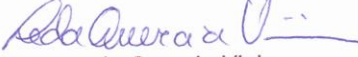
BLACK D047

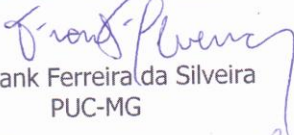



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


Dissertação intitulada "**Expressão de citocinas em resposta à infecção endodôntica experimental em camundongos isentos de germes**", área de concentração em **Endodontia**, apresentada por **Kamilla Faria Maciel**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
FO-UFMG - Orientador


Dra. Leda Quercia Vieira
ICB-UFMG - Co-Orientadora


Dr. Frank Ferreira da Silveira
PUC-MG


Dra. Paula Rocha Moreira
ICB-UFMG


Profa. Dra. Efigênia Ferreira e Ferreira
Subcoordenadora do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 29 de junho de 2011.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br



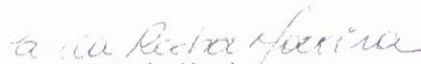
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de concentração em **Endodontia**, da candidata **Kamilla Faria Maciel**.

Aos 29 de junho de 2011, às 09:00 h, na sala de Pós-Graduação (3418) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Dra. Leda Quercia Vieira, Dr. Frank Ferreira da Silveira e Dra. Paula Rocha Moreira. O Professor Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Orientador da Dissertação, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Expressão de citocinas em resposta à infecção endodôntica experimental em camundongos isentos de germes**". Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dr. Frank Ferreira da Silveira, Dra. Paula Rocha Moreira, Dra. Leda Quercia Vieira e Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as arguições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela APROVAÇÃO..... da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 29 de junho de 2011.


Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
FO-UFMG - Orientador


Dra. Leda Quercia Vieira
ICB-UFMG - Co-Orientadora


Dr. Frank Ferreira da Silveira
PUC-MG


Dra. Paula Rocha Moreira
ICB-UFMG

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo, Stéfani, companheiro e incentivador incondicional, que tantas vezes abdicou de minha presença e de si mesmo. Nunca me esquecerei de seu apoio e amor!

Aos meus pais, Cláudio e Rogéria, meus primeiros mestres. Sempre ao meu lado, apoiando e incentivando todas as minhas decisões. Obrigada mais uma vez pela compreensão, ajuda e amor incondicional tão importantes na minha vida!

À minha irmã, que sempre torceu por mim, pela paciência e amor incondicional.

À minha avó, Maria Aparecida (Paré) – in memoriam, por cuidar de mim, mesmo que de outro plano. E, ao meu querido avô, pelo carinho.

Aos meus amigos, por entenderem minha ausência e incentivar minha busca.

À toda minha família, principalmente por estarem ao meu lado.

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pela sabedoria, incentivo, compreensão, humanismo e orientação. Sua presença nesta etapa da minha vida foi realmente preciosa! Obrigada por tudo!

À professora Doutora Leda Quercia Vieira, pela sua paciência e disponibilidade, em todas as etapas desta caminhada.

Aos colegas de curso, por contribuírem com a minha formação, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao Fabiano, Viviane e Ciça, que me incentivaram e tanto me ajudaram no início desta etapa. Obrigada pela paciência sem fim!

Ao Warley, Luciana e Ricardo, que me deram forças e a calma necessária para vencer os obstáculos. Aprendi muito com vocês!

À Andressa, pela amizade que construímos ao longo desta caminhada. Obrigada pelo ombro amigo!

Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me oferecer todas as oportunidades e iluminar meu caminho.

*Aos meus colegas do laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (ICB-UFMG):
Paula, Caio, Leonardo, Waldionê, Matheus, Eric, Liliane, Louisa, Everton, Yuri, Hassan e
Magda, pela parceria nos trabalhos.*

*Ao Professores do mestrado, que tanto contribuíram para minha formação pessoal e
profissional. Em especial, à Professora Guiomar e à Professora Efigênia.*

Às meninas do Colegiado de Pós-graduação da FO-UFMG, que tanto foram solícitas.

Meus singelos e sinceros agradecimentos.

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”

Aristóteles

RESUMO

Objetivo: Avaliar, em um modelo de camundongo gnotoxênico, o perfil da expressão de citocinas que modulam o desenvolvimento de lesões periapicais em resposta à sinergia de patógenos humanos.

Metodologia: Os microrganismos isolados de um paciente, sabidamente sinérgicos, *in vitro*, foram inoculados em canais radiculares de camundongos isentos de germes (cepas de *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus prevotii*) em mono ou em biassociação. Os animais foram sacrificados no 7^o e 14^o dia após a infecção, e os tecidos periapicais coletados. Avaliou-se a expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , RANKL, IL-10, IL-4 e TGF- β por meio do PCR quantitativo em tempo real.

Resultados: As expressões do RNAm de IFN- γ e TNF- α foram significativamente maiores no grupo monoinfectado com *F. nucleatum* na fase aguda e crônica do desenvolvimento das lesões periapicais, respectivamente. No entanto, com estímulos *F. nucleatum* e *P. prevotii* no grupo bi-infectado, observou-se pequena expressão de IFN- γ e TNF- α em ambos os momentos analisados. A expressão do RNAm do RANKL diminuiu pelos estímulos biassociados em fase crônica (14 dias). IL-4 não estaria envolvida na resposta imune periapical a essas infecções, pois sua expressão foi similar em ambos os períodos analisados. A citocina IL-10 expressou-se mais na fase crônica (14 dias), pelos grupos monoinfectados com *F. nucleatum* e *P. prevotii*. Os estímulos da biassociação (*F. nucleatum* e *P. prevotii*) aumentaram a expressão de TGF- β no 7^o dia, relacionando-se com a baixa expressão de IFN- γ e TNF- α na mesma condição, ao mesmo tempo. Além disso, *F. nucleatum* em monoinfecção aumentou a expressão de TGF- β na fase crônica.

Conclusão: Pode-se concluir que o perfil de citocinas expresso nos tecidos periapicais, em resposta à infecção de canais radiculares, depende do desafio bacteriano, pois ambas as

espécies selecionadas induziram uma resposta específica no hospedeiro. Além disso, as citocinas, TGF- β e IL-10, devem regular as respostas imunes pró-inflamatórias, na fase aguda e crônica das respostas periapicais, respectivamente.

Palavras-chave: camundongos isentos de germes, citocinas, lesão periapical.

ABSTRACT

Aim: To examine the cytokine expression profile during periapical lesion development in response to synergetic human pathogens in a gnotoxenic mouse model.

Methodology: *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus prevotii* strains were isolated from a human patient and had been previously demonstrated to be synergistic *in vitro*, because *P. prevotii* triggered a significant increase in the growth of *F. nucleatum*. These strains were inoculated into the root canals of germ-free mice in either mono- or bi-association. Animals were sacrificed seven and 14 days after infection, and periapical tissues were collected. mRNA Expression of the cytokines IFN- γ , TNF- α , RANKL, IL-10, IL-4, and TGF- β was assessed using quantitative real-time PCR.

Results: The mRNA expression of IFN- γ and TNF- α was significantly up-regulated by *F. nucleatum* mono-infection during the acute and chronic phase of periapical lesion development, respectively. However, in *F. nucleatum* and *P. prevotii* bi-infection the expression of IFN- γ and TNF- α were almost absent at both time points analysed. RANKL mRNA expression was down-regulated during the bi-infection at the chronic phase (day 14). As IL-4 expression was similar at both time points analysed, IL-4 does not appear to be involved in the periapical immune response to these bacterial strains. The immunomodulatory cytokine IL-10 was up-regulated during the chronic phase (day 14) by mono-infection with either *F. nucleatum* or *P. prevotii*. Dual infection with *F. nucleatum* and *P. prevotii* increased TGF- β mRNA expression on day 7, which paralleled the decrease in IFN- γ and TNF- α mRNA levels at the same time point. Additionally, *F. nucleatum* mono-infection increased TGF- β mRNA expression during the chronic phase.

Conclusion: We conclude that the cytokine profile expressed in periapical tissues in response to root canal infection depends on the nature of the bacterial challenge because we observed

species-specific host cytokine responses. Additionally, both TGF- β and IL-10 appeared to be regulating the proinflammatory cytokine responses during both the acute and chronic phases of the periapical immune response.

Keywords: cytokines, germ-free mice, periapical lesions.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α e RANKL, nos tecidos periapicais, analisadas por PCR em tempo real **51**
- Figura 2** - Expressão das citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β , nos tecidos periapicais, analisadas por PCR em tempo real **52**

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Sequência de primers	49
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. SCR/RCS: Sistema de canais radiculares/*Root canal system*
2. pH: potencial hidrogeniônico
3. Th: célula T *helper*
4. CD-: *cluster of differentiation*
5. IL-: interleucina
6. RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa B
7. RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
8. mRNA: RNA mensageiro
9. OPG: osteoprotegerina
10. TNF-: fator de necrose tumoral
11. LPS: lipopolissacarídeo
12. NK: células *natural killer*
13. IFN-: interferon
14. ICAM: molécula de adesão intercelular
15. CCR5: C-C receptor de quimiocina 5
16. PMN: leucócitos polimorfonucleares
17. Treg: célula T regulatória

18. Ig: imunoglobulina
19. NO: óxido nítrico
20. TGF-: fator de crescimento transformador
21. APC: célula apresentadora de antígeno
22. CETEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal
23. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
24. BHI: *Brain Heart Infusion*
25. CFU: *Colony-Forming Unit*
26. cDNA: DNA complementar
27. PCR: *Polymerase Chain Reaction*
28. Ct: *threshold cycle*
29. HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
30. µg: microgramas
31. µl: microlitros

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos	31
3. Trabalho científico	33
4. Conclusão	60
Referências bibliográficas	62
Anexos	69

INTRODUÇÃO

1 Introdução

A contaminação bacteriana do tecido pulpar pode levá-lo à destruição e consequente indução de uma lesão periapical. A resposta de defesa do hospedeiro contra os agentes irritantes oriundos do sistema de canais radiculares (SCR) infectados induz a liberação de muitos mediadores inflamatórios que, ao prevenir a invasão dos patógenos nos tecidos perirradiculares, paradoxalmente, leva à destruição localizada do tecido do hospedeiro (TAKAHASHI, 1998).

Estudos com técnicas de cultivo e de biologia molecular demonstram a etiologia polimicrobiana das infecções endodônticas (LANA *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2004; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2004; JACINTO *et al.*, 2005; SAKAMOTO *et al.*, 2006; BRITO *et al.* 2007; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2011). Como se observa na doença periodontal, a infecção endodôntica é mista, com o predomínio de espécies anaeróbias (LANA *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2004; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2004; BRITO *et al.* 2007; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2009; NARAYANAN & VAISHNAVI, 2010; TAVARES *et al.*, 2011). A maioria das espécies encontradas nos canais radiculares infectados também estaria presente nas bolsas periodontais (SUNDQVIST, 1992; BRITO *et al.*, 2007). Como em qualquer infecção oportunista, na infecção endodôntica, é difícil avaliar qual a composição da microbiota presente e o papel de cada microrganismo no processo (SUNDQVIST, 1994; ZEHNDER *et al.*, 2002; HAFFAJJE & SOCRANSKY, 2005).

A correlação desses achados microbiológicos, muitas vezes, é afetada por certas limitações de técnicas de cultura, que podem subestimar a diversidade bacteriana presente no SCR infectados (GOMES *et al.*, 2004; SIQUEIRA Jr. & RÔÇAS, 2005b). Recentemente, as técnicas de biologia molecular possibilitaram a utilização de métodos mais sensíveis e

específicos para avaliar o perfil microbiano de patologias orais (ROLPH *et al.*, 2001; SIQUEIRA Jr. & RÔÇAS, 2005a; BRITO *et al.*, 2007; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2011), permitindo um conhecimento melhor da composição da microbiota presente nos processos infecciosos endodônticos e periodontais.

No curso da infecção dos canais radiculares, fortes inter-relações microbianas ocorrem, mudando o perfil microbiano ali presente. Alguns fatores podem interferir nessas inter-relações, tais como: o ambiente específico; as pressões seletivas existentes nos canais radiculares (SUNDQVIST, 1992); os nutrientes; o pH; a temperatura e a tensão de oxigênio (SUNDQVIST, 1992; SIQUEIRA Jr. *et al.* 2009). Sabe-se que as relações microbianas podem ser sinérgicas ou antagônicas (SUNDQVIST, 1992; SOCRANSKY *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1998; PETERS *et al.*, 2002; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). O sinergismo ocorre quando o metabolismo de uma espécie produz nutrientes e fatores de crescimento que beneficiam outra espécie microbiana. O antagonismo se expressa quando um microrganismo produz substâncias que podem ser tóxicas e ou inibir o crescimento de outras espécies ali presentes. Essas relações influenciam de forma decisiva a colonização e o estabelecimento da microbiota infectante no SCR (SUNDQVIST, 1992; CAIRES *et al.*, 2007).

O estudo das relações hospedeiro–microrganismo não é simples, em função da complexidade dos microrganismos e pela multiplicidade de fatores que influenciam a composição microbiana de um determinado sítio (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Os elementos microbianos também ativam diferentes reações imunes no hospedeiro (JONTELL *et al.*, 1998). Muitos dos efeitos patogênicos microbianos sobre os tecidos periapicais operam de forma indireta, via estimulação de mediadores solúveis derivados do hospedeiro, como as citocinas. Diversos estudos procuram identificar esses mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento das lesões perirradiculares, inclusive os relacionados à atividade de

reabsorção óssea (STASHENKO *et al.*, 1987; KAWASHIMA & STASHENKO, 1999; VERNAL *et al.*, 2006; FUKADA *et al.*, 2009).

Todos os tipos de células inflamatórias, que medeiam tanto a resposta inflamatória específica quanto a não-específica, infiltram-se na região periapical em resposta à infecção radicular. Esse processo inclui: ativação dos PMN e dos macrófagos; hipersensibilidade do tipo tardia; reações citotóxicas; resposta anafilática; complexos imunes e hipersensibilidade mediada por complemento, assim como a produção de citocinas por linfócitos, macrófagos e células do tecido conjuntivo do hospedeiro, metabólitos do ácido aracdônico e cininas (STASHENKO *et al.*, 1998).

As células T têm um papel central na resposta imune celular (KAWASHIMA *et al.*, 1996; TAKAHASHI, 1998). Em lesões periapicais e outras doenças inflamatórias, existem pelo menos quatro subtipos diferentes de resposta Th: Th1, Th2, Th17 e Treg (DIVEU *et al.*, 2008; McGEACHY & CUA, 2008; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2010; GARLET, 2010). A do tipo 1 (Th1) caracteriza-se pela produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-1 e a do tipo 2 (Th2), pela produção de IL-4, IL-5, IL-13 (RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002; ČOLIC *et al.*, 2009; TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010). Essas respostas têm regulação cruzada, e suas citocinas são antagônicas. Entretanto, ambas as respostas podem ser suprimidas por células Treg e/ou a produção de IL-10 e TGF- β (FUKADA *et al.*, 2009; TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010).

As citocinas são proteínas regulatórias que desempenham importante papel na modulação das respostas imunes, incluindo ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose dos linfócitos. Secretadas por diferentes tipos celulares, são mensagens intercelulares pelas quais as células envolvidas nas respostas imunológicas se comunicam (SEYMOUR & TAYLOR, 2004). Stashenko *et al.* (1998) propuseram um modelo para a ação regulatória dessa rede de citocinas sobre a inflamação periapical. Nesse

modelo, as citocinas sintetizadas pelo subgrupo Th1 estimulariam a produção de IL-1 e de outras citocinas pró-inflamatórias que ativariam a reabsorção óssea perirradicular. Atualmente, já se sabe que a reabsorção óssea está correlacionada à expressão de RANK e seu ligante o RANKL, além da atividade das citocinas envolvidas na resposta Th1 (VERNAL *et al.*, 2006; FUKADA *et al.*, 2009).

O RANKL expressa-se em níveis mais elevados nos ossos e nos tecidos linfóides. Atua no tecido ósseo estimulando a diferenciação dos osteoclastos (LACEY *et al.*, 1998). O RANKL tem também uma série de efeitos sobre as células imunes, incluindo a inibição da apoptose de células dendríticas (WONG *et al.*, 1997). Em condições homeostáticas, os níveis de RANKL e osteoprotegerina (OPG) precisam se equilibrar. Na presença de estímulo inflamatório, a expressão de RANKL aumenta nos tecidos periodontais e periapicais, estimulando a atividade dos osteoclastos e reabsorção óssea patológica (MENEZES *et al.*, 2008; GRAVES *et al.*, 2011). Camundongos nocautes para o RANKL apresentam osteopetrose severa com defeitos de erupção dentária. Esses animais apresentam também uma completa ausência de osteoclastos diferenciados, além de defeitos na diferenciação de células T e B (KONG *et al.*, 1999; KHOSLA, 2001).

A identificação do sistema OPG/RANKL/RANK, como mediador final da osteoclastogênese, representou um grande avanço no conhecimento da biologia óssea. A clonagem e a caracterização inicial da OPG como um receptor solúvel chamariz, pertencente à superfamília de receptores de TNF, foram a base do esclarecimento desse sistema. Posteriormente, identificou-se o RANKL como o mediador chave da osteoclastogênese, expresso tanto de forma ligada a uma membrana, quanto de forma solúvel. Demonstrou-se o papel decisivo desses fatores na regulação do metabolismo ósseo pelos resultados de fenótipos esqueléticos (osteoporose *versus* osteopetrose) em camundongos com alterações na expressão dessas moléculas (KHOSLA, 2001).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é um potente mediador imunológico das respostas inflamatórias agudas e crônicas, com capacidade de aumentar a reabsorção óssea (BIRKCDAL-HANSEN, 1993). É considerado o principal mediador da resposta inflamatória aguda induzida por bactérias Gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. O estímulo mais importante para ativar a produção de TNF pelos macrófagos é o LPS, principal fonte celular de TNF, embora as células T ativadas, NK e mastócitos também possam secretar essa citocina (ABBAS *et al.*, 2008). O IFN- γ produzido pelas células T e pelas NK aumenta a síntese do TNF pelos macrófagos estimulados por LPS (ABBAS *et al.*, 2008). Em 2007, De Sá *et al.* sugeriram que, apesar do TNF- α não apresentar papel relevante na patogenia do abscesso dental sintomático, ele tem papel de destaque durante a inflamação crônica em tecidos. Kawashima *et al.* (2007) demonstraram que a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-1 α e IL-10 aumenta em lesões periapicais experimentalmente induzidas em animais após duas semanas de exposição dos SCR à microbiota oral.

O IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células (ABBAS *et al.*, 2008). Os macrófagos respondem a muitos microrganismos, incluindo bactérias intracelulares e produtoras de LPS, secretando IL-12, que induz a produção local de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T (ABBAS *et al.*, 2008). O IFN- γ estimula os macrófagos a destruir os microrganismos fagocitados, exacerbando sua ação microbicida, possibilitando a síntese de intermediários reativos do oxigênio e o óxido nítrico (NO). O IFN- γ promove a diferenciação das células T CD4⁺ *naives* (virgens) em uma subpopulação Th1 e inibe a proliferação das células Th2 (ABBAS *et al.*, 2008). Ativa os neutrófilos e provoca a ação citotóxica das células NK (ABBAS *et al.*, 2008). A expressão do IFN- γ desencadeia-se primeiramente pela IL-12 e é regulada negativamente pela IL-10 (ČOLIC *et al.*, 2010).

Em culturas de células mononucleares retiradas de lesões periapicais humanas, Čolíc *et al.* (2006) perceberam altos níveis de IFN- γ enquanto os níveis de IL-4 assemelhavam-se aos observados no grupo controle. Diante desse resultado, esses autores concluíram que ocorre uma predominância de resposta imune Th1 em lesões periapicais crônicas.

De Rossi *et al.* (2008) avaliaram citocinas pró e anti-inflamatórias no desenvolvimento das lesões perirradiculares. Observaram nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ que as lesões periapicais eram maiores que as dos animais selvagens, e que, pelo menos individualmente, o IFN- γ endógeno teria efeito protetor na patogênese de reabsorção óssea periapical tardia *in vivo*. Constataram que as citocinas IL-4 e IL-10 têm diferentes funções na modulação da destruição óssea. Camundongos deficientes para a IL-10 apresentaram lesões periapicais muito maiores do que as dos deficientes para IL-4. Afirmaram que a IL-4, aparentemente, não demonstrou nenhum efeito significativo na modulação da lesão periapical, apresentando lesões muito similares às dos animais controle selvagens. Esses autores deduziram que inúmeros mecanismos se envolvem nas mudanças patológicas associadas a lesões periapicais agudas e crônicas. Seus trabalhos sugeriram que, pelo menos individualmente, o IFN- γ , a IL-10, o ICAM-1 e o CCR5 desempenham importantes papéis na patogênese das alterações perirradiculares, atuando como supressores endógenos no desenvolvimento das alterações periapicais. A IL-4 não apresentou efeito significativo na modulação da lesão periapical. Já Watanabe *et al.* (1990) afirmaram que a IL-4 é um potente inibidor de reabsorção óssea.

A IL-4 é o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento das células Th2 a partir de células virgens T CD4⁺. A IgE é a principal mediadora das reações de hipersensibilidade imediata (alérgicas). A IL-4 antagoniza os efeitos da expressão de interferon pelos macrófagos inibindo as reações imunes mediadas por células. Esse pode ser um dos mecanismos pelos quais as células Th2 atuam como inibidoras

da resposta imune (ABBAS *et al.*, 2008). Durante a osteoclastogênese, a IL-4 regula a reabsorção óssea, atuando diretamente nos precursores osteoclásticos pela inibição das vias de sinalização do RANKL (MANGASHETTI, 2005). De Sá *et al.* (2003), ao avaliarem quinze pacientes assintomáticos com granuloma periapical, observaram alta frequência de células expressando IL-4. Observaram uma clara correlação entre as células IL-4 positivas e a intensidade de infiltrado inflamatório. A IL-4, segundo os autores, seria uma citocina chave na resposta do tipo Th2.

A IL-10 é produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos (MOORE *et al.*, 1993; MOSMANN *et al.*, 1994; ABBAS *et al.*, 2008). Foi originalmente identificada pela sua habilidade em antagonizar a imunidade celular (DE WAAL *et al.*, 1991). Entre as suas características destaca-se a potente qualidade imunossupressora, deprimindo a ativação de células mononucleares e prevenindo a produção de mediadores da inflamação (DE WAAL *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991). Essas ações são excelentes exemplos de reguladores de *feedback* negativo (ABBAS *et al.*, 2008); inibem a capacidade de apresentação de antígenos em monócitos, pela regulação negativa do MHC de classe II nessas células (DE WAAL *et al.*, 1991) e a expressão de moléculas co-estimuladoras, *in vitro* (WILLEMS *et al.*, 1994). Seus efeitos biológicos seriam consequência de sua habilidade em inibir muitas das funções dos macrófagos ativados, como por exemplo, a produção de IL-12 e TNF- α (ABBAS *et al.*, 2008). Camundongos nocautes para a IL-10 desenvolvem doença inflamatória intestinal, provavelmente como resultado da ação descontrolada dos macrófagos reagindo aos microrganismos entéricos (ABBAS *et al.*, 2008).

Sasaki *et al.* (2000) examinaram o efeito da IL-4 e da IL-10 na destruição óssea periapical em infecções de canais radiculares em camundongos nocautes para a IL-4 (IL-4^{-/-}) e a IL-10 (IL-10^{-/-}). Concluíram que a IL-10, mas não a IL-4, é um importante supressor

endógeno de reabsorção óssea induzida pela infecção, agindo provavelmente pela inibição da expressão de IL-1 α .

O TGF- β é uma citocina regulatória com potente efeito imunossupressor, sabidamente associada aos efeitos inibitórios da reabsorção óssea e à inibição da produção de citocinas do tipo 1 (Th1). Pouco se conhece, porém, do seu real papel nas lesões periapicais (TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010). O efeito inibitório do TGF- β foi descrito pela primeira vez em 1986 por Kehrl e colaboradores. Observou-se que ele impedia a proliferação de células B e T (WAN & FLAVELL, 2008). Entretanto, a evidência definitiva de seu papel veio com a análise das respostas à infecção em camundongos deficientes para esse gene (WAN & FLAVELL, 2008). Atualmente, sabe-se que o TGF- β inibe a proliferação e diferenciação das células T e a ativação dos macrófagos. Atua também em outras células, como os leucócitos polimorfonucleares e as células endoteliais, em grande parte contrabalanceando os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Camundongos nocautes para o gene TGF- β 1 desenvolvem lesões inflamatórias descontroladas, sugerindo que essa citocina é necessária para a manutenção da homeostase (STASHENKO *et al.*, 1998; ABBAS *et al.*, 2008; WAN & FLAVELL, 2008).

Teixeira-Salum *et al.* (2010) avaliaram os níveis de NO, IL-4, TGF- β , TNF- α e IFN- γ em lesões periapicais, determinando sua possível associação com parâmetros clínicos e radiográficos. Concluíram que os granulomas periapicais apresentam um ambiente regulatório caracterizado por alta expressão de TGF- β e pouca de citocinas pró-inflamatórias, enquanto os cistos radiculares exibem uma resposta inflamatória mista (Th1 e Th2), com a presença de IFN- γ , TNF- α e IL-4.

Membros da superfamília do TGF- β são reguladores do crescimento celular, sua diferenciação, reparo e inflamação. TGF- β 1 é o tipo predominantemente mais expresso pelo sistema imune (BOTTINGER *et al.*, 1997; WAN & FLAVELL, 2008). Camundongos deficientes para TGF- β (TGF- β ^{-/-}) embora normais ao nascimento, rapidamente desenvolvem

um resposta inflamatória multifocal caracterizada por um denso infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos, nos principais órgãos, na polpa dental e na região periapical (BOTTINGER *et al.*, 1997; STASHENKO *et al.*, 1998). Para melhor investigar a função do TGF- β , muitos autores usam métodos para bloquear a sinalização dessa molécula, com anticorpos para seus receptores (WAN & FLAVELL, 2008).

Muitos laboratórios utilizam um modelo animal de indução de patologias pulpar e periapical. Induzem a exposição pulpar experimental e subsequente infecção do SCR por microrganismos oriundos do ambiente oral (STASHENKO *et al.*, 1998; KAWASHIMA & STASHENKO, 1999; KAWASHIMA *et al.*, 2007; DE ROSSI *et al.*, 2008; ALSHWAIMI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011). Nesse modelo, a destruição óssea periapical inicia-se precocemente, com um rápido período de destruição óssea, observado entre o sétimo e o décimo quarto dias (fase ativa) após a exposição pulpar, seguido por uma fase mais lenta de reabsorção óssea (fase crônica) (TANI-ISHI *et al.*, 1995; KAWASHIMA & STASHENKO, 1999). Acredita-se que esse processo assim se desenvolve porque, nas fases iniciais, o sistema imune tende a eliminar e controlar a infecção utilizando efetores inflamatórios apropriados. Numa fase posterior, a resposta imune parece se associar a uma toxicidade mínima, quando se tenta conter os agentes infecciosos que não foram eliminados precocemente (MANETTI *et al.*, 1993).

Os avanços em engenharia genética e o desenvolvimento de camundongos imunodeficientes (nocautes) nos anos 90 contribuíram para o surgimento de novos conceitos e modelos de pesquisa em imunologia (MAK *et al.*, 2001). Esses avanços contribuem para o esclarecimento de muitas dúvidas relacionadas à patogênese das alterações perirradiculares, principalmente quanto à participação das respostas efetoras e sua modulação pelo sistema imune hospedeiro. Dentre essas respostas destacam-se: os efeitos bacterianos sobre a imunidade não específica, prevenindo ou reduzindo a inflamação periapical (MARCATO *et*

al., 2008); as respostas imunes específicas, prevenindo a disseminação de infecções endodônticas (TELES *et al.*, 1997; HOU *et al.*, 2000); a regulação imune dos processos inflamatórios periapicais (SASAKI *et al.*, 2000). O estudo da resposta inflamatória periapical também envolve outros aspectos, tais como: a ecologia e a patogenicidade microbianas; a regulação das respostas imune: inata e adaptativa; os seus efeitos sobre os tecidos periapicais. A melhor compreensão desses aspectos oferecerá melhores condições para se estudar as várias facetas dessa patogenia (RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002). É nesse contexto que a utilização de animais *germ-free* traz uma grande contribuição às pesquisas na área, permitindo a observação dos reais efeitos de agentes etiológicos específicos sobre os tecidos pulpo-perirradiculares, sem a interferência de uma microbiota residente. Entretanto, esse modelo precisa incorporar os avanços conquistados com a engenharia genética, que levou ao desenvolvimento de camundongos nocautes para determinados genes àqueles em condições isentas de germes.

OBJETIVOS

2 Objetivos

Objetivo geral:

Avaliar a resposta imune dos tecidos perirradiculares de camundongos gnotoxênicos submetidos a uma infecção endodôntica experimental com microrganismos recuperados de uma infecção radicular humana.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar o perfil imune periapical de camundongos isentos de germes, frente à indução de uma infecção mista, constituída de microrganismos recuperados de infecções radiculares humanas - *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus prevotii* - e que, sabidamente sinergizam *in vitro*; comparar os efeitos individuais dessas espécies, quando inoculadas em monoinfecção;
- 2) Quantificar por *Real Time* PCR a expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , RANKL, IL-10, IL-4, e TGF- β nos tecidos perirradiculares desses animais, no 7º e 14º dias após a infecção experimental.

Cytokine expression in response to root canal infection in gnotoxenic mice

Kamilla Faria Maciel, MSc¹, Luciana Carla Neves de Brito, DDS, PhD¹, Warley Luciano Fonseca Tavares, DDS, PhD¹, Gil Moreira Júnior, DDS, PhD⁴, Jacques Robert Nicoli, PhD², Leda Quercia Vieira, PhD³, and Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, DDS, PhD¹.

¹ Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

³ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

⁴ Faculdade de Odontologia, Fundação Universidade de Itaúna (FUI).

Correspondence: Antônio P. Ribeiro Sobrinho, Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 30.161-970, Belo Horizonte, MG, Brasil.
(Tel.: +5531 34992470; e-mail: sobrinho.bhz@terra.com.br).

Abstract

Aim: To examine the cytokine expression profile during periapical lesion development in response to synergetic human pathogens in a gnotoxenic mouse model.

Methodology: *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus prevotii* human isolated strains had been previously demonstrated to be synergistic *in vitro*. These strains were inoculated into the root canals of germ-free mice in either mono- or bi-association. Animals were sacrificed 7 and 14 days after infection, and periapical tissues were collected. mRNA expression of the cytokines IFN- γ , TNF- α , RANKL, IL-10, IL-4, and TGF- β was assessed using real-time PCR.

Results: The mRNA expression of IFN- γ and TNF- α was up-regulated by *F. nucleatum* during the acute (day 7) and chronic phase (day 14) of periapical lesion development. However, in bi-infection the expression of IFN- γ and TNF- α were almost absent at both time points. RANKL mRNA expression was down-regulated during dual-infection at the chronic phase. As IL-4 expression was similar at both time points, IL-4 does not appear to be involved in the periapical response to these bacterial strains. IL-10 was up-regulated during the chronic phase by mono-infection with either *F. nucleatum* or *P. prevotii*. Dual infection increased TGF- β mRNA expression on day 7, which paralleled the decrease in IFN- γ and TNF- α mRNA levels at the same time point. *F. nucleatum* increased TGF- β mRNA expression during the chronic phase.

Conclusion: The cytokine profile expressed depends on the nature of the bacterial challenge because we observed species-specific host cytokine responses. Both TGF- β and IL-10 appeared to be regulating the proinflammatory cytokine responses at both time points of the periapical immune response.

Keywords: cytokines, germ-free mice, periapical lesions.

Introduction

All bacteria that colonise the oral cavity can invade the root canal system (RCS). Currently, studies using molecular biology techniques have demonstrated the polymicrobial aetiology of endodontic infections (Lana *et al.* 2001; Gomes *et al.* 2004; Brito *et al.* 2007; Siqueira Jr. *et al.* 2009). Several bacterial species have been associated with the pathogenesis of periradicular diseases, with anaerobic bacteria prevalent in these infections (Lana *et al.* 2001; Peters *et al.* 2002; Gomes *et al.* 2004; Siqueira Jr. *et al.* 2004; Brito *et al.* 2007; Siqueira Jr. *et al.* 2009; Narayanan & Vaishnavi 2010; Tavares *et al.* 2011). Selective environmental pressures (Sundqvist 1992; Siqueira Jr. *et al.* 2009) present in root canals, such as nutrients, oxygen availability, and microbial interactions contribute to the anaerobic status of invading bacteria. Additionally, microbial interactions, which can be synergistic or antagonistic (Socransky *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 1998; Peters *et al.* 2002; Socransky & Haffajee 2005), are important factors in the establishment and colonisation of the root canal (Caires *et al.* 2007; Sundqvist & Figdor 2007). Synergism occurs when the metabolism of a species produces nutrients and growth factors that are reliable food sources for another species, while antagonism occurs when a microorganism produces substances that may be toxic to or inhibit the growth of another species (Sundqvist 1992; Caires *et al.* 2007). Moreover, it has been shown, in polymicrobial infections, that the pathogenic effects of the microorganisms are affected by synergistic bacterial relationships (Metzger *et al.* 2009).

In turn, the host response to infection in the RCS is complex and involves the recruitment of inflammatory cells to the periapical tissues and an extensive network of immune mechanisms, including cytokine production (Seymour & Taylor 2004; Prso *et al.* 2007; De Rossi *et al.* 2008; Gazivoda *et al.* 2009). Periapical lesion development depends on the proinflammatory and immunomodulatory cytokines released during infection and the inflammatory restrictions that occur during the chronic phase of lesion development (Ribeiro-

Sobrinho *et al.* 2002; Colic *et al.* 2009, 2010; Teixeira-Salum *et al.* 2010). It has been proposed that proinflammatory cytokines, such as IFN- γ , TNF- α and RANKL, play a fundamental role in periapical bone destruction (Menezes *et al.* 2008). IFN- γ is a key mediator of macrophage activation that up-regulates IL-1 and TNF- α expression (Kawashima *et al.* 2007; Colic *et al.* 2009; Gazivoda *et al.* 2009). IFN- γ secretion is primarily triggered by IL-12 and down-regulated by IL-10 (Colic *et al.* 2010). TNF- α is a soluble mediator that plays a role in initiating and coordinating the cellular events associated with the immune response to infection (Prso *et al.* 2007) by up-regulating the host response to bacteria and stimulating bone resorption (Graves *et al.* 2011). Bone resorption depends on the balance between the production of RANKL, which promotes osteoclast differentiation, and its natural decoy receptor, OPG (Kawashima *et al.* 2007; Menezes *et al.* 2008; Colic *et al.* 2010; Graves *et al.* 2011). Studies performed *in vivo* suggest that IFN- γ and TNF- α influence the regulation of periapical bone resorption by inducing NO (Fukada *et al.* 2009; Silva *et al.* 2011). Additionally, IFN- γ may interact with TNF- α to induce the overexpression of RANKL and activate osteoclastic bone resorption (Fukada *et al.* 2009; Teixeira-Salum *et al.* 2010). The synergistic effects of RANKL and proinflammatory cytokines are induced in the periapical area in response to bacterial stimuli, which then contribute to periapical lesion expansion (Kawashima *et al.* 2007; De Rossi *et al.* 2008).

Conversely, immunosuppressive mechanisms are responsible for healing and restricting inflammation in periapical lesions (Ribeiro-Sobrinho *et al.* 2002; Colic *et al.* 2009, 2010; Teixeira-Salum *et al.* 2010). TGF- β is known to inhibit bone resorption during osteoclast formation and differentiation (Gazivoda *et al.* 2009; Teixeira-Salum *et al.* 2010) and is an important regulatory cytokine with potent immunosuppressive effects. Furthermore, TGF- β inhibits the production of IL-1, TNF- α , IFN- γ while also antagonising the biological activities of these cytokines (Colic *et al.* 2009). However, little is known about the role of

TGF- β in the pathogenesis of human periapical lesions. Similarly, IL-4 has been shown to exert an inhibitory effect on bone resorption by generating negative effects on osteoclasts while stimulating the synthesis and mineralisation of bone matrix (Teixeira-Salum *et al.* 2010). IL-4 also stimulates the humoral immune response by inducing antibody production and B cell differentiation (Colic *et al.* 2006; Garlet 2010). IL-10, which is produced by APCs, T regulatory cells and other cell types, is important in the downregulation of the inflammatory processes in advanced lesions (Gazivoda *et al.* 2009) and plays an important role in bone tissues partly through the induction of OPG synthesis (Sasaki *et al.* 2000; Colic *et al.* 2010).

The aim of this study was to evaluate the cytokine expression profile during periapical lesion development in response to synergistic human pathogens in a gnotobiotic mouse model.

Materials and Methods

Mice

Germ-free mice aged 4 to 8 weeks (Swiss/NIH, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil) were used and kept in Trexler-type isolators (Class Biologically Clean, Madison, WI, USA). For experimental procedures, the animals were transferred into microisolators (UNO Roestvastaal BV, Zevenaar, The Netherlands). All manipulations were performed under sterile conditions in a laminar flow hood (Veco, Campinas, Brazil). The animals were fed *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the animal ethics committee (151/2010, CETEA/UFGM).

Microorganisms

The microorganisms used were recovered from a patient treated at the Endodontic Clinic of the Dentistry School of the Universidade Federal de Minas Gerais. The bacteria recovered were *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus prevotii*; their identification has previously been described (Moreira Jr. *et al.* 2011). The isolated strains were stored at -70°C and re-grown in pre-reduced brain heart infusion broth supplemented with haemin and menadione (BHI-SPRAS) (Difco, Detroit, MI, USA). Incubations were performed at 37°C in an anaerobic chamber containing an atmosphere of 85% N₂, 10% H₂ and 5% CO₂ (Forma Scientific Company, Marietta, OH, USA).

Experimental root canal infection

The experimental procedures were performed with the animals under general anaesthesia; the animals were anaesthetised using 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Dopalen, Division Vetbrands Animal Health, Jacareí, SP, Brazil) and 10 mg/kg xylazine (Anasedan, Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brazil). The pulpal chamber of the upper

right first molar was accessed with an endodontic operative microscope (Alliance, São Paulo, SP, Brazil) and a ¼ carbide bur (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) coupled to a controlled rotation hand piece (Driller, São Paulo, SP, Brazil). The pulpal chambers were opened until the entrances of the canals could be visualised and probed with a n° 8 endodontic K file. There were no surgical interventions on the upper left first molar, which served as the control. For root canal infections, the concentration of the bacterial samples, which were grown in BHI-SPRAS (Difco), was adjusted to be approximately 10^7 CFU/25µl in the same broth. Bacterial suspensions were inoculated into the root canal system using tuberculin syringes and needles; following inoculation, the cavities were sealed with paraffin (Ribeiro-Sobrinho *et al.* 2001). Three groups of mice were inoculated as follows: group I, *P. prevotii* and *F. nucleatum* strains; group II, *F. nucleatum*; and group III, *P. prevotii*. Six mice were used for each experimental group per time point; time points were 7 and 14 days after the surgical procedure.

Sample preparation

The mice were sacrificed at 7 and 14 days after root canal inoculation. The periapical tissues surrounding the root apices and the bone subjected to surgery was aseptically removed, rinsed in phosphate-buffered saline, flash frozen in a mixture of dry ice and ethanol and stored at -70°C. Total periapical tissues and bone RNA was isolated using TRIzol reagent (Gibco/BRL Laboratories, Grand Island, NY, USA). After the addition of TRIzol, chloroform was added, and the mixture was centrifuged at $12,000 \times g$ at 4°C for 15 minutes. The aqueous phase was then collected, and the RNA was precipitated by the addition of isopropanol followed by centrifugation at $12,000 \times g$ at 4°C for 10 minutes. The precipitated RNA was washed once with cold 75% ethanol, dried, dissolved in RNase free water, incubated at 55°C for 10 minutes and then stored at -70°C.

Real-time PCR

Complementary DNA was synthesised using 2 µg of RNA by reverse transcription as described by Silva *et al.* (2008). The standard PCR conditions were as follows: a holding stage of 95°C for 10 minutes; a cycling stage with 40 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 minute; and a melting curve stage of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 minute, and 95°C for 15 sec. The primer sequences used for the analysis of IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , RANKL and TGF- β mRNA expression by quantitative real-time PCR are shown in Table I. Real-time PCR was performed using the Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In addition, the SYBR-Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. The housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) was also amplified and used to normalise mRNA expression levels. All samples were run in duplicate in a 20 µl reaction volume with 1 µg of cDNA. Sequence Detection Software, version v 2.0 (Applied Biosystems), was used to analyse the data after amplification. The results were obtained as threshold cycle (Ct) values, which represent the cycle number at which the fluorescence levels passed a fixed threshold. Expression levels were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. The Ct values are expressed as the mean of two independent measurements, and the expression levels of mRNA for all samples are expressed as the ratio between the expression of the gene of interest and the expression of HPRT. All data were analysed using the SPSS statistical program (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Levene's test was used to assess the equality of variance of the data, whereas a *t*-test for independent samples was used to evaluate the significance of the differences observed between groups. Differences in mRNA expression levels were considered to be statistically significant when the *p*-value was < 0.05.

Results

Real-time PCR analyses of IFN- γ , TNF- α , RANKL, IL-10, IL-4, and TGF- β mRNA expression levels were performed with periapical samples from gnotoxenic mice. At day 7 post-inoculation, the mRNA expression of IFN- γ was significantly increased by *F. nucleatum* infection compared to *P. prevotii* infection and infection with both strains. However, at day 14 post-inoculation, IFN- γ mRNA expression in *F. nucleatum* infection was markedly diminished, which resembled the IFN- γ mRNA expression levels present in the response to infection with *P. prevotii* or both strains. Conversely, the expression of TNF- α was significantly increased by *F. nucleatum* infection at day 14 compared to *P. prevotii* infection alone or infection with both *F. nucleatum* and *P. prevotii*. RANKL mRNA expression was only down-modulated by dual infection in the chronic phase (Figure 1).

The immunomodulatory cytokine IL-10 was significantly up-regulated on day 14 post-inoculation by both *F. nucleatum* and *P. prevotii* mono-infections compared to its expression to the same stimuli at day 7 post-inoculation. These results correlate with the observed decrease in IFN- γ mRNA expression at the same point. At day 14 post-inoculation, the bi-association of these bacterial strains induced a decrease in IL-10 expression. IL-4 does not appear to be involved in the periapical immune response to these infections because its expression was similar at both time points analysed in each infection situation. At day 7 post-inoculation, TGF- β mRNA expression was significantly increased in response to *F. nucleatum* and *P. prevotii* dual infection compared to mono-infection with either strain; this result paralleled the decreased IFN- γ and TNF- α mRNA expression observed for dual infection at the same time point. It was also observed that the *F. nucleatum* mono-infection induced an increase in TGF- β mRNA expression during the chronic phase (day 14) compared to the acute phase (day 7); however, TGF- β mRNA levels were decreased following *F. nucleatum* mono-infection compared to *P. prevotii* mono-infection at both time points.

Finally, dual infection significantly induced the down-regulation of TGF- β mRNA expression at day 14 post-inoculation (Figure 2).

Discussion

This research hypothesised that the profile of cytokines expressed in periapical tissues in response to a two-strain synergistic bacterial challenge would be different from an infection with individual species. Several researchers have used animal models to assess the periapical immune response to root canal infections (Kawashima & Stashenko 1999; Sasaki *et al.* 2000; Ribeiro-Sobrinho *et al.* 2002; Kawashima *et al.* 2007; De Rossi *et al.* 2008; Alshwaimi *et al.* 2009; Garlet *et al.* 2010; Silva *et al.* 2011). Currently, to induce RCS infections, researchers open root canals and let them be contaminated by unknown microbiota from the oral cavity (Kawashima & Stashenko 1999; Kawashima *et al.* 2007; Alshwaimi *et al.* 2009; Silva *et al.* 2011). Several studies have used gnotobiotic animals, which permit the evaluation of a specific microbial challenge as a model to study root canal infections (Kakehashi *et al.* 1965; Ribeiro-Sobrinho *et al.* 2002, 2005). In this study, using synergistic bacteria recovered from a human root canal for microbial challenge experiments (Moreira Jr. *et al.* 2011), we evaluated the cytokine expression profile in the periapical tissues of gnotoxenic mice.

IFN- γ is the main activator of macrophages, which subsequently produce cytokines and other mediators that play a significant role in the development of periradicular diseases (Colic *et al.* 2006). Moreover, it has been proposed that IFN- γ is critical for the suppression of pathologic bone resorption associated with inflammation because it inhibits osteoclastogenesis by interfering with the RANKL-RANK signalling pathway and induces the rapid degradation of tumour necrosis factor receptor-associated factor 6 (Sasaki *et al.* 2004; Takayanagi *et al.* 2005; Queiroz-Junior *et al.* 2010). In our study, IFN- γ mRNA expression was significantly up-regulated by *F. nucleatum* infection compared to infection with *P. prevotii* or both *F. nucleatum* and *P. prevotii* at day 7 post-infection. The increased IFN- γ mRNA expression on day 7 to *F. nucleatum* infection was paralleled with lower IL-10

expression at this time point; however, the relative expression of these two cytokines was inverted on day 14 post-inoculation. These results are consistent with previous studies that have shown that Th1 immune responses, mediated by IFN- γ , together with other proinflammatory cytokines, are involved in lesion progression and bone destruction at the beginning of periapical lesion development, while the immunosuppressive mechanisms mediated by Th2 cytokines are responsible for healing and the restriction of the inflammatory/immune mechanisms at the later phase of infection (Akamine *et al.* 1994; Kawashima & Stashenko 1999; Lukic 2000). Moreover, the expression of IFN- γ is primarily triggered by IL-12 and down-regulated by IL-10 (Colic *et al.* 2010).

TNF- α is expressed early and in large quantities by macrophages in response to infection and in human periapical lesion (Stashenko *et al.* 1998; Prso *et al.* 2007). Huang *et al.* (2011) demonstrated that during Gram-negative polybacterial challenge, bacteria synergise and induce the release of cytokines, such as TNF- α , from macrophages. Local TNF- α production plays a role in up-regulating the host response to bacteria and in stimulating bone resorption (Graves *et al.* 2011). Our results showed that the expression of TNF- α was increased by mono-infection with *Fusobacterium nucleatum* at day 14 post-inoculation. Gazivoda *et al.* (2009) have suggested that the exacerbation of the inflammatory response to infection is most likely triggered by the enhancement of bacterial pathogenicity. Taken together, these results demonstrate that the proinflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α were significantly up-regulated only by mono-infection with *Fusobacterium nucleatum* in different phases of periapical lesion development. Interestingly, when *F. nucleatum* was associated with *P. prevotii*, both proinflammatory cytokines, IFN- γ and TNF- α , were almost absent at the both phases of infection (days 7 and 14 post-inoculation).

Bone resorption depends on the balance between the production of RANKL and its natural decoy receptor, OPG (Kawashima *et al.* 2007; Menezes *et al.* 2008; Colic *et al.* 2010;

Graves *et al.* 2011). When RANKL expression is enhanced, it binds to RANK and favours osteoclast differentiation and bone resorption (Khosla 2001; Colic *et al.* 2010; Queiroz-Júnior *et al.* 2010; Graves *et al.* 2011). Although proinflammatory cytokines produced by IFN- γ -activated macrophages increased the expression of RANKL (Khosla 2001; Menezes *et al.* 2008), we observed that on day 7 post-inoculation the RANKL mRNA expression was similar in both of the mono-infections and in the dual infection. However, RANKL mRNA was down-modulated in chronic phase (day 14). Using a rat mice model, where molar pulps were exposed and left open to the oral environment, Kawashima *et al.* (2007) observed the expression of RANKL on day 7 after pulpal exposure, which was followed by a significant increase in RANKL expression on day 14. The difference between these results and our study is most likely related to the microbial composition of the root canal infection.

IL-4 has been shown to exert an inhibitory effect on bone resorption (Teixeira-Salum *et al.* 2010) and on macrophage function (Colic *et al.* 2006). However, IL-4 does not appear to be involved in the periapical immune response in our study because its expression was similar at both time points analysed. This result is in accordance with previous findings that demonstrated that IL-4 did not exhibit a significant effect on periapical lesion modulation in mice (Sasaki *et al.* 2000; De Rossi *et al.* 2008).

Proinflammatory mechanisms must be controlled to prevent excessive periapical destruction (Gazivoda *et al.* 2009). IL-10 attenuates the progression of bone loss by stimulating OPG production, which inhibits bone resorption by causing unproductive RANK-RANKL interactions (Garlet 2010). In our study, a significant up-regulation of IL-10 mRNA expression was observed in response to *F. nucleatum* and *P. prevotii* mono-infections on day 14 post-inoculation compared to IL-10 mRNA levels detected on day 7 post-inoculation. Interestingly, the expression of IL-10 on day 14 was significantly decreased in dual infections when compared to both mono-infections. Additionally, the predictable immunosuppressive

role of IL-10 was also observed, as its up-regulation coincided with decreased IFN- γ mRNA expression at the later phase of lesion development; these results are consistent with the published literature (Kawashima & Stashenko 1999; Lukic 2000; Colic *et al.* 2009). Consistent with our results, Sasaki *et al.* (2000) demonstrated that IL-10, but not IL-4, suppressed infection-induced bone resorption in experimental periapical lesions in a knock-out mouse model.

Different cell types are able to produce TGF- β , which inhibits the osteoclast differentiation associated with bone remodelling (Chen & Bates 1993; Menezes *et al.* 2006) by stimulating the production of fibronectin and collagen (Skaleric *et al.* 1997). In humans, TGF- β expression has been identified in periapical lesions (Tyler *et al.* 1999; Gazivoda *et al.* 2009; Teixeira-Salum *et al.* 2010); however, Colic *et al.* (2009) reported that the concentrations of TGF- β and IL-10 did not significantly differ between granulomas and cysts, suggesting that the anti-inflammatory processes are equally controlled. In this study, TGF- β mRNA expression on day 7 in response to dual infection was significantly higher compared to both mono-infections. TGF- β mRNA up-expression paralleled the observed decrease in IFN- γ and TNF- α mRNA expression under the same conditions at the same time point, suggesting that proinflammatory cytokines may be regulated by TGF- β expression. TGF- β is a potent immunosuppressive factor that down-regulates the transcription of pro-inflammatory factors, such as TNF- α and IL-1 β (Gazivoda *et al.* 2009; Garlet 2010). In this study, *F. nucleatum* mono-infection induced an increase in TGF- β expression during the chronic phase (day 14) compared to the acute phase (day 7); however, these changes in TGF- β mRNA expression were more subtle compared the changes observed following *P. prevotii* infection at both time points. Similar to IL-10, dual infection significantly decreased TGF- β mRNA expression compared to both mono-infections at day 14 post-inoculation. Taken together, it appears that both TGF- β and IL-10 regulate proinflammatory immune responses during the

acute and chronic phases of periapical lesion development, respectively. In spite of this, their expression depended on the infection status, as well as if the bacterial stimuli were in mono- or bi-association.

Our results suggest that the cytokine profile expressed in periapical tissues in response to root canal infections depends on the bacterial challenge because both selected species induced specific host immune responses. We also demonstrated that the synergistic effects between *F. nucleatum* and *P. prevotii* observed *in vitro* (Moreira Jr. *et al.* 2011) did not induce higher proinflammatory cytokine expression *in vivo*. In contrast, at most time points analysed, dual infection decreased the expression of almost all cytokines. The only exception was TGF- β , which was increased during the acute phase on day 7 post-inoculation. Finally, the gnotobiotic mouse model played an important role in allowing us to address the periapical immune response to a known bacterial challenge.

Acknowledgments:

This work was supported by FAPEMIG, CAPES and CNPq. The authors wish to thank the post-graduate program at the School of Dentistry of UFMG. LCNB and WLFT are CAPES fellows; LQV, JRN, and APRS are CNPq fellows.

Table I. Primer sequences

Gene	Sense and antisense	Length (bp)
HPRT	5 [′] - GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G - 3 [′] 5 [′] - GAT TCA ACT TGC CGT CAT CTT AGG C - 3 [′]	162
TNF- α	5 [′] - CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A - 3 [′] 5 [′] - TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC - 3 [′]	171
IFN- γ	5 [′] - TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA - 3 [′] 5 [′] - TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG - 3 [′]	90
RANKL	5 [′] - CAT CCC ATC GGG TTC CCA TAA - 3 [′] 5 [′] - CCC TTA GTT TTC CGT TGC TTA ACG AC - 3 [′]	103
IL-4	5 [′] - ACA GGA GAA GGG ACG CCA T - 3 [′] 5 [′] - GAA GCC CTA CAG ACG TCA - 3 [′]	94
IL-10	5 [′] - GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA - 3 [′] 5 [′] - ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT - 3 [′]	190
TGF- β	5 [′] - TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG - 3 [′] 5 [′] - GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC - 3 [′]	169

Legends to Figures

Figure 1 - mRNA Expression of IFN- γ , TNF- α , and RANKL cytokines in periapical tissues analysed by real-time PCR. Relative mRNA expression levels were quantified by comparison with the internal control (HPRT). Data are expressed as the mean \pm SE for 3 independent experiments, each with 6 mice *per* group. \diamond $p < 0.05$, *F. nucleatum*-mono-infected group compared to dual infected group at the same time point; \oplus $p < 0.05$, *P. prevotii*-mono-infected group compared to the dual infected group at the same time point; \blacklozenge $p < 0.05$, comparison between both of the mono-infected groups at the same time point; \star $p < 0.05$, comparison between the same groups at different times points.

Figure 2 - mRNA Expression of IL-10, IL-4, and TGF- β cytokines in periapical tissues analysed by real-time polymerase chain reaction. Relative mRNA expression levels were quantified by comparison with the internal control (HPRT). Data are expressed as the mean \pm SE for 3 independent experiments, each with 6 mice *per* group. \diamond $p < 0.05$, *F. nucleatum*-mono-infected group compared to the dual infected group at the same time point; \oplus $p < 0.05$, *P. prevotii*-mono-infected group compared to the dual infected group at the same time point; \blacklozenge $p < 0.05$, comparison between both of the mono-infected groups at the same time point; \star $p < 0.05$, comparison between the same groups at different time points.

Figure 1

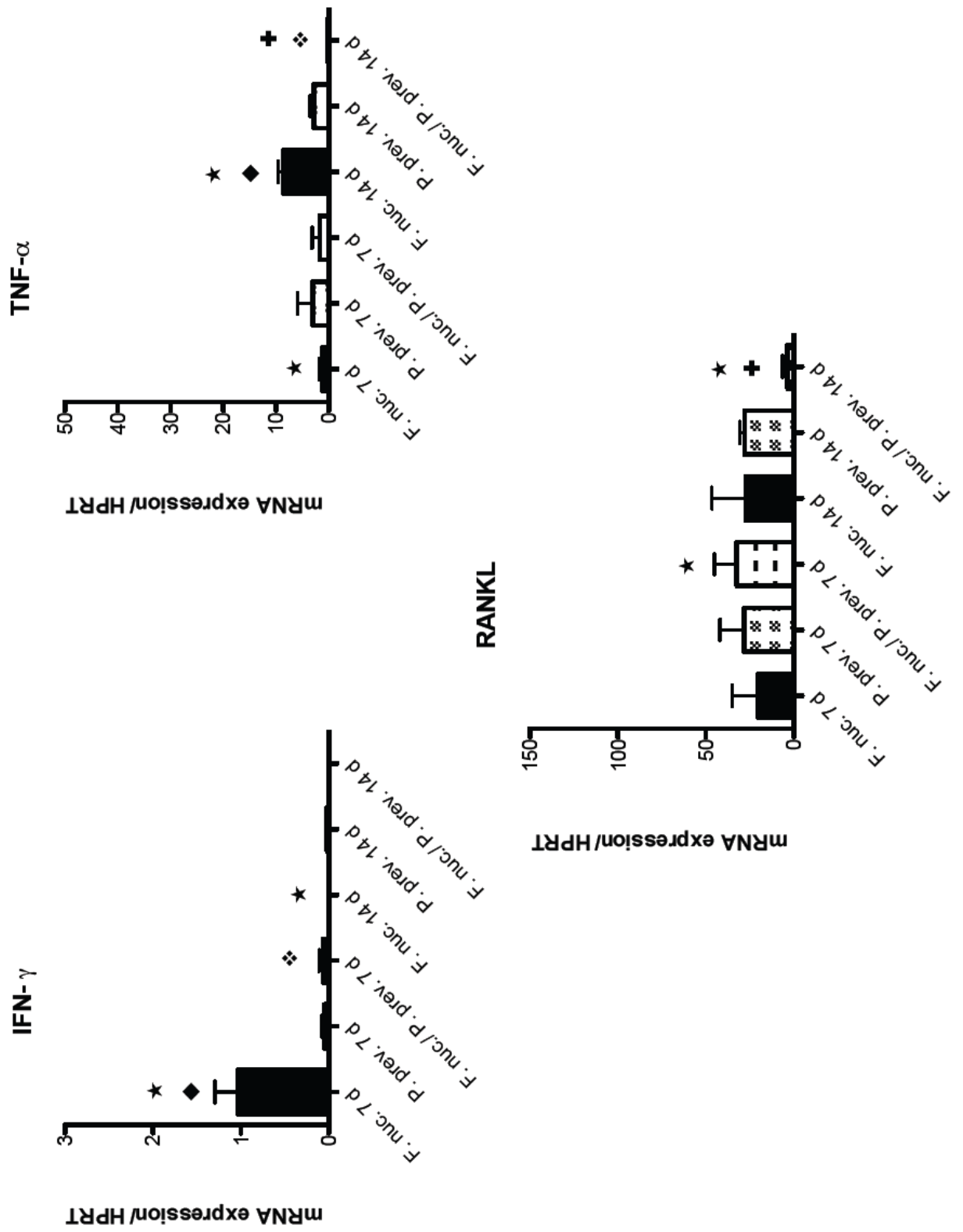
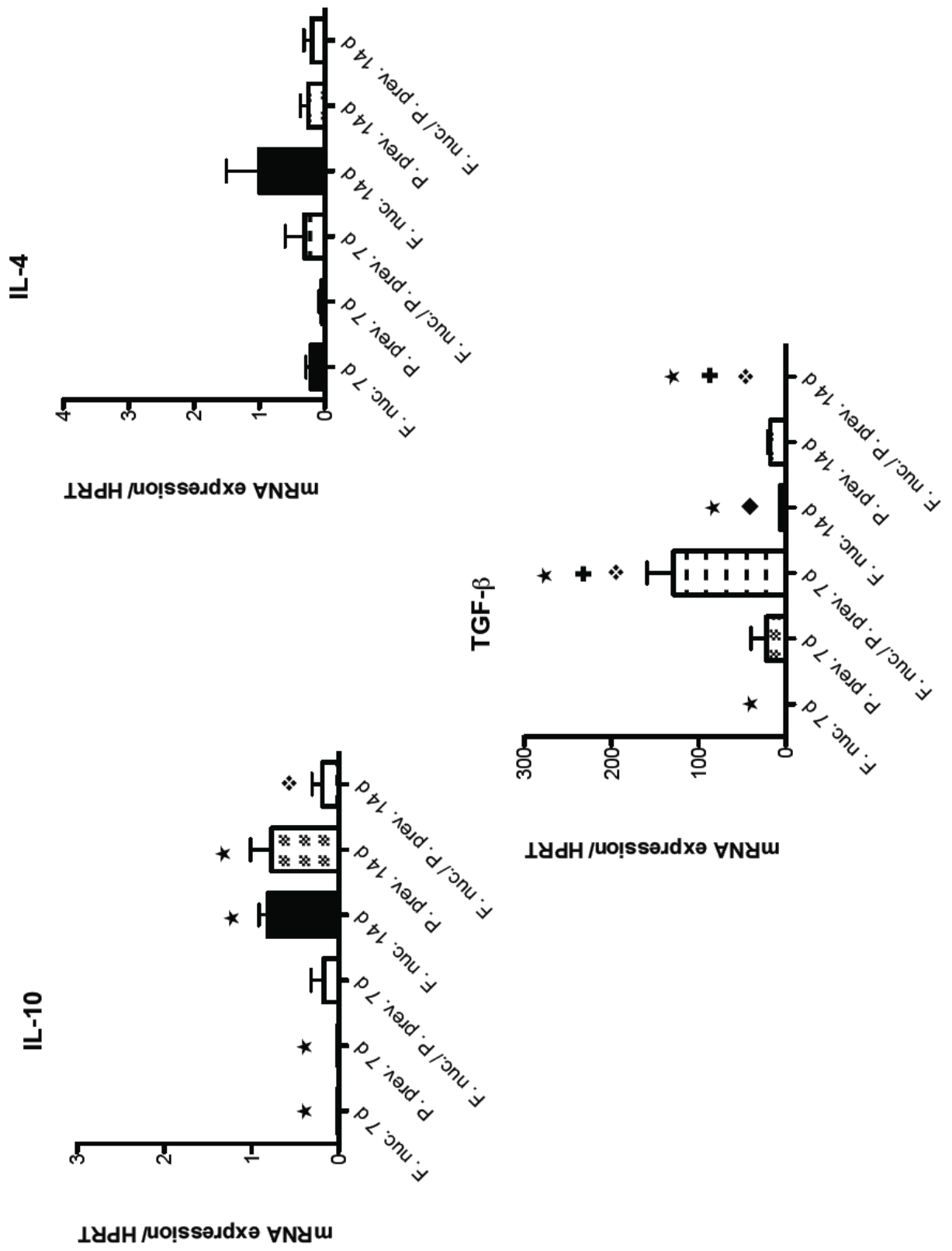


Figure 2



References

- Akamine A, Anan H, Hamachi T, Maeda K (1994) A histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *Journal of Endodontics* **20**, 474-8.
- Alshwaimi E, Purcell P, Kawai T *et al.* (2009) Regulatory T cells in periapical lesions. *Journal of Endodontics* **35**, 1229-33.
- Brito LCN, Teles FR, Teles RP *et al.* (2007) Use of Multiple-Displacement Amplification and Checkerboard DNA-DNA Hybridization to Examine the Microbiota of Endodontic Infections. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 3039-49.
- Caires NCM, Matos AM, Farias LM *et al.* (2007) Partial characterization of antagonistic substance produced by a *Clostridium butyricum* strain. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**, 265-9.
- Chen TL, Bates RL (1993) Recombinant human transforming growth factor-beta1 modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture. *Journal of Bone and Mineral Research* **8**, 423-34.
- Colic M, Lukic A, Vucevic D *et al.* (2006) Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Archives of Oral Biology* **51**, 1120-30.
- Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, Sasa V, Rudolf R, Lukic A (2009) Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology* **47**, 101-13.
- Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevi D, Luki A (2010) Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **39**, 690-6.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA (2008) Interferon-gamma, Interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and chemokine receptor 5, but not Interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *Journal of Endodontics* **34**, 31-4.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ (2009) Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 25-31.

Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research* **89**, 1349-63.

Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF *et al.* (2010) CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *Journal of Endodontics* **36**, 244-50.

Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M (2009) Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **38**, 605-11.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR *et al.* (2004). Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral microbiology and immunology* **19**, 71-6.

Graves DT, Oates T, Garlet GP (2011) Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology* **17**, 5304-19.

Huang CB, Altimova Y, Strange S, Ebersole JL (2011) Polybacterial challenge effects on cytokine/chemokine production by macrophages and dendritic cells. *Inflammation Research* **60**, 119-25.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **20**, 340-9.

Kawashima N, Stashenko P (1999) Expression of bone resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Archives of Oral Biology* **44**, 55-66.

Kawashima N, Suzuki N, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, Suda, H (2007) Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **103**,707-11.

Khosla S (2001) Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* **142**, 5050-5.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R *et al.* (2001) Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiology and Immunology* **16**, 100-5.

Lukic A (2000) Transforming growth factor- β is a major down-regulatory cytokine in periapical lesions. *Balkan Journal of Stomatology* **4**, 157-60.

Menezes R, Bramante CM, Da Silva Paiva KB *et al.* (2006) Receptor activator NF Kappa ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **102**, 404-9.

Menezes R, Garlet TP, Letra A *et al.* (2008) Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of lesions. *Journal of Endodontics* **34**,932-8.

Metzger Z, Lin YY, DiMeo F, Ambrose WW, Trope M, Arnold RR (2009) Synergistic Pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the mouse subcutaneous chamber model. *Journal of Endodontics* **35**, 86-94.

Moreira Jr. G, Ribeiro-Sobrinho AP, Bamberra BHS *et al.* (2011) Synergistic growth effect among bacteria recovered from root canal infections. *Brazilian Journal of Microbiology* (*in press*).

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry* **13**, 233-9.

Oliveira AAP, Farias LM, Nicoli JR, Costa E, Carvalho MAR (1998) Bacteriocin production by *Fusobacterium* isolates recovered from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and marmosets. *Research in Microbiology* **149**, 585-94.

Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ (2002) Combinations of bacterial species in endodontic infections. *International Endodontic Journal* **35**, 698-702.

Prso IB, Kocjan W, Simic H *et al.* (2007) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation* **2007**, Article ID 38210.

Queiroz-Junior CM, Silva MJB, Corrêa JD *et al.* (2010) A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clinical and Developmental Immunology* **2010**, 327417.

Ribeiro-Sobrinho AP, Almeida LM, de Farias LM *et al.* (2001) Implantation of bacteria from human pulpal necrosis and translocation from root canals in gnotobiotic mice. *Journal of Endodontics* **27**, 605-9.

Ribeiro-Sobrinho AP, Melo Barros MH, Faria LM *et al.* (2002) Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral microbiology and Immunology* **17**, 344 - 53.

Ribeiro-Sobrinho AP, Rabelo FLA, Figueiredo CBO *et al.* (2005) Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 413-6.

Sasaki H, Hou L, Belani A *et al.* (2000) IL-10 but not IL-4, supresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *The Journal of Immunology* **165**, 3626-30.

Sasaki H, Balto K, Kawashima N *et al.* (2004) Gamma Interferon (IFN- γ) and IFN- γ -inducing cytokines Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **11**, 106-10.

Seymour GJ, Taylor JJ (2004) Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology 2000* **35**, 9-13.

Silva MJB, Vieira LQ, Ribeiro-Sobrinho AP (2008) The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **105**, 70-6.

Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL *et al.* (2011) The Role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *Journal of Dental Research* **90**, 495-500.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Rosado AS (2004) Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 363-70.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG (2009) Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **107**, 721-6.

Skaleric U, Kramar B, Petelin M, Palvica Z, Wahl SM (1997) Changes in TGF-b1 levels in gingival crevicular fluid and serum associated periodontal inflammation in humans and dogs. *European Journal of Oral Science* **26**, 458-63.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-44.

Socransky SS, Haffajje AD (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**,135-87.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R (1998) Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **9**, 498-521.

Sundqvist, G (1992) Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 257-62.

Sundqvist G, Figdor F (2007) A big role for the very small-understanding the endodontic microbial flora. *Australian Dental Journal* **52**, S38-S51.

Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T (2005) Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunological Reviews* **208**, 181-93.

Tavares WLF, Neves de Brito LC, Teles RP *et al.* (2011) Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA–DNA hybridization. *International Endodontic Journal* **44**, 225-35.

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DBR, Gervásio AM, Souza CJA, Rodrigues Jr V, Loyola AM (2010) Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, **39**, 250-6.

Tyler LW, Matossian K, Todd R, Gallagher GT, White RR, Wong DTW (1999) Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF- α and TGF- β_1) in human periradicular lesions. *Journal of Endodontics*, **25**, 619-24.

CONCLUSÃO

4 Conclusão

Em resumo, podemos dizer que:

- Os microrganismos selecionados, quando inoculados no SCR dos animais isentos de germes, foram capazes de induzir a expressão de citocinas nos tecidos perirradiculares adjacentes;
- O modelo animal gnotoxênico mostrou-se eficaz, nos permitindo avaliar a resposta imune a uma infecção conhecida, na ausência de interferência da microbiota indígena do animal;
- O efeito sinérgico observado previamente, *in vitro*, com um maior crescimento do *Fusobacterium nucleatum* induzido pelo *Peptostreptococcus prevotii*, não induziu uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*.

Concluimos que:

A imunomodulação, detectada por meio da expressão de citocinas nos tecidos perirradiculares dos animais gnotoxênicos, foi infecção-específica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6^a edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Ltda; 564 pág., 2008.
2. BIRKCDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J Periodontal Res**, v.28, p.500-510, 1993.
3. BOTTINGER, E.P.; LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. Biology of TGF- β in knockout and transgenic mouse model. **Kidney International**, v.51, p.1355-1360, 1997.
4. DE SÁ, A.R.; PIMENTA, F.J.G.S.; DUTRA, W.O.; GOMEZ, R.S. Immunolocalization of Interleukin-4, Interleukin-6 and lymphotoxin- α in dental granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93, p.356-360, 2003.
5. DE SÁ, A.R.; MOREIRA P.R.; XAVIER G.M.; SAMPAIO I.; KALAPOTHAKIS E; DUTRA W.O.; GOMES R.S. Association of CD14, IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. **Int Endod J**, v.40, p.563-572, 2007.
6. DE WAAL, R.M.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **JEM**, v.174, n.4, p.915-924, October 1991.

7. DIVEU, C.; McGEACHY, M.J.; CUA, D.J. Cytokines that regulate autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v.20, n.6, p.663-668, Dec. 2008.
8. FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R, HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, n.11, p.3815-3822, 1991.
9. HAFFAJJE, A.D.; SOCRANSCKY, S.S. Microbiology of periodontal disease: introduction. **Periodontol 2000**, v.38, n.12, p.9-12, 2005.
10. HOU, L.; SASAKI, H.; STASHENKO, P. B-cell deficiency predisposes mice to disseminating anaerobic infections: protection by passive antibody transfer. **Infect Immun**. v.68, p.5645-5651, 2000.
11. JACINTO, R.C.; GOMES, B P.F.A.; SHAH HAROUN, N.; FERRAZ, C.C.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F.J. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. **J Med Microbiol**, v.54, p.777-783, 2005.
12. JONTELL, M.; OKIJI, T.; DAHLGREN, U.; BERGENHOLTZ, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, n.2, p.179-200, 1998.
13. KAWASHIMA, N.; OKIJI, T.; KOSAKA, T.; SUDA, H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of Endodontics**, v.22, n.6, p.311-316, 1996.
14. KONG, Y-Y.; YOSHIDA, H.; SAROSI, I.; TAN, H.L.; TIMMS, E.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J.; VAN, G.; ITIE, A.; KHOO, W.; WAKEHAM, A.; DUNSTAN, C.R.; LACEY, D.L.; MAK, T.W.; BOYLE, W.J.;

- PENNINGER, J.M. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v.397, p.315–323, 1999.
15. LACEY, D.L.; TIMMS, E.; TAN, H-L; KELLY, M.J.; DUNSTAN, C.R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, F.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y.X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALBOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W.J. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v.93, p.165–176, 1998.
16. MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M.G.; PICCINNI, M.P.; MAGGI E.; TRINCHIERI, G. Natural killer cell stimulatory factor Interleukin-12 (IL-12) induces T helper type 1 (Th1) specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. **J Exp Med**, v.177, p.1199-1204, 1993.
17. MANGASHETTI, L. S.; KHAPLI, S.M.; WANI, M.R. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappaB and Ca²⁺ signaling. **Journal of Immunology**, v.175, p.917-925, 2005.
18. MAK, W.T.; PENNINGER, J.M; OHASHI, P.S. Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. **Nat Rev Immunol**, v.1, p.11-19, 2001.
19. MARCATO, L.G.; FERLINI. A.P.; FREIRE BONFIM; R.C.; RAMOS-JORGE, M.L.; ROPERT, C.; AFONSO, L.F.C.; VIEIRA, L.Q.; RIBEIRO-SOBRINHO, A.P. The role of toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens. **Oral Microbiol Immunol**, v.23, p.1-8, 2008.

20. McGEACHY, M.J.; CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v.28, n.4, p.445-453, April 2008.
21. MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; DE WAAL, M.R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**, v.11, p.165-190, 1993.
22. MOSMANN, T.R. Properties and functions of Interleukin-10. **Adv Immunol**, v.56, p.1-26, 1994.
23. ROLPH, H.J.; LENNON, A.; RIGGIO, M.P.; SAUNDERS, W.P.; MACKENZIE, D.; COLDERO, L.; BAGG, J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.9, p.3282-3289, Sept. 2001.
24. SAKAMOTO, M.; RÔÇAS I.N.; SIQUEIRA Jr., J.F. BENNO Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiol Immunol**, v.21, p.112-122, 2006.
25. SIQUEIRA Jr., J.F.; RÔÇAS, I.N. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infection. **J Microbiol**, v.43, p.3314-3319, 2005a.
26. SIQUEIRA Jr., J.F.; RÔÇAS, I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. **Journal of Endodontics**, v.31, n.7, p.488-498, July 2005b.
27. STASHENKO, P.; DEWHIRST, F.E.; PEROS, W.J.; KENT, R.L.; AGO, J.M. Synergistic interactions between Interleukin-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. **Journal of Immunology**, v.138, p.1464-1468, 1987.

28. SUNDQUIVST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surgery. Oral Med Oral Pathol**, v.78, p.522-530, 1994.
29. TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **Int Endod J**, v.31, p.311-325, 1998.
30. TANI-ISHI, N.; WANG C.Y.; STASHENKO A. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. **Oral Microbiol Immunol**, v.10, p.213-219, 1995.
31. TELES, R.; WANG, C.Y.; STASHENKO, P. Increased susceptibility of AG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. **Infect Immun**, v.65, p.3781-3787, 1997.
32. VERNAL, R.; DEZEREGA, A.; DUTZAN, N.; CHAPARRO, A.; LÉON, R.; CHANDÍA, S.; SILVA, A.; GAMONAL, J. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. **Oral Diseases**, v.12, p.283-289, 2006.
33. WAN, Y.Y.; FLAVELL, R.A.; TGF- β and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. **J Clin Immunol**, v.28, n.6, p.647-659, 2008.
34. WATANABE, K.; TANKA, Y.; MORIMOTO, Y.; YAHATA, K.; ZEKI, K.; FUJIHIRA, T.; YAMASHITA, U.; ETO, S. Interleukin-4 as potent inhibitor of bone resorption. **Biochem Biophys Res Commun**, v.172, p.1035-1041, 1990.
35. WILLEMS, F.; MARCHANT, A.; DELVILLE, J-P.; GÉRARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; BOER, M DE.; GOLDMAN, M. Interleukin-10 inhibits B7 and

intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. **European Journal of Immunology**, v.24, p.1007-1009, 1994.

36. WONG, B.R.; JOSIEN, R.; YOUNG LEE, S.; SAUTER, B.; LI, H-L; STEINMAN, R.M.; CHOI, Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. **J Exp Med**, v.186, p.2075–2080, 1997.

37. ZEHNDER, M.; GOLD, S.I.; HASSELGREN G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. **J Clin Periodontol**, v.29, p.663-671, 2002.

Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 151/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da expressão de citocinas em resposta endodôntica experimental em camundongos isentos de germes**", que tem como responsável(is) **Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **6/10/2010**.

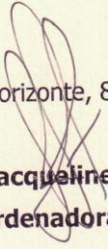
Este certificado expira-se em **6/10/2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 151/2010**, related to the project entitled "**Evaluation of cytokine expression in response to endodontic infection in germ-free mice**", under the supervisors of **Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 6, 2010**.

This certificate expires in **October 6, 2015**.

Belo Horizonte, 8 de Outubro de 2010.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)