

**MARCELA CARVALHO ESPALADORI**

**RESPOSTA IMUNE PERIAPICAL À MEDICAÇÃO INTRACANAL À  
BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E SELÊNIO**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2019**

Marcela Carvalho Espaladori

## **RESPOSTA IMUNE PERIAPICAL À MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E SELÊNIO**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de concentração em Endodontia

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Antônio Paulino R. Sobrinho  
**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Leda Quercia Vieira

Belo Horizonte  
2019

## Ficha Catalográfica

E77r Espaladori, Marcela Carvalho.  
2019 Resposta imune periapical à medicação intracanal à base  
T de hidróxido de cálcio e selênio / Marcela Carvalho  
Espaladori. -- 2019.

54 f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.  
Coorientadora: Leda Quercia Vieira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Selênio. 2. 16S. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Medicação  
intracanal. 5. Citocinas. 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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

RESPOSTA IMUNE PERIAPICAL À MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE  
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E SELÊNIO

**MARCELA CARVALHO ESPALADORI**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Endodontia.

Aprovada em 26 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador  
FO-UFMG

  
Prof(a). Elen Marise Castro de Oliveira  
UFMG

  
Prof(a). Ana Cecilia Diniz Viana  
FO-UFMG

  
Prof(a). Frank Ferreira da Silveira  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

  
Prof(a). Manoel Damiao Sousa-neto  
FORP-USP

Belo Horizonte, 26 de julho de 2019.

Dedico esta conquista ao meu esposo,  
Fernando, por toda ajuda e apoio  
incondicional. Ao meu filho Otávio, que  
me ensinou o verdadeiro amor!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por guiar meus caminhos e pensamentos.

À minha mãe, amor e educação acima de tudo!

Aos meus amados irmãos, Nayara, Bruno e Leo.

Ao meu querido avô, cunhados, cunhadas e sogro. O apoio de vocês foi essencial.

Aos meus tios, Eduardo e Marcos, que indiretamente desde a infância me incentivaram a chegar até aqui.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pelos ensinamentos, dedicação, compreensão e paciência e muita paciência! Exemplo de ser humano e profissional.

À Professora Leda Quercia Vieira, pela co-orientação e por ter me recebido em seu laboratório (Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia – LAGI/ICB-UFMG) com todo carinho e respeito.

Aos queridos colegas de laboratório (LAGI/ICB), agradeço o companheirismo nesta jornada.

À amiga, Kamilla Maciel cuja amizade tornou tudo mais fácil e doce.

Aos queridos colegas do laboratório de sinalização celular, Anderson e Jamil, que gentilmente tornou acessível e tranquilo o uso do real time PCR.

À amável Mariana Cardoso do laboratório de parasitologia, suas explicações sobre PCR e estatística foram de suma importância para a conclusão deste trabalho.

Aos demais companheiros de doutorado e laboratório, pelo carinho e amizade.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar....”

Andrew Stanton

## RESUMO

O tratamento endodôntico tem como objetivo eliminar a contaminação microbiana dos sistemas de canais radiculares (SCR) por meio da instrumentação mecânica e irrigação química (PMQ). Quando não for possível a resolução em uma única sessão, o SCR deverá ser preenchido com uma medicação intracanal para evitar a recolonização microbiana tardia. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do hidróxido de cálcio, mundialmente utilizado como medicação intracanal, associado ao selênio (H.C + Se), em dentes portadores de necrose pulpar. A amostra foi composta por 60 pacientes que possuíam dentes com indicação de tratamento endodôntico, divididos em grupos (n=15): sem medicação intracanal (Empty); que foram medicados com hidróxido de cálcio (H.C), Selênio (Se) e hidróxido de cálcio + selênio (H.C + Se). Após a abertura coronária, 3 cones de papel absorvente foram inseridos no terço inicial do conduto e mantidos por 2 min para avaliação microbiana. Após o PMQ, novos cones foram introduzidos nos SCR, ultrapassando-se 2mm do ápice radicular, e mantidos no tecido perirradicular por 2min para a coleta do fluido intersticial periapical. A coleta foi novamente realizada 15 dias após o PMQ. A expressão gênica do mRNA do fragmento 16S de procariontes, das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-10, IL-6 e MCP-1 foram quantificadas por PCR em tempo real. O mRNA 16S foi avaliado antes do PMQ e 15 dias após, nos grupos sem medicação e com medicação intracanal. A redução significativa da carga microbiana foi observada apenas no grupo com medicação intracanal ( $p < 0,05$ ). Observou-se um aumento da expressão gênica das citocinas (T15) TNF- $\alpha$  e IL-10 no grupo H.C+Se em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). A expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  reduziu nos grupos tratados com as medicações (H.C, Se, H.C + Se). Conclui-se que o uso de medicação intracanal é imprescindível para se evitar a recolonização do SCR. A inclusão do selênio na pasta de hidróxido de cálcio resultou na potencialização da expressão de citocinas que permitirão o reparo dos tecidos perirradiculares.

**Palavras-chave:** Selênio. 16S. Hidróxido de cálcio. Medicação intracanal. Citocinas.



## ABSTRACT

### **Periapical immune response to intracanal medication based on calcium hydroxide and selenium**

Endodontic treatment aims to eliminate the microbial contamination of the root canal system (RCS) and is achieved with the use of mechanical instrumentation and chemical irrigation. When resolution in a single session is not possible, the RCS should be filled with intracanal medication to avoid subsequent recolonization. The present study aimed to evaluate the effect of calcium hydroxide, which is used globally as an intracanal medication, in combination with selenium (CH + Se) as an intracanal medication in teeth with pulp necrosis. The sample consisted of 60 patients requiring endodontic treatment who were divided into groups: without intracanal medication (empty) and with medication; calcium hydroxide (CH), selenium (Se) and calcium hydroxide + selenium (CH + Se) (n = 15). After the coronary opening, three absorbent paper cones were inserted in the initial third of the RCS and maintained for 2min for microbial evaluation. After the cleaning and shaping procedures, new cones were introduced into the RCS, extending 2 mm from the root apex and were kept in the periradicular tissue for 2 min' to collect the periapical fluid. The collection was also performed 15 days later. Real time PCR was used to quantify the expression of the prokaryotic 16S ribosomal RNA gene. Additionally, the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-10, IL-6 and MCP-1 were also quantified by real-time PCR. The 16S mRNA was evaluated before the cleaning and shaping procedures and 15 days later in the groups treated with or without medication. A significant reduction in the microbial load was observed only in the intracanal group ( $p < 0.05$ ). There was an increase in the gene expression level of the cytokines (T15) TNF- $\alpha$  and IL-10 in the CH+ group compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). The expression of IFN- $\gamma$  mRNA was reduced in the groups treated with the medications (CH, Se, and CH + Se). The findings of the present study indicate that in the case of treatment over multiple sessions, the use of intracanal medication is essential to avoid the recolonization of the RCS. The inclusion of selenium with calcium hydroxide resulted in the potentiation of the anti-inflammatory phase of the periradicular tissues.

**Keywords:** Selenium. 16S. Calcium hydroxide. Intracanal medicament. Cytokines.

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 METODOLOGIA EXPANDIDA .....</b>	<b>14</b>
3.1 SELEÇÃO DOS CASOS.....	14
3.2 COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOINFLAMATÓRIOS.....	15
3.3 ANÁLISE IMUNOLÓGICA .....	16
3.3.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MRNA .....	16
3.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL- PCR .....	16
3.4 ASPECTOS ÉTICOS .....	18
3.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	19
<b>4 ARTIGO CIENTIFICO .....</b>	<b>20</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>42</b>
<b>ATIVIDADES DESENVOLVIDAS:.....</b>	<b>51</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O tecido conjuntivo pulpar é envolto por tecidos mineralizados que o protege da contaminação microbiana. O rompimento da integridade dessa barreira física promove a entrada de elementos nocivos à polpa que podem levar à sua inflamação, com consequente destruição tecidual (KAKEHASHI *et al.*, 1965).

A interação entre os irritantes químicos, mecânicos, bacterianos e a resposta de defesa do hospedeiro resulta na liberação de inúmeros mediadores que são capazes de estimular respostas imunes na região periapical (BRITO *et al.*, 2012; RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002; TAKAHASHI, 1998). Frente à uma agressão microbiana, a extensão da destruição tecidual dependerá da sua virulência, assim como da resistência dos tecidos do hospedeiro (KETTERING e TORABINEJAD, 1995). Ademais, os elementos microbianos ativam várias formas de reações imunes no hospedeiro, atuando como antígenos que estimulam a instalação da resposta local (BRITO *et al.*, 2012; JONTELI *et al.*, 1998; RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002). Sabe-se, que o desenvolvimento, bem como o controle de uma resposta imunológica, depende, em grande parte, da produção local de inúmeras citocinas que modulam o tipo de resposta do hospedeiro (BRITO *et al.*, 2012; DALE *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, houve fortes evidências de que muitos dos efeitos patogênicos microbianos sobre os tecidos periapicais operam-se de forma indireta, via estimulação de mediadores solúveis derivados do hospedeiro, como as citocinas e quimiocinas (BRITO *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2012; RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002; STASHENKO *et al.*, 1998). Daí o grande interesse em se conhecer esses mediadores e seus efeitos sobre as células imunocompetentes (SILVA *et al.*, 2005). Detecta-se uma grande variedade de células nas lesões perirradiculares humanas, dentre elas citam-se: os linfócitos TCD4+ e TCD8+, macrófagos, células plasmáticas, mastócitos, eosinófilos. As células T, entretanto, são as mais numerosas nessas lesões (COLIC *et al.*, 2009). Os linfócitos TCD4+ e CD8+, após seu contato com antígenos ou serem estimulados por outras células inflamatórias, podem produzir uma grande variedade de citocinas (MARTON e KISS, 2000).

Para a resolução das alterações inflamatórias pulpares e perirradiculares indica-se a realização do tratamento endodôntico. Durante o tratamento

endodôntico, a eliminação de microrganismos dos SCR infectados é uma etapa crucial que envolve o completo desbridamento mecânico-químico. Apesar de promover uma redução significativa da contagem de microrganismos (SAKAMOTO *et al.*, 2007), estudos demonstram que mesmo após a instrumentação do SCR, as paredes dentinárias podem permanecer intocadas pelos instrumentos (PETERS *et al.*, 2001). Apesar da constante evolução das técnicas de instrumentação e dos regimes de irrigação, a completa descontaminação não pode ser assegurada unicamente por esta terapêutica, devido à complexidade anatômica dos SCR (PETERS *et al.*, 2001; RICUCCI e SIQUEIRA 2010; SAKAMOTO *et al.*, 2008)

Duas abordagens terapêuticas podem ser empregadas, dependendo da condição biológica e anatômica do dente a ser tratado, do seu estado patológico, da experiência do clínico, da disponibilidade e preferência do paciente (MANFREDI *et al.*, 2016). A primeira abordagem visa obliterar o conteúdo bacteriano remanescente, através da obturação tridimensional do SCR (MANFREDI *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2019). Por meio da atividade antimicrobiana do cimento obturador e dos íons de zinco presente na guta percha, esta abordagem priva os microrganismos de nutrição e de espaço necessário para sobreviverem e se multiplicarem. (SIQUEIRA *et al.*, 2000; ZHONG *et al.*, 2019).

A segunda possibilidade é o tratamento em múltiplas sessões. A microbiota persistente no interior de túbulos dentinários, fissuras, reentrâncias e ramificações do SCR utiliza remanescentes necróticos do tecido pulpar como fonte nutricional, favorecendo a recolonização do SCR. Para evitá-la, faz-se necessário a utilização de medicação intracanal (LAW *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 1998; TAVARES *et al.*, 2012, 2013).

O hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais utilizada na prática endodôntica (ESTRELA *et al.*, 2003, TAVARES *et al.*, 2012). Vem sendo indicado por ser estável por longos períodos, possuir boa biocompatibilidade, ser bactericida em uma área limitada, além de induzir a formação de tecido mineralizado e ser efetivo contra a formação de exsudatos inflamatórios (BYSTROM *et al.*, 1985; ESTRELA *et al.*, 2001; TAVARES *et al.*, 2012). Sua ação antimicrobiana está relacionada à dissociação iônica (OH<sup>-</sup> e Ca<sup>+</sup>) que ocorre em presença de umidade (ESTRELA *et al.*, 2001). Os íons hidroxila liberados em tais circunstâncias são radicais livres altamente oxidantes que demonstram elevada reatividade com várias

biomoléculas (SIQUEIRA e LOPES 1999). Os efeitos letais dos íons hidroxila sobre as células bacterianas operam-se por meio dos seguintes mecanismos de ação: dano à membrana citoplasmática bacteriana; desnaturação proteica e dano ao DNA (SIQUEIRA e LOPES, 1999).

A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio também se baseia na sua capacidade de formar uma barreira química e física no interior do conduto. Tavares e colaboradores (2012, 2013), demonstram a importância da medicação intracanal na redução dos mecanismos pró-inflamatórios que ocorrem no período que sucede a eliminação da carga microbiana intracanal pelos procedimentos de limpeza e formatação.

Cada vez é maior o número de pesquisas que visam a melhoria dos medicamentos e protocolos utilizados na rotina clínica (ESPALADORI *et al.*, 2018; HUNGARO *et al.*, 2009; ITO *et al.*, 2011; LIMA *et al.* 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2000). Espaladori *et al.*, (2018) obtiveram benefícios interessantes ao associar o selênio ao MTA em tratamentos de perfurações experimentais de furca. Os autores relataram que esta associação potencializou o efeito reparador do MTA.

A literatura demonstra a utilização do selênio (Se) em diversas aplicações médicas, tais como, tratamentos contra o câncer, em inibição de crescimento bacteriano, em alterações do metabolismo ósseo e em estimulação do sistema imunitário (MEDHI *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2012).

O selênio pertence ao grupo dos metalóides, possuindo características tanto de metais quanto de não metais. É encontrado naturalmente em humanos, animais e plantas (TRAN *et al.*, 2009). As selenoproteínas, na qual está presente o aminoácido selenocisteína, apresentam um importante papel em muitas funções corporais, tais como na defesa antioxidante e formação de hormônios da tireoide (MEDHI *et al.*, 2013).

Em estudos prévios, demonstrou-se que o selênio orgânico funciona como um gerador catalítico de radicais superóxido a partir da oxidação de tióis (SEKO e IMURA 1997). Tran e colaboradores (2012) demonstraram que o Se covalentemente ligado a diferentes biomateriais e dispositivos médicos, tais como cateteres intravenosos e lentes de contato, por osmose inversa, bloqueia a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (TRAN *et al.*

2009, 2012). Baixas concentrações de organo-selênio (0,1% ou 0,2%) são suficientes para inibir a adesão bacteriana nesses materiais (Tran *et al.*, 2013).

O Se pode retardar e alterar o metabolismo ósseo (ZENG *et al.*, 2013). A concentração sanguínea de Se parece estar inversamente relacionada com a taxa de renovação óssea e positivamente correlacionada com a prevalência de baixa densidade mineral óssea (DMO), em seres humanos (HOEG *et al.*, 2012; ZENG *et al.*, 2013). Os estudos sobre os mecanismos de ação do Se têm sugerido um mecanismo subjacente, isto é, que o Se desempenha um papel essencial na defesa antioxidante, na proliferação e diferenciação celular e de apoio na vigilância imunitária (BHASKARAN, 2002; HUANG *et al.*, 2012). O nível adequado de Se no organismo é essencial para uma resposta imunitária ótima; o seu desequilíbrio afeta tanto a imunidade inata quanto a adquirida (BHASKARAM, 2002). A sua ingestão inadequada está associada com baixos títulos de anticorpos IgG e IgM (ARTHUR *et al.*, 2003). Nas células T, a ausência de selenioproteínas levou à diminuição de reservas de células T maduras e à ativação de células T defeituosas (SHRIMALI *et al.*, 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune periapical de dentes humanos submetidos ao tratamento endodôntico e tratados com medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, selênio, e hidróxido de cálcio associado ao selênio, comparando a expressão de citocinas, imediatamente após a limpeza e formatação dos SCR, com aquela observada 15 dias após a instituição da terapia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo quantificar a expressão gênica de citocinas e quimiocinas, nos tecidos perirradiculares de indivíduos portadores de infecções endodônticas submetidos à terapia endodôntica de rotina, em resposta a diferentes tipos de medicações intracanaís.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a contaminação microbiana pela expressão gênica da subunidade 16S do RNA ribossomal de procaríotas.
- Caracterizar, por PCR em tempo real, a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17A, IL-10 e da quimiocina MCP-1 no tecido periapical de dentes infectados submetidos à terapia endodôntica.
- Avaliar o efeito da utilização da pasta de hidróxido de cálcio sobre a expressão gênica das citocinas e quimiocina acima descritas, quando utilizada como medicação intracanal.
- Avaliar o efeito da utilização do selênio sobre a expressão dos mediadores pró e anti-inflamatórios acima descritos, quando utilizada como medicação intracanal.
- Avaliar o efeito da utilização da pasta de hidróxido de cálcio associado ao selênio na expressão gênica das citocinas e quimiocina acima descritas, quando utilizada como medicação intracanal.
- Comparar os efeitos do hidróxido de cálcio, do selênio e da associação das duas medicações sobre a resposta imunológica periapical.

### 3 METODOLOGIA EXPANDIDA

#### 3.1 Seleção dos casos

Foram selecionados 60 pacientes, maiores de 18 anos, com indicação de tratamento endodôntico primário. Os dentes selecionados foram aqueles com diagnóstico de necrose pulpar. Para tal, fizeram-se testes de sensibilidade pulpar, exames radiográficos associados com o exame clínico. O procedimento endodôntico foi realizado na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG). Os pacientes selecionados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1), com informações sobre o objetivo da presente pesquisa. As coletas foram realizadas naqueles indivíduos que concordaram em participar do estudo e que possuíam um elemento dental com indicação de tratamento endodôntico. Os critérios de exclusão foram a utilização de antibióticos e anti-inflamatórios sistêmicos até três meses anteriores ao procedimento; presença de edema; portadores de desordem sistêmica que interferisse na aposição óssea e na resposta imunológica. Os pacientes foram examinados e os dados coletados e anotados em uma ficha clínica padrão. Foram seguidos os preceitos éticos da resolução 196/96 e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE:89043918.3.0000.5149) (ANEXO 2).

O dente selecionado, após os procedimentos clínicos iniciais, teve sua coroa clínica completamente isolada, utilizando-se dique de borracha, seguido de assepsia completa da coroa clínica (Möller, 1966), utilizando-se água oxigenada a 10 volumes, por cinco minutos, tintura de iodo a 5%, por cinco minutos e, posteriormente, tiosulfato de sódio a 5%, por mais cinco minutos. A limpeza e formatação dos canais radiculares foi realizada com limas de níquel-titânio ProTaper Universal (*Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland*), juntamente com hipoclorito de sódio a 5,2% como solução irrigadora. A coleta dos espécimes foi realizada em 3 tempos distintos, antes da instrumentação, logo após o PMQ e 15 dias após a instrumentação. Após o tratamento mecânico químico dos sistemas de canais radiculares, os 60 pacientes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, contendo 15 pacientes cada:

Grupo 1: Controle – sem medicação intracanal



Grupo 2: Medicação intracanal com selênio

Grupo 3: Medicação intracanal com Hidróxido de cálcio P.A

Grupo 4 : Medicação intracanal com Hidróxido de cálcio P.A associado com selênio

### 3.2 Coleta dos espécimes clínicos para identificação dos marcadores imunoinflamatórios

A coleta para análise microbiana se deu por meio da introdução de um cone absorvente #15. As demais coletas foram realizadas com cones #25, que foram introduzidos no interior do conduto, ultrapassando passivamente o forame radicular em 2 milímetros, para que o mesmo entrasse em contato com os tecidos perirradiculares, absorvendo o fluido intersticial. Os cones foram mantidos em posição por 2 minutos e cortados quatro milímetros a partir da ponta. Foram acondicionados em um *ependorf* e armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  (BRITO *et al.*, 2012, TAVARES *et al.*, 2012, 2013).

Após a primeira coleta clínica, dividiu-se a amostra em 4 grupos ( $n=15$ ), de acordo com a medicação utilizada: sem medicação, hidróxido de cálcio P.A, selênio e hidróxido de cálcio + selênio. Foi utilizado o selênio na forma de um sal, sódio selenite, de coloração branca e com peso molecular de 172,94 gr/ M. A literatura relata que o selênio é tóxico aos tecidos em concentrações acima de  $10\mu\text{M}$  (TRAN *et al.*, 2013), portanto, neste estudo, utilizou-se o selênio diluído em soro fisiológico em uma concentração de  $10\mu\text{M}$ , em conformidade com resultados prévios que demonstraram que nesta concentração o selênio não interfere na atividade dos macrófagos peritoneais. No grupo que recebeu o selênio como medicação, preencheu-se o SCR com uma solução a  $10\mu\text{M}$  com auxílio de uma seringa de 3ml e agulha 20x5,0mm (BD Plastipak, Curitiba- Paraná/ Brasil). No grupo que recebeu o hidróxido de cálcio, a medicação foi manipulada e introduzida nos condutos conforme as especificações recomendadas pelo fabricante (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Ibiporã/Paraná, Brasil). A manipulação da associação dos dois fármacos, hidróxido de cálcio e selênio, se fez seguindo-se as mesmas recomendações indicadas para o hidróxido de cálcio, mas substituindo-se o soro fisiológico pela solução do selênio a  $10\mu\text{M}$ .

O acesso coronário foi restaurado com cimento à base de óxido de zinco e eugenol (IRM Dentsply, Pensilvânia, EUA). Quinze dias após tais procedimentos, os dentes foram reabertos, irrigados com soro fisiológico e coletadas as amostras como descrito anteriormente. Em dentes com múltiplos canais, todas as coletas foram realizadas a partir do mesmo conduto, nos distais dos molares inferiores e nos palatinos de prés molares e dos molares superiores. Após a coleta, os dentes que não apresentavam nenhum sinal ou sintoma clínico foram obturados pela técnica de condensação lateral da guta percha.

### 3.3 Análise Imunológica

#### 3.3.1 Extração e quantificação do mRNA

Os cones contendo o fluído periapical foram macerados separadamente. Para extração do RNA total, utilizou-se o TRIzol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA), de acordo com instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000) (600nm).

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total, utilizando-se um *mix* contendo desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTPs), Oligo-dT<sub>15</sub> (Promega Corp.), Dithiothreitol (DTT), água tratada com DEPC e tampão da enzima transcriptase reversa (Promega Corp., Madison WI). Doze microlitros de *mix* e 1µg de RNA de cada amostra foram adicionados a cada tubo. As amostras foram levadas ao termociclador Thermo Hybaid (PCR Express - UK) sob as condições padrão para cDNA: 70°C por 5 minutos, 4°C por 5 minutos, pausa para adição de 3 µl da solução contendo a enzima (50U), 23°C por 5 minutos, 37°C por 1 hora, 90°C por 5 minutos e 5°C até o recolhimento das mesmas. Foi utilizado um volume final de 25 µl por reação. O cDNA foi armazenado em *freezer* a -20°C até sua utilização (BRITO *et al.*, 2012;SHMITTGEN e LIVAK 2008).

#### 3.3.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real- PCR

Inicialmente, foram utilizadas várias diluições dos iniciadores do gene normalizador gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) e do cDNA para se

determinar as concentrações ideais de cada amostra. Em seguida, diferentes diluições dos iniciadores específicos para cada uma das citocinas – IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL1- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-17A, MCP1 e 16S – foram analisadas para determinar a concentração ótima dos mesmos para cada reação (OVERBERGH *et al.*, 2003).

Estas concentrações foram utilizadas em todos os experimentos. As reações de qPCR foram realizadas em aparelho Step One Real Time PCR Systems empregando-se o kit SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA). Em cada poço de reação foram adicionados o cDNA, os *primers* específicos para cada determinação (5  $\mu$ M), o *master mix* e água para um volume final de 15 $\mu$ l. Em seguida, as placas foram colocadas na máquina e as reações de amplificação realizadas de acordo com o seguinte protocolo: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg e 60 °C por 1 min; seguida da curva de dissociação com incubação a 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min e aquecimento até 95 °C com análise simultânea.

Para se confirmar a especificidade das reações, analisaram-se as curvas de dissociação de todos os produtos amplificados. A expressão dos genes foi quantificada utilizando-se o método de Ct comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct$  Tratamento -  $\Delta Ct$  Controle), que se baseia na comparação de expressão do gene-alvo (normalizado para o controle endógeno) entre os grupos experimentais e o grupo controle. A análise dos perfis de amplificação foi baseada no ciclo no qual o Ct (*Threshold cycle*) é atingido e os resultados obtidos foram corrigidos automaticamente pelo Step one™ Software v 2.0, de acordo com o valor correspondente ao nível basal de fluorescência, medido nos primeiros ciclos da reação e antes da detecção da amplificação. O mRNA de GAPDH foi utilizado para normalizar todos os valores nos ensaios de qPCR (SHMITTGEN e LIVAK 2008).

No que se refere à avaliação de especificidade, foi executada a análise das curvas de dissociação, ao final de cada reação, para distinguir o sinal de fluorescência originado dos amplicons específicos daqueles relacionados com dimerização de iniciadores ou outros artefatos. Os resultados foram expressos como quantificação relativa, ou seja, expressa a variação relativa do gene em estudo, do grupo experimental em relação ao grupo controle.

Tabela 1: Sequência de primers

<b>Gene</b>	<b>Sense and Antisense</b>	<b>Length (bp)*</b>
GAPDH	FW: 5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3' RV 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'	96
TNF- $\alpha$	FW 5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G- 3' RV 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG- 3'	73
IFN $\gamma$	FW:5'-GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA- 3' RV:5'-TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA- 3'	95
IL-1 $\beta$	FW: 5'-TGG CAG AAA GGG AAC AGA A- 3' RV: 5'-ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA- 3'	59
IL-6	FW: 5'- GGA GAC TTG CCT GGT GAA- 3' RV: 5'- CTG GCT TGT TCC TCA CTA CTC-3'	60
MCP1	FW: 5'- CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3' RV: 5'- GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3'	93
IL-17 A	FW: 5'-CAT TGT GGC CAA GGA GAT CTG-3' RV: 5'-CTT CGG AGT TTG GGT TTG CTT-3'	52
IL-10	FW 5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3' RV 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T- 3'	107
16S	FW 5'-TGC GGG ACT TAA CCC AAC A- 3' RV 5'- TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A-3'	41

FW: forward primer; RV: reverse primer. \*Amplicon length in base pairs.

### 3.4 Aspectos éticos

Foram observados os aspectos éticos da Resolução 196/96, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – Plataforma Brasil (CAAE:89043918.3.0000.5149).

### 3.5 Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prisma 8.0 e Microsoft Excel 2007. Para comparação entre os resultados, inicialmente realizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para a determinação da normalidade dos grupos. Quando a distribuição dos dados apresentou distribuição normal, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste  $t$  de Student não-pareado para comparação entre 2 grupos. ANOVA foi utilizado quando se comparou mais de 2 grupos experimentais, seguido do pós teste de Turkey para a comparação entre todos os grupos. Quando a distribuição dos resultados apresentou distribuição não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos ou Kruskal-Walis com o teste de Dunn's, quando foram comparados mais de dois grupos. Valores de  $p$  inferiores a 0.05 foram considerados como significativos.

## 4 ARTIGO CIENTIFICO

### PERIAPICAL IMMUNE RESPONSE TO INTRACANAL CALCIUM AND SELENIUM HYDROXIDE-BASED MEDICATION

Endodontic treatment aims to eliminate the microbial contamination of the root canal system (RCS) and is achieved with the use of mechanical instrumentation and chemical irrigation. When resolution in a single session is not possible, the RCS should be filled with intracanal medication to avoid subsequent microbial recolonization. The present study aimed to evaluate the effect of calcium hydroxide (C.H.), which is used globally as a root canal dressing, in combination with selenium (C.H. + Se) in teeth with pulp necrosis. The sample consisted of 60 patients requiring endodontic treatment who were divided into groups: without intracanal medication (empty) and with medications: calcium hydroxide (C.H.), selenium (Se) and calcium hydroxide + selenium (C.H.+Se) (n = 15). After the coronary opening, three absorbent paper points were placed in the RCS and maintained for 2 min for microbial evaluation. Following the cleaning and shaping procedures, new paper points were introduced into the RCS, passing through the root apex (2 mm) into the periapical tissues for 2 minute. The collection was performed again 15 days later. Real-time PCR quantified the expression of the prokaryotic 16S ribosomal RNA. The 16S mRNA was evaluated before the cleaning and shaping procedures and 15 days later in the groups treated with or without medication. A significant reduction in the microbial load was observed only in the groups that received endodontic dressing (p <0.05). The cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-10, IL-6 and MCP-1, were also quantified by real-time PCR. There was an increase in the gene expression level of the cytokines (T15) TNF- $\alpha$  and IL-10 in the C.H. group compared to the other groups (p <0.05). The IFN- $\gamma$  mRNA expression was reduced in the groups treated with the medications (C.H., Se, and C.H. + Se). The findings of the present study indicate that in the case of treatment over multiple sessions, the use of root canal dressing is essential to avoid the RCS microbial recolonization. Selenium potentiated the effects of calcium hydroxide inducing an anti-inflammatory response in periapical tissues.

**Keywords:** Calcium hydroxide; Selenium; Intracanal medication; Cytokines.

## INTRODUCTION:

Dentinal tissue forms a physical barrier, which protects pulp against microbial contamination. When this barrier is violated, microorganisms from the oral cavity invade and colonize the root canal system (RCS), promoting periradicular alterations.<sup>1</sup> Periapical inflammation is a host-orchestrated response to infection, which involves the recruitment of cells and release of factors, such as chemokines and cytokines, that play an essential role in the processes of bone resorption and immune defence.<sup>1-3</sup>

The endodontic treatment promotes the eradication of RCS contamination, a crucial step that involves the complete debridement of the contaminants, and culminates with periapical healing.<sup>4</sup> Due to the RCS anatomical complexity, the complete decontamination of the channels cannot be assured solely by cleaning and shaping procedures.<sup>4-7</sup> The biofilm remaining in the dentinal tubules, cracks, isthmus, or walls that were not touched during root canal treatment may use the persistent necrotic pulp tissue as a nutritional source, leading to RCS microbial recolonization.<sup>7-9</sup> After root canal cleaning and shaping procedures, the use of a root canal dressing that acts as an antimicrobial and also physically fills the RCS may be necessary.<sup>8-10</sup>

The most commonly used intracanal medication around the world is calcium hydroxide ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).<sup>8-11</sup> Dissociation into  $\text{Ca}^+$  and  $\text{OH}^-$  ions in a moist environment causes the pH to rise by half.<sup>12</sup> The antimicrobial action of calcium hydroxide results from this dissociation.<sup>8,12</sup> In addition to having antimicrobial effects,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  acts on periradicular tissues, activating alkaline phosphatase, which plays a role in periapical bone formation.<sup>9-12</sup>

The search for new materials or components associated with medications routinely used in the clinic, potentiating their actions, has been the objective of several studies.<sup>12-15</sup> The association of selenium (Se) with mineral trioxide aggregate (MTA), has been shown to potentiate its reparative effect, increasing the expression of the cytokines  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{IL-10}$ .<sup>13</sup>

Se is a mineral that is essential for the formation of the amino acid selenocysteine, and consequently, it participates in the synthesis of selenoproteins, which are directly involved in various biological activities, such as antioxidant defence, cell division and differentiation, and adequate maintenance of the immune response.<sup>16-18</sup> Adequate levels of Se are necessary for the proper initiation of the

immune response.<sup>19-21</sup> Given these properties, selenium has been widely used in the medical field in the treatment of cancer, as an inhibitor of bacterial growth in biological instruments or prostheses, as an activator of bone metabolism, and as a stimulator of the immune system.<sup>16-21</sup>

The present study sought to evaluate the periapical immune response of human teeth submitted to cleaning and shaping procedures and treated with root canal dressing. It was used as an intracanal medication, calcium hydroxide, selenium (Se), and calcium hydroxide plus selenium. The expression of cytokines immediately after cleaning and shaping procedures was compared with that observed 15 days later.

## **METHODS:**

### **Subjects:**

Subjects were 60 patients referred to the Dental School at the Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brazil) to receive endodontic care. The exclusion criterion for this study was antibiotic therapy up to 3 months before starting endodontic therapy. All participants signed the Free Agreement Formulary. The Research Ethics Committee approved this study (CAAE: 89043918.3.0000.5149).

### **Sample Collection:**

Clinical samples were taken from 60 teeth (single and multirrooted) with pulp necrosis and with apical periodontitis that were diagnosed by clinical and radiographic analyses in addition to pulp sensibility tests. All selected patients failed to present acute periapical symptoms at the appointment time. Teeth were isolated by using a rubber dam, followed by complete asepsis, as previously described.<sup>10,22</sup> Before the cleaning and shaping procedures, an absorbent #15 cone was placed in the canal, held in position for 2 min and subsequently stored at -70°C for microbiological analysis. Cleaning and shaping of the root canals were completed by using ProTaper nickel-titanium files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in conjunction with 5.2% sodium hypochlorite. The samples were collected immediately after root canal cleaning to characterize the mRNA expression profiles of cytokines and chemokine. After cleaning and drying, three paper points were introduced into the root canal, passing through the root apex (2 mm) into the periapical tissues for 2 minute. The paper points were cut 4 mm from the tip and dropped into a



microcentrifuge tube, and the samples were stored at 70°C. By using this procedure, RNA was extracted from the periapical interstitial fluid.<sup>10,22</sup>

### **Root Canal Dressing:**

After the first clinical collection, the sample was divided into four groups (n = 15) according to the dressing received: calcium hydroxide, selenium, calcium hydroxide plus selenium, and a control group that received no medication.

Selenium was used as a white salt, sodium selenite, which has a molecular weight of 172.94 g/M. The literature reports that selenium is toxic to tissues at concentrations above ten  $\mu\text{M}$ ,<sup>23</sup> therefore, in this study, diluted selenium was used in 10  $\mu\text{M}$  saline solution.<sup>13,23</sup> In the group that received calcium hydroxide as a dressing, the handling and introduction into the canals followed the specifications recommended by the manufacturer (Biodynamic Chemistry and Pharmaceutical LTDA, Ibiporã / Paraná, Brazil). In the teeth that received the selenium, the RCS was filled with the solution at ten  $\mu\text{M}$ . The combination of medications was performed by replacing the saline solution in the manipulation of calcium hydroxide with 10 $\mu\text{M}$  selenium solution. The coronal accesses of the teeth were restored with eugenol-based cement (MRI Dentsply, Pennsylvania, USA).

Fifteen days later (day 15), the teeth were opened, irrigated with physiological saline, and sampled. Then, the RCS was tridimensionally filled.

### **Sample preparation:**

Total RNA was extracted from each sample with TRIzol reagent (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, NY) as described elsewhere.<sup>10</sup> RNA was then stored at 70°C.

### **Real-time Polymerase Chain Reaction:**

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 2  $\mu\text{g}$  of RNA by reverse transcriptase.<sup>24,25</sup> Polymerase chain reaction (PCR) was carried out under standard conditions: a holding stage of 95°C (10 minutes), a cycling stage with 40 cycles of 95°C (15 seconds), followed by 60°C (1 minute) and a melt curve stage of 95°C (15 seconds), 60°C (1 minute), and 95°C (15 seconds). The primer sequences used for quantitative PCR analysis GAPDH, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-10, IL-6, MCP-1 and the 16S rRNA fragment mRNA expression are shown in Table 1. The sequences of human primers were designed by using PRIMER EXPRESS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) based on nucleotide sequences available in the

GenBank database. The real-time PCR assay was performed using the StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems). A Syber-Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a housekeeping gene for normalization. All samples were run in duplicate. Sequence Detection Software version v 2.0 (Applied Biosystems) was used to analyze data after amplification. Results were obtained as threshold cycle (Ct) values. Expression levels were calculated by using the comparative  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.<sup>24</sup> The values were calculated as the mean value of duplicates for each patient, and the expression levels of mRNAs in all samples were defined as the ratio of each specific primer to GAPDH expression.

Table 1: Primer sequences

<b>Gene</b>	<b>Sense and Antisense</b>	<b>Length (bp)*</b>
GAPDH	FW: 5'-GCA CCA ACT GCT TAG CA-3' RV 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'	96
TNF- $\alpha$	FW 5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G- 3' RV 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG- 3'	73
IFN $\gamma$	FW: 5'-GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA- 3' RV: 5'-TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA- 3'	95
IL-1 $\beta$	FW: 5'-TGG CAG AAA GGG AAC AGA A- 3' RV: 5'-ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA- 3'	59
IL-6	FW: 5'- GGA GAC TTG CCT GGT GAA- 3' RV: 5'- CTG GCT TGT TCC TCA CTA CTC-3'	60
MCP-1	FW: 5'- CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3' RV: 5'- GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3'	93
IL-17 <sup>a</sup>	FW: 5'-CAT TGT GGC CAA GGA GAT CTG-3' RV: 5'-CTT CGG AGT TTG GGT TTG CTT-3'	52

IL-10	FW 5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3' RV 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T- 3'	107
16S	FW 5'-TGC GGG ACT TAA CCC AAC A- 3' RV 5'- TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A-3'	41

FW: forward primer; RV: reverse primer. \*Amplicon length in base pairs.

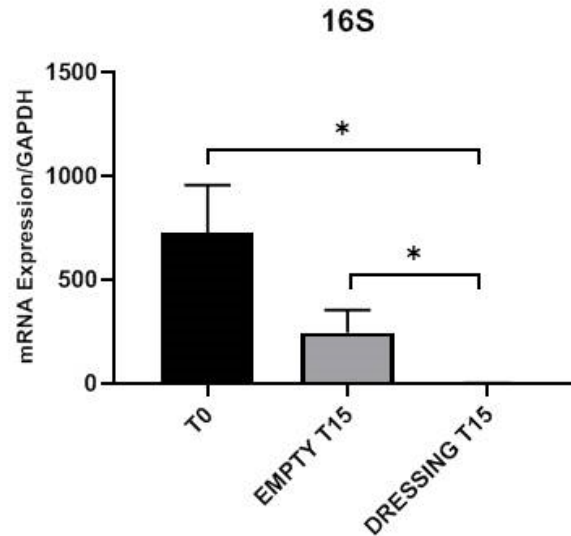
### Statistical analysis:

Data analysis was performed by using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were subjected to the Kolmogorov-Smirnov test to characterize their normality. If the data presented a normal distribution, the comparison between the two groups was performed using an unpaired Student's t-test and ANOVA for comparisons of more than two groups, followed by Tukey's posttest. When the distribution of the results was non-normal, the Mann-Whitney test was used for comparisons between two groups, and the Kruskal-Wallis with Dunn's test was used when more than two groups were compared. Values of p less than 0.05 were considered significant.

### RESULTS:

The 16S gene mRNA expression level was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in the dressing groups when compared to that of the groups at T0 and to that of the empty group at T15 (Figure 1).

No significant difference was observed between the all groups when the IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-6 and MCP-1 ( $p > 0.05$ ) cytokine gene expression levels were analyzed (data not shown).



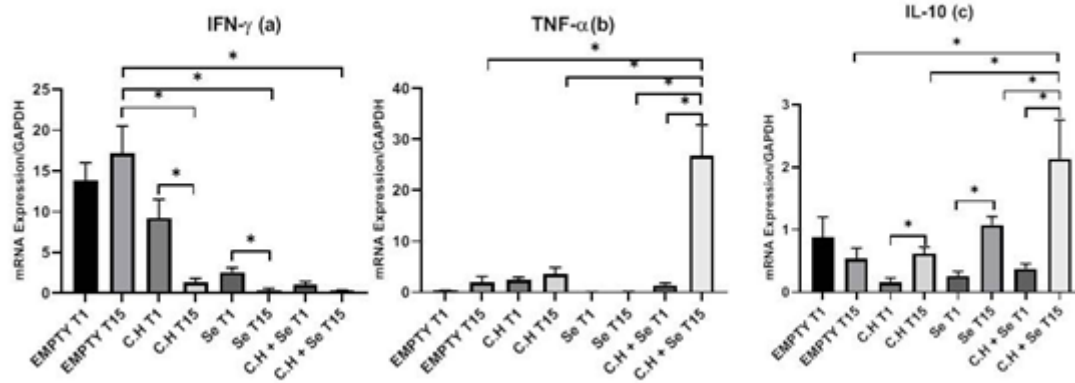
**Figure 1:** The mRNA expression of the prokaryotic 16S ribosomal RNA fragment before the cleaning and shaping procedures (T0) and 15 days later (T15), with or without dressing. The mRNA levels were determined by real-time PCR and quantified in comparison with those of the endogenous GAPDH gene by the  $2^{-\Delta CT}$  method; bars represent the standard error, \*  $p < 0.05$ .

The intergroup analysis showed that there was no significant difference in the IFN- $\gamma$  mRNA expression level between the two times evaluated in the control group (T1 / T15) ( $p > 0.05$ ). The expression of IFN- $\gamma$  was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in the groups treated with intracanal medication (C. H, Se and C. H + Se) than the control group (empty) at T15. Finally, in the groups treated with C. H and Se medications, a significant reduction in the mRNA expression level of the IFN- $\gamma$  gene was observed on the 15th day (Figure 2a).

Figure 2b shows the mRNA expression level of the TNF- $\alpha$  gene. There was no significant difference between the control, C. H. and Se groups when the T1 and T15 times ( $p < 0.05$ ) were compared in the same experimental group. In the C. H. group, a significant increase in the TNF- $\alpha$  gene expression level was observed when the two times were compared (T1 / T15) ( $p < 0.05$ ). The mRNA expression of the TNF- $\alpha$  gene was also assessed on the 15th day in the group treated with C. H. + Se and was significantly higher than that of all the other groups (empty, C.H. and Se) at the same evaluation time point ( $p < 0.05$ ).

Figure 2c shows the mRNA expression level of the IL-10 gene. There was no significant difference in the IL-10 gene mRNA expression between the two times

evaluated in the control group (T1 / T15) ( $p > 0.05$ ). A significant increase in the expression of IL-10 at T15 was observed in the dressing groups (C. H., Se and C. H. + Se) ( $p < 0.05$ ). Interestingly, the group treated with C. H. showed significantly higher IL-10 expression than the other dressing and control groups at T15 ( $p < 0.05$ ).



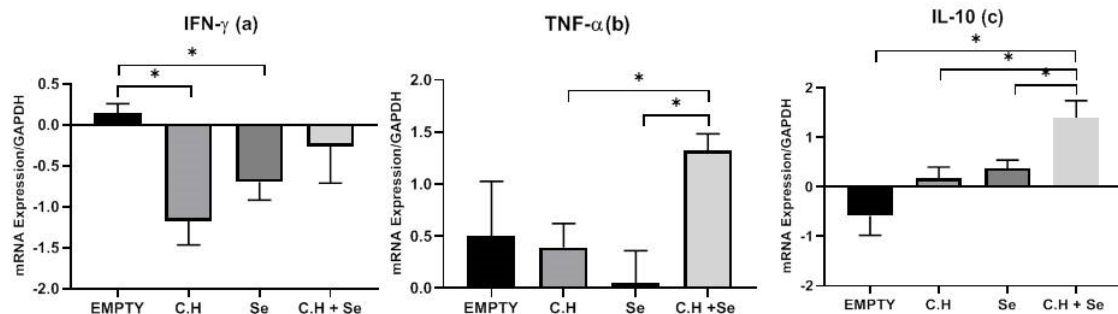
**Figure 2:** Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 mRNA after root canal treatment and the use of different dressings (empty-no medication, C. H. -calcium hydroxide, Se-selenium, and C. H. + Se - calcium hydroxide plus selenium) at T1 and T15. The mRNA levels were assessed by real-time PCR and quantified in comparison with the mRNA level of the endogenous GAPDH gene by the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method; bars represent the standard error, \*  $p < 0.05$ .

Finally, Figure 3 shows the gene expression levels of the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10, after subtracting the expression obtained at T15 from the basal expression obtained at T1. This presentation allows observing the real effects of the root canal dressing on periapical cytokine expression.

The mRNA expression of the IFN- $\gamma$  gene was reduced in the three treated groups and increased in only the empty group. A significant difference was seen between the control group and the groups treated with C. H. and Se ( $p < 0.05$ ) (Figure 3a).

In turn, the TNF- $\alpha$  gene expression level increased 15 days after cleansing and shaping procedures, either in the control group (Empty) or in the dressing groups (Figure 3b). However, it was observed that the group treated with C. H. presented significantly higher TNF- $\alpha$  expression than the groups treated with C. H. and Se ( $p < 0.05$ ).

Figure 3c shows that IL-10 gene expression was increased in the dressing group. Conversely, there was a reduction in IL-10 expression in the empty RCS (control group). However, the group treated with C. H. + Se presented significantly higher IL-10 expression than the other groups ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3:** Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 mRNA after cleaning and shaping procedures and the use of different dressings (empty, CH, Se, and CH + Se). Samples were collected at T0 and T15. The mRNA levels were assessed by real-time PCR and quantified in comparison with the level of the endogenous GAPDH gene by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and  $\log_{10}$ , the bars represent the standard error, \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION:

Despite the oral cavity harbouring a diverse, abundant and complex bacterial community, the pulp tissue is usually protected from infection by the presence of mineralized tissues - enamel, dentin and cement.<sup>1</sup> Once these barriers become compromised, an access route is created for microorganisms, and their byproducts to reach the pulp cavity.<sup>1-3</sup> RCS infection is an essential condition for the development of periapical alterations.<sup>1-3,25</sup> In this study, the gene expression level of the 16S fragment, a conserved portion of the bacterial gene, was evaluated at T0, before the cleaning and shaping procedures, and 15 days later (T15). It was found the RCS presented a high bacterial load at T0, as previously demonstrated.<sup>4,7</sup>

The biological principle for a successful endodontic treatment consists mainly of the elimination of the microbial contaminants and their byproducts from the root canal.<sup>4-5,7,10</sup> However, several studies have shown that mechanical chemical treatment does not promote the complete decontamination of the RCS.<sup>4-7</sup> Consistently, this study demonstrated a reduction in the microbial load at T15 in the

empty RCS group, but a significant microbial elimination was only achieved in the RCS group that received an endodontic dressing.

Two clinical premises attempt to address the presence of residual microorganisms after root canal cleaning and shaping procedures.<sup>26</sup> One premise recommends filling the RCS immediately after cleaning and shaping, believing that the antimicrobial activity of the obturator material and the three-dimensional obturation impedes the microbial recolonization of the RCS.<sup>26-28</sup> The second approach states that an intracanal endodontic dressing should be used to eliminate the remaining microorganisms before root canal obturation.<sup>3,10,29-31</sup> In this study, an endodontic dressing was used after cleaning and shaping procedures. It was demonstrated that only the RCS groups that received root canal dressing showed a significant reduction in 16S mRNA expression levels, as described elsewhere.<sup>31</sup>

For decades, calcium hydroxide-based endodontic dressings have been used as the first choice in the clinic.<sup>8-11,29</sup> The antimicrobial action of calcium hydroxide-based dressings is attributed to their ability to generate an intracanal physical barrier, releasing calcium ions and hydroxyl groups, which increases the pH, making the medium inhospitable for bacterial growth.<sup>9-12</sup> Several products, such as chlorhexidine,<sup>30</sup> and photodynamic therapy,<sup>32</sup> have been proposed to be capable of eliminating the residual microbiota in the RCS.<sup>30,32</sup> However, few studies have examined the effects of such intracanal medications on immune activity in periradicular tissues.<sup>10,30</sup> Recently, it was shown the effects of Se on periapical immune responses.<sup>13</sup>

In this study, the effects of Se when used as an endodontic dressing, alone or in association with calcium hydroxide, were evaluated in human subjects. The expression of cytokines and chemokine was determined in the periradicular tissues using a well-tested methodology.<sup>10,22,28,30</sup> The analyses were performed after cleaning and shaping procedures at T1 and T15. There was no significant difference in the gene expression level of the cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-6 and MCP-1 at the two evaluated times. Conversely, previous studies have shown that in an infected RCS, the levels of type 1 cytokines are increased.<sup>10,22,30</sup>

In this study, the expression levels of the IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 genes presented significant differences throughout the experimental period, depending on the intracanal medication used. The gene expression level of these cytokines was

observed at T1, as demonstrated in previous studies using a similar methodology.<sup>10,22,28,30</sup> After cleaning and shaping procedures (T15), the mRNA expression level of IFN- $\gamma$  was reduced in all treated groups and significantly reduced in groups treated with Ca(OH)<sub>2</sub> and Se. Similar results have been demonstrated for calcium hydroxide and chlorhexidine.<sup>10,30</sup> The functions of IFN- $\gamma$ , activating macrophages and driving the type 1 response,<sup>2,33-35</sup> demonstrate the importance of endodontic dressing in the reduction of proinflammatory response after cleaning and shaping procedures.

TNF- $\alpha$  mRNA expression increased after cleaning and shaping procedures in all groups at T15. A significant increase in TNF- $\alpha$  expression was observed in the group treated with C. H. + Se when compared to that of the other groups. In agreement with this finding, a similar result was found when MTA was combined with Se in the treatment of furcal perforations.<sup>13</sup> These results are supported by the fact that Se causes a change in the immunoinflammatory profile.<sup>13,36-37</sup> Macrophage cultures treated with LPS and Se secrete more TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 than untreated cultures.<sup>36-38</sup> Moreover, the findings of this study suggest that Se, in combination with Ca(OH)<sub>2</sub>, plays a role in periapical antigenic clearance since TNF- $\alpha$  mediates the host inflammatory response to infections.<sup>2-3,33</sup> Additionally, cross-regulation by type 1-inhibiting type 2 cytokines and vice versa in periapical inflammation has been proposed.<sup>39</sup> Here, the increased mRNA expression of TNF- $\alpha$  in teeth treated with Se, in combination with Ca(OH)<sub>2</sub>, occurred in parallel with an increase in the mRNA expression of the regulatory cytokine IL-10 in the same teeth (T15). This finding suggests that the high level of TNF- $\alpha$  expression could induce an increase in the mRNA expression level of IL-10, which regulates the pro-inflammatory response induced by the former cytokine in the subsequent period. Currently, the ratio of IL-10 / TNF- $\alpha$  is an important marker of the inflammatory status.<sup>40-41</sup>

Upon antigen exposure, macrophages initiate and increase the immune response by secreting many pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-1, TNF- $\alpha$ , and IL-6) and regulatory cytokines (IL-10 and TGF).<sup>42-45</sup> IL-10 is produced by monocytes, macrophages and lymphocytes and was originally identified for its ability to antagonize cellular immunity.<sup>42</sup> Among the noteworthy characteristics of IL-10 are its immunosuppressive effects, ability to suppress the activation of mononuclear cells, and its ability to prevent the production of inflammatory mediators.<sup>41-42</sup> In this study, IL-10 mRNA expression increased significantly in all treated groups compared to the



control group, demonstrating the importance of dressing in the interappointment intervals since the highly expressed IL-10 modulates the proinflammatory response, initiating tissue regeneration. Of note is the role of Se in teeth treated with the Ca(OH)<sub>2</sub>/Se combination, in which a significant increase in the expression of IL-10 mRNA was observed.

Finally, the results of this study demonstrate that the incorporation of Se, whether as intracanal medication alone or in conjunction with other medications, may bring new advances in the procedures that seek to potentiate periapical tissue repair after RCS cleaning and shaping procedures.

### **CONCLUSION:**

The results of this study show that endodontic dressing avoids microbial recolonization of the RCS and promotes the expression of factors involved in microbial clearance and periapical healing. Besides, the results also demonstrated the importance of further studies to expand the analysis of the role of Se as an adjuvant in periapical healing.

### **REFERÊNCIAS:**

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20-340-349.
2. Maciel, K.F. *et al.*, Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J.* 2012, v. 45, n.4, p.354-62.
3. Silva, T.A. *et al.*, Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral microbiology and immunology.* 2005. v.20, n.5, p.310-316.
4. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium Rotary instrumentation and various medications. *J. Endod.* 2000; 26:751-755.

5. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Roças IN, Benno Y. Molecular analysis of root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23:275-81.
6. Peters AO, Schönenberger K, Laib A. Effects of four NiTi preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Endod J.* 2001; 4:221-30.
7. Ricucci D and Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J. Endod.* 2010; 36:8, 1277-88.
8. Kim D and Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: A literature review Part I: *In vitro* studies. *Rest. Dentist. Endod.* 2014; 39: 241-252.
9. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int. Endod. J.* 2001; 34:341-5.
10. Tavares WL, *et al.*, The effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod* 2012; 38:1368-71.
11. Hermann BW. Calcium hydroxyd als Mittelzurn Behand and Fullen Von Wurzelkanalen (Thesis). Wurzlurg 1920.
12. Hungaro DMC, *et al.*, Evaluation of pH in calcium ion release of calcium hydroxide paste containing different substances. *J Endod.* 2009, 35:1274-77.
13. Espaladori MC. *et al.*, Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response. *Braz. Oral. Res.* 2018; 32:1-8.
14. Lima TRF, *et al.* Influence of chlorhexidine and zinc oxide in calcium hydroxide paste on pH changes in external root surface. *Braz Oral Res.* 2019; 33:1-7.
15. Estrela, C. *et al.* Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. *Journal of Applied Oral Science*, 2005; 13:152-156.
16. Medhi, Y; Hornick J. L; Istasse, Louis, Dufrasne, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* 2013; 18: 3292-11.
17. Zeng H., Cao J.J., Combs, G., Selenium in Bone Health: Role in Antioxidant Protection and Cell Proliferation. *Nutrients* 2013; .5: 97-110.

18. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 2001; 4: 593–99.
19. Shrimali, R.K. *et al.*, Chem. Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *J. Bio. Chem* 2008; 283 p.20181-85.
20. Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: An overview. *Nutr. Ver.* 2002; 60:40-5.
21. Arthur, J.R.; McKenzie, R.C.; Beckett G.J. Selenium in the immune system. *J. Nutr.* 2003; 133:1457-9.
22. Brito LCN, *et al.* T lymphocyte and cytokine expression in human periapical tissues. *J Endod.* 2012; 38:481-5.
23. Tran PL., *et al.*, The organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheteres in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; .56: 972-8.
24. Shmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real time PCR data by comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3:1101-8.
25. Silva MJB, Vieira LQ, Ribeiro-Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105:70-76.
26. Manfredi M, Figini L, Gagliani M, Lodi G. Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016; 1:12, 1-85.
27. Siqueira JF Jr, *et al.*, Bacterial leakage in coronally unsealed root canal obtured with 3 different techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90(5):647-50.
28. Bambirra W Jr., *et al.* Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heat shock protein, proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J. Endod* 2015; 41(7): 1085-90.

29. Weiger R., Rosendahl R., Löst C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int. Endod J.* 2000; 33: 219-26.
30. Tavares, WLF *et al.*, (2013). The Impact of Chlorhexidine-based Endodontic Treatment on Periapical Cytokine Expression in Teeth. *J. End.* 2013, 39(7), 889–892
31. Ito IY. *et al.* Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent.* 2011;21(5):353-60.
32. Eslami LM. The Comparison of Intracanal Medicaments, Diode Laser and Photodynamic Therapy on Removing the Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida Albicans* in the Root Canal System (Ex-vivo Study). *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019, 29(180), 30213-8.
33. Ribeiro-Sobrinho, *et al.*, Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral microbiol Immunol.* 2002, v.17, p.344 – 53.
34. Garlet, G.P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research.* 2010, v. 89, p.1349-63.
35. Sasaki, H. *et al.*, Gamma interferon (IFN- gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection- stimulated bone resorption in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004, v.11, p.106-10.
36. Huang Z.; Rose, A.H.; Hoffmam A.R. The role of selenium in inflammation and immunity from molecular. Mechanisms to therapeutic opportunities. *Anti. and Redox Sign.* 2012; v.16 p:1983-89.
37. Xu J., *et al.* Impact of selenium deficiency on inflammation, oxidative stress and phagocytosis in mouse macrophages. *Biological Trace Element Research.* 2019
38. Tran PL., *et al.*, Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Envirom. Microbilol* 2009; v. 75 p. 3586-3592.

39. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical disease. *Oral Microbiology Immunology*. 2009,24:25-31.
40. Batista Jr M.L. et al. Exercise training changes IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in skeletal muscle of post- MI rats. *Cytokine*, 2010, 49, 102-108.
41. Shamsi M.M. et al. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/ TNF- $\alpha$  ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. *Cytokine* 2017, 90, 100-108.
42. Sasaki H., *et al.* IL-10, but not IL-4, suppresses infection stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*. 2000; v.165, p.3626-3630.
43. Zakharova M., Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- $\alpha$ : Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 2005; v. 175, p.5024-5033.
44. Murray J.P. et al., Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014. 41(17), 14-20.
45. Minshawi F. et al., Human TNF-Luc reporter mouse: A new model to quantify inflammatory responses. *Scientific Reports* 2019, 9(103), 1-4

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo pôde-se observar que:

- 1) Quanto à expressão do fragmento ribossômico 16S:
  - esteve presente em níveis elevados antes do PMQ;
  - nos SCR que não foram preenchidos com uma medicação intracanal permaneceu elevada após 15 dias do PMQ;
  - reduziu significativamente após 15 dias do PMQ nos condutos que receberam a medicação intracanal.
- 2) Quanto a expressão gênica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 IL-17A, IL-10 e da quimiocina MCP-1:
  - as citocinas IL-1,IL-6 IL-17A e MCP-1 mantiveram níveis basais nos tempos analisados;
  - o IFN- $\gamma$  teve sua expressão aumentada na ausência de medicação;
  - o IFN- $\gamma$  teve sua expressão reduzida na presença de medicação intracanal;
  - o TNF- $\alpha$  e a IL10 tiveram suas expressões gênicas aumentadas na presença de medicação intracanal.
- 3) Quanto ao efeito da pasta de hidróxido de cálcio sobre a resposta imune-inflamatória:
  - induziu uma redução na expressão gênica de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo que não recebeu a medicação (Empty);
  - induziu o aumento da expressão gênica de IL-10 quando comparado ao grupo que não recebeu a medicação (Empty).
- 4) Quanto ao efeito do selênio sobre a resposta imune-inflamatória:
  - induziu uma redução na expressão gênica de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo que não recebeu a medicação (Empty);
  - induziu um aumento na expressão gênica de IL-10 quando comparado ao grupo que não recebeu a medicação (Empty);
- 5) Quanto ao efeito do selênio associado ao hidróxido de cálcio sobre a resposta imune-inflamatória:
  - induziu uma redução na expressão gênica de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo que não recebeu a medicação (Empty);

- induziu um aumento na expressão gênica de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo que não recebeu a medicação (Empty) e aos grupos tratados com hidróxido de cálcio e selênio, individualmente;
- induziu um aumento na expressão gênica de IL-10 quando comparado aos grupos: empty, hidróxido de cálcio e selênio, individualmente.

O sucesso do tratamento endodôntico depende de vários fatores: criterioso e correto diagnóstico, execução correta da técnica de limpeza e formatação e obturação tridimensional do SCR. Contudo, sabe-se que a eliminação da contaminação microbiana presente nos SCR infectados não se dá por completo, sendo, algumas vezes, necessário utilizar uma medicação intracanal.

Os resultados deste estudo demonstram a necessidade de se utilizar uma medicação intracanal entre as sessões de tratamento para impedir a recolonização microbiana dos SCR. Além disso, demonstram também que o uso da medicação intracanal estimula a expressão gênica de mediadores imunológicos que induzem o reparo tecidual.

Finalmente, pode-se concluir que a associação do selênio à pasta de hidróxido de cálcio potencializa a resposta imune periapical promovida pelo hidróxido de cálcio. Novos estudos deverão analisar os efeitos do Se e sua real indicação como adjuvante na terapia endodôntica.

## REFERÊNCIAS

ARTHUR, J.R.; MCKENZIE, R.C.; BECKETT G.J. Selenium in the immune system. **J. Nutr**, v.133 p.1457-1459 2003.

BHASKARAM, P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: An overview. **Nutr. Ver**, v.60, p.40-45, 2002.

BRITO LC, et al., T lymphocyte and cytokine expression in human periapical tissues. **J Endod**, v. 38, p.481-5, 2012.

BYSTRÖM A, CLAEISSON R, SUNDQVIST G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, v. 1, p.170-5, 1985.

COLIC M, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Mol Immunol**, v.47, p.101, 2009.

DALE, B.A.; KRISANAPRAKORNKIT, S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. **J Oral Pathol Med**, v.30, p.321-27, 2001.

ESLAMI LM. The Comparison of Intracanal Medicaments, Diode Laser and Photodynamic Therapy on Removing the Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida Albicans* in the Root Canal System (Ex-vivo Study). **Photodiagnosis Photodyn Ther**.v. 29,n.180, p.30213-8, 2019.

ESPALADORI MC. et al., Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response. **Braz. Oral. Res**;v.11,n. 32,p.103-11.2018.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORÁ, J.D. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. **J. App. Oral Sc.**, v.11, n.2, p.133-137, 2003.

ITO IY. *et al.* Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. **Int J Paediatr Dent**. v.21, n.5,p.353-60,2011.



HOEG A, *et al.* Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 97 p. 4061-4067. 2012.

HUANG Z.; ROSE, A.H.; HOLFFMAM A.R. The role of selenium in inflammation and immunity from molecular. Mechanisms to therapeutic opportunities. **Anti. and Redox Sign.** v.16, p:1983-89,2012.

HUNGARO D.M.C, *et al.*, Evaluation of pH in calcium íon release of calcium hydroxide paste containing different substances. **J Endod.** v. 35,p.1274-77, 2009.

JONTELL M., *et al.* Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, n.2, p.179-200. 1998.

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v.20,p.340-349, 1965.

KETTERING, J.D.; TORABINEJAD, M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. **J. Endod**, v.21, n.11, p.537-539, 1995.

KHAN A.A, SUN X, HARGREAVES K.M. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. **J Endod**, v. 34, p.1360-3, 2008

LAW A, MESSER H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. **J Endod**, v. 30, p.689 -94,2004.

LIMA T.R.F. *et al.* Influence of chlorhexidine and zinc oxide in calcium hydroxide paste on pH changes in external root surface. **Braz Oral Res.** v.33 p.1-7,2019.

PETERS A.O, SCHÖNENBERGER K, LAIB A. Effects of four NiTi preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **Endod J.**v.4,p.221-30, 2001.

MANFREDI M, *et al.* Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth (Review). **Cochrane Database Syst. Rev.** 1:12, 1-85, 2016.

MACIEL, K.F. *et al.*, Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. **Int Endod J.**v. 45, n.4, p.354-62, 2012.

MÁRTON I.J, KISS C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** v.15,n.3,p.139-50,2000.

MEDHI, Y. et al., Selenium in the Environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18 p 3292-3311, 2013.

OVERBERGH, L.; et al. The use of Real-time Reverse Transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. **J Biomol Tech**, v.14, p.33 - 41, 2003.

RIBEIRO-SOBRINHO AP. et al., Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. **Oral microbiol Immunol.** v.17, p.344 – 53,2001.

RICUCCI D and SIQUEIRA JF JR. Biofilms and apical periodontitis study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J. Endod.** V. 36, n.8, p.1277-88, 2010.

SAKAMOTO M., *et al.* Bacterial reduction and persistence after endodontic procedures. **Oral Microbiol Immunol.** v 22, p.19-23, 2007.

SAKAMOTO M., *et al.* Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. **Oral Microbiol Immunol.** v.23, p.275-81, 2008.

SHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real time PCR data by comparative C(T) method. **Nat Protoc.** v.3, p.1101-8. 2008.

SHRIMALI,R.K *et al.* Chem.Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. **J. Bio. Chem** v. 283 p.20181-85. 2008

SILVA, T.A. *et al.*, Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral micro. and immu.** v.20, n.5, p.310-316, 2005.

SIQUEIRA JF, DE UZEDA M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. **J Endod**, v. 24, p. 663-5, 1998.

SIQUEIRA JÚNIOR., J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of Antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review.Int. **Endod J**,v.32, p.361-369, 1999.

SIQUEIRA JÚNIOR. J.F. et al. Efeitos antibacterianos de um novo medicamento –o óleo lozonizado –comparados às pastas de Hidróxido de cálcio. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.57, n.4, p.252-256, 2000.

SIQUEIRA JÚNIOR., J.F.; MAGALHÃES, K.M.;RÔÇAS,I.N. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. **J. Endod**,v.33, n.6, p.667-672, Jun.,2007.

STASHENKO P, TELES R, D'SOUZA R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, p.498-521,1998.

TAVARES WLF, et al., The effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. **J Endod**. V. 38, p.1368-71, 2012.

TAVARES WLF, et al., The Impact of Chlorhexidine-based Endodontic Treatment on Periapical Cytokine Expression in Teeth. **J Endod**, v.39, p.889-892, 2013.

TRAN PL, et al. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Envirom.Microbilol**, v. 75, p. 3586-92, 2009.

TRAN PL, et al., Na organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheteres in vivo. **Antimicrob Agents Chemother** v.56 p. 972-978, 2012.

TRAN PL. et al. Organoselenium containing Dental sealant inhibits bacterial biofilms. **J. Dent. Res.**, v.96 p.461, 2013.

ZENG H. Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. **J. Nutri**, v.132, p.674-9, 2012.

ZENG, H., CAO,J.J., COMBS, G., Selenium in Bone Health: Role in Antioxidant Protection and Cell Proliferation. **Nutrients**, v.5, p. 97-110, 2013.

ZHON G X., et al. Quality of Root Filling after Obturation with Gutta-percha and 3 Different Sealers of Minimally Instrumented Root canals of the Maxillary First Molar. **J Endod**. n.7 (19), p.30329-2, 2019.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar desta pesquisa: Tratamento de lesões periapicais com selênio em comparação com hidróxido de cálcio: Análise da Resposta Imune. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano do seu fluido periapical. A utilização do seu material biológico

está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos objetivo avaliar e comparar dois, o Hidróxido de cálcio (largamente utilizado na odontologia) e o selênio (mineral utilizado como suplementação alimentar) como medicamentos. Estes medicamentos não possuem efeitos colaterais e não prejudicam o resultado do tratamento. Durante todo tratamento de canal pode ocorrer complicações inerentes ao tratamento, como:

- Falha na localização de todos os canais radiculares que comprometem a sanificação dos condutos radiculares, ou seja, a limpeza por completo da polpa dentária, o que pode ocasionar a remissão dos sinais e sintomas da inflamação pulpar. - Fraturas verticais da raiz entre as sessões do tratamento, impossibilitando a reparação completa do dente. - Recontaminação dos condutos levando remissão dos sinais e sintomas da inflamação pulpar devido a restaurações temporárias (entre uma sessão e outra) ou até mesmo definitivas mal adaptadas, deficientes ou inadequadas resultam em infiltração e recontaminação do interior do dente. - Fratura do instrumento de preparo e modelação do conduto radicular, dificultando ou impossibilitando a sanificação completa do dente. - Dificuldades decorrentes de anatomia atípica, isso é, a forma da raiz, que dificulta um tratamento ideal. Os riscos que vocês participantes da pesquisa podem ter são as mesmas complicações de qualquer pessoa que necessite de tratamento endodôntico. Durante toda a pesquisa o paciente é livre para desistir do tratamento proposto, devido ao cansaço ou constrangimento de participar do estudo, no qual o risco de interromper o tratamento é o mesmo de não iniciar o tratamento endodôntico, quando o paciente optar por não completar o tratamento proposto pelo estudo o mesmo

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

será devidamente encaminhado para a clínica de endodontia da faculdade de odontologia da UFMG para dar continuidade ou iniciar o tratamento de canal sem nenhum prejuízo ou transtorno para o mesmo.

Este estudo avaliará de que maneira as medicações agem nas lesões periapicais, através de parâmetros já pré-determinados, na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG).

Nesta esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: após a instrumentação dos canais do seu dente vamos inserir 3 cones de papel absorventes ( um cone de cada vez) no interior dos canais radiculares, que é uma etapa já realizada no seu tratamento, após 2 minutos removeremos armazenaremos em um recipiente próprio. Estes cones absorve o fluido que se encontra no final dos dentes que servirá para análise da resposta inflamatória frente as medicações. Esta coleta será feita em dois períodos distintos: logo após a limpeza de seus canais e depois de quinze dias. Todas as amostras serão levadas ao Laboratório de Imunologia e Bioquímica da UFMG para serem armazenadas até serem processadas, que ocorrerá até maio de 2019. Todos os pacientes receberão tratamento de canal completo a ser realizado na FOUFMG, situada na cidade de Belo Horizonte MG, obedecendo às normas da instituição. Os riscos que você esta sendo submetido são mínimos, mas podem acontecer como alergias aos medicamentos utilizados. Para minimizar os riscos, é de suma importância que no questionário sobre alergias você mencione as reações alérgicas que você tiver. As informações obtidas com a sua participação podem resultar no melhor conhecimento dos fenômenos inflamatórios e dos benefícios das medicações empregadas em pacientes portadores de infecção endodôntica.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum e nem receberá qualquer vantagem financeira ou algum tipo de recompensa financeira. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo

que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, nesta faculdade e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos (ou até 10 (dez) anos) na sala

3610 da Faculdade de Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Tratamento de lesões periapicais com selênio e selênio associado ao hidróxido de cálcio: Análise da Resposta Imune”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa, uma via assinada deste termo de consentimento me será concedido e o pesquisador me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos 6627 Pampulha

Faculdade de Odontologia – Departamento de Odontologia Restauradora ODR

CEP:31270-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 3409-2470

E-mail: [sobrinho.bhz@gmail.com.br](mailto:sobrinho.bhz@gmail.com.br)

**Nome completo do Pesquisador:**

Marcela Carvalho Espaladori

Endereço: Rua Alcindo Vieira 576 ap102 Barreiro- Belo Horizonte/MG

CEP: 30640-100 / Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3643-2969 e 98632-4024

E-mail: [mcespaladori@yahoo.com.br](mailto:mcespaladori@yahoo.com.br)

.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética (COEP/UFMG). Qualquer dúvida referente à questões éticas da pesquisa, poderá ser esclarecida no COEP (Tel.: 3409-4592) Av.: Presidente Antonio Carlos, 6627/ 2º andar, sala 2005).

Assinatura do paciente \_\_\_\_\_

Data \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura do investigador \_\_\_\_\_

Data \_\_/\_\_/\_\_

## Anexo 2: Aprovação do comitê de ética em pesquisa – COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** TRATAMENTO DE LESÕES PERIAPICAIS COM SELÊNIO EM COMPARAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO: ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

**Pesquisador:** Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 89043918.3.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.209.081

**Apresentação do Projeto:**

A eliminação de microorganismos do sistema de canais radiculares infectados é uma etapa crucial que envolve o completo debridamento mecânico-químico e a utilização de uma medicação Intracanal. O hidróxido de cálcio vem sendo indicado nestes casos por ser estável por longos períodos, por possuir boa biocompatibilidade, ser bactericida em uma área limitada, além de induzir a formação de tecido mineralizado e ser efetivo contra a formação de exsudatos inflamatórios. Estudos recentes ressaltam as vantagens do uso do selênio em tratamentos contra o câncer, contra infecções por vírus, como antibacteriano, induz a neoformação óssea e potencializa a resposta imunológica. O estudo objetiva avaliar a influência do selênio e a da sua associação com o hidróxido de cálcio na resposta imune periapical em humanos. Os níveis de expressão do mRNA das citocinas IFN-, TGF-, RANK, RANK-L, TNF-, IL-1, IL-17A e IL-10, assim como o da quimiocina MCP-1 serão avaliados através do real-time PCR, imediatamente após a limpeza e modelagem dos canais e após 0 e 15 dias.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Hipótese:**

Consideramos que hipótese seja alternativa (H1), ou seja: os pacientes com lesões periapicais tratados com selênio terão a resposta imune periapical diferente dos pacientes tratados com hidróxido de cálcio.

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/ 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-001

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4502

**E-mail:** coep@ccpq.ufmg.br



Continuação do Protocolo: 3.208.001

**Objetivo Primário:**

O presente trabalho tem como objetivo identificar a expressão gênica de citocinas e quimiocinas nos tecidos perirradiculares de indivíduos portadores de infecções endodônticas submetidos à terapia endodôntica de rotina, na presença de diferentes tipos de medicação intracanal.

**Objetivo Secundário:**

- Caracterizar, por PCR em tempo real, a expressão gênica das citocinas IFN-, TNF-, RANK, RANK-L, IL-1-, IL-17A, IL-10 e da quimiocina MCP-1 no tecido perirradicular de dentes infectados submetidos à terapia endodôntica.
- Avaliar o efeito da utilização do selênio sobre a expressão daqueles mediadores, quando utilizada como medicação intracanal.
- Avaliar o efeito da utilização da pasta de hidróxido de cálcio sobre a expressão gênica das citocinas e quimiocina acima descritas, quando utilizada como medicação intracanal.
- Avaliar a expressão gênica das citocinas e quimiocina acima descritas, sem o uso de medicação intracanal.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com os autores:

**Riscos:**

Durante todo tratamento de canal pode ocorrer complicações inerentes ao tratamento, como:

- Falha na localização de todos os canais radiculares que comprometem a sanificação dos condutos radiculares, ou seja, a limpeza por completo da polpa dentária, o que pode ocasionar a remissão dos sinais e sintomas da inflamação pulpar.
- Fraturas verticais da raiz entre as sessões do tratamento, impossibilitando a reparação completa do dente.
- Recontaminação dos condutos levando remissão dos sinais e sintomas da inflamação pulpar devido a restaurações temporárias (entre uma sessão e outra) ou até mesmo definitivas mal adaptadas, deficientes ou inadequadas resultam em infiltração e recontaminação do interior do dente.
- Fratura do instrumento de preparo e modelação do conduto radicular, dificultando ou impossibilitando a sanificação completa do dente.
- Dificuldades decorrentes de anatomia atípica, isso é, a forma da raiz, que dificulta um

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4502 E-mail: coep@orpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.209/001

tratamento ideal.

Os riscos que vocês participantes da pesquisa podem ter são equivalentes com as complicações de qualquer pessoa que necessite de tratamento endodôntico. Durante toda a pesquisa o paciente é livre para desistir do tratamento proposto, devido ao cansaço ou constrangimento de participar do estudo, no qual o risco de interromper o tratamento é o mesmo de não iniciar o tratamento endodôntico, quando o paciente optar por não completar o tratamento proposto pelo estudo, o mesmo será devidamente encaminhado para a clínica de endodontia da faculdade de odontologia da UFMG para dar continuidade ou iniciar o tratamento de canal sem nenhum prejuízo ou transtorno para o mesmo.

**Benefícios:**

Os benefícios após o tratamento de canal, a lesão cariosa é removida, as dores no dente desaparecem. Com o tratamento a grande possibilidade de manutenção do elemento dentário na cavidade bucal, ou seja, evita a possibilidade de extração, para evitar maiores problemas. Com o tratamento de canal, por sua vez, esse tipo de intervenção não é necessária. Muitas infecções podem surgir de um dente não tratado e com cáries, essas infecções, além de causar dor, ainda podem se espalhar e alcançar órgãos internos e causar problemas muito mais sérios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante para a área de Endodontia. Término previsto para 20/05/2019. Trata-se da tese da pós-graduanda MARCELA CARVALHO ESPALADORI sob orientação do Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho e co-orientação de Leda Quêrcia Vieira.

As solicitações do Comitê de Ética foram atendidas:

- o parecer aprovado pelo departamento foi anexado;
- o TCLE foi ajustado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os seguintes documentos:

- Informações Básicas do Projeto;
- Carta-resposta às diligências;
- Parecer aprovado pelo departamento;
- Parecer da câmara departamental convalidando o parecer da Pós-graduação da Faculdade de odontologia/UFMG;
- Parecer de uma professora do departamento aprovando o projeto de pesquisa (datado de maio de 2016) e um parecer final desta mesma professora aprovando o projeto de pesquisa relatando

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@orpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.209.091

Parecer Anterior	PARECER.jpeg	14:59:46	Ribeiro Sobrinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado.pdf	24/10/2018 19:13:08	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Parecer Anterior	parecer.pdf	24/10/2018 15:06:56	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	02/03/2018 14:28:55	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 19 de Março de 2019

---

Assinado por:  
Eliane Cristina de Freitas Rocha  
(Coordenador(a))

***ATIVIDADES DESENVOLVIDAS***

***2015-2019***

**ATIVIDADES DESENVOLVIDAS:****PREMIAÇÕES:**

**2016** - Menção Honrosa 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna, Universidade de Itaúna.

**2015** - Menção Honrosa na modalidade PAINEL ASPIRANTE E EFETIVO na área 2, Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, SBPqO.

**APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS:**

1. **ESPALADORI, M. C;** MACIEL, K. F. ; SANTA-ROSA, C. C. ; MAIA, L. M. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Perfuração experimental de furca em animais germ free tratadas com MTA acrescido de selênio: análise da resposta imune. SBPqO In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas.

2. **ESPALADORI, M. C;** MACIEL, K. F. ; SANTA-ROSA, C. C. ; PARPINELLI, B. C. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Resposta imune às infecções endodônticas experimentais em três modelos murinos: selvagens, IL-17KO e com artrite induzida por antígeno. Semana do Conhecimento UFMG 2016 - XXV Semana de Iniciação Científica, 2016, Belo Horizonte

3. **ESPALADORI, M. C;** MACIEL, K. F. ; QUEIROZ JUNIOR, C. M. ; PARPINELLI, B. C. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Resposta imune às infecções endodônticas experimentais em três modelos murinos: selvagens, IL-17KO e com artrite induzida por antígeno. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2016, Campinas

4 . **ESPALADORI, M. C;** MACIEL, K. F. ; BRAGA, J. M. ; BAMBIRRA, B. H. S. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Perfuração experimental de furca em animais germ free tratadas com MTA acrescido de selênio: análise da resposta imune. In: 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna. 2016, Itaúna

## RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO:

1 **ESPALADORI, M. C**; MACIEL, K. F. ; SANTA-ROSA, C. C. ; MAIA, L. M. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Perfuração experimental de furca em animais germ free tratadas com MTA acrescido de selênio: análise da resposta imune SBPqO In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2016, Campinas. Brazilian Oral Research. São Paulo: Cabo verde Tecnologia e Serviços Ltda, 2015. v. 29. p. 580-580

2. **ESPALADORI, M. C**; MACIEL, K. F. ; QUEIROZ JUNIOR, C. M. ; PARPINELLI, B. C. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Resposta imune às infecções endodônticas experimentais em três modelos murinos: selvagens, IL-17KO e com artrite induzida por antígeno. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2016, Campinas. Brazilian Oral Research. São Paulo: Cabo verde Tecnologia e Serviços Ltda, 2016. v. 30. p. 532-532.

3 **ESPALADORI, M. C**; MACIEL, K. F. ; SANTA-ROSA, C. C. ; PARPINELLI, B. C. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . . Resposta imune às infecções endodônticas experimentais em três modelos murinos: selvagens, IL-17KO e com artrite induzida por antígeno. In: XIII Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2016, Belo Horizonte. XIII Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2016.

4. MIRANDA, G. F. P. C. ; **ESPALADORI, M. C** ; MACIEL, K. F. ; MAIA, L. M. ; SANTA-ROSA, C. C. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. Resposta imune às infecções endodônticas experimentais em três modelos murinos: selvagens, IL-17KO e com artrite induzida por antígeno. In: 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna, 2016, Itaúna. 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna, 2016.

5. **ESPALADORI, M. C**; MACIEL, K. F. ; SANTA-ROSA, C. C. ; MAIA, L. M. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Perfuração experimental de furca em animais germ free tratadas com MTA acrescido de selênio: análise da resposta imune. In: 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna. In: 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna, 2016, Itaúna. 39ª Jornada Odontológica da Universidade de Itaúna, 2016.

6. PARPINELLI, B. C. ; SANTA-ROSA, C. C. ; MACIEL, K. F. ; **ESPALADORI, M. C** ; BRAGA, J. M. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Modelo de avaliação das respostas imnológicas nas alterações pulpoperiapicais.. In: Semana do Conhecimento UFMG 2016 XXV Semana de Iniciação Científica, 2016, Belo Horizonte. Anais Semana do Conhecimento UFMG 2016 - XXV Semana de Iniciação Científica, 2016.

7. BRANCO, N. T. T. ; **ESPALADORI, M. C** ; SANTA-ROSA, C. C. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Perfurações experimentais de furca em animais germ free tratadas com mta acrescido de selênio: análise da resposta imune. In: XIII Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2016, Belo Horizonte. Anais Semana do Conhecimento UFMG 2016 - XXV Semana de Iniciação Científica, 2016.

8. **ESPALADORI, M. C**; MACIEL, K. F. ; BAMBIRRA, B. H. S. ; BRAGA, J. M. ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . Perfurações experimentais de furca em animais germ free tratadas com MTA acrescido de Selenio: Análise da Resposta imune. In: 32 reunião anual da SBPqO, 2015, Campinas/SP. Brazilian Oral Research 2015, 2015.

8. BAMBIRRA, B. H. S. ; BRAGA, J. M. ; MACIEL, K. F. ; **ESPALADORI, M. C** ; BRITO, L. C. N. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. . . Efeito da associação MTA/Selênio sobre viabilidade celular, aderência e atividade fagocitária de macrófagos M1 e M2.. In: 32 reunião anual da SBPqO, 2015, Campinas/SP. Brazilian Oral Research 2015, 2015.

#### **PARTICIPAÇÃO EM BANCAS:**

**ESPALADORI, M. C**; CARDOSO, F. P.; BAMBIRRA, B. H. S.. Participação em banca de Elijayck Alves Silva e Marielle Martins Alves. Uso de Tomografia Computadorizada Cone Beam como Auxiliar no Diagnóstico Endodôntico. 2015. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Endodontia) - Instituto de Estudos da Saúde

**ESPALADORI, M. C.** FERREIRA, F. R. C.; Participação em banca de Felix Roberto Carvalho Ferreira.O emprego de MTA em endodontia: Revisão Bibliografica. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade

Federal de Minas Gerais.

## **COLABORAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISAS:**

### **2017-2019**

Avaliação do padrão de resposta imunológica periapical frente às infecções de origem endodôntica em pacientes portadores de diabetes mellitus Integrantes : Gabriel Ferreira Pessoa Carvalho Miranda, **Marcela Carvalho Espaladori**, Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Leda Quercia Vieira.

### **2017-2018**

Efeitos anti-inflamatórios do *Lactococcus Lactis* NCDO2118 produtor de Hsp65 na mucosite experimental murina. Integrantes: Patrícia Aparecida Vieira Barros, **Marcela Carvalho Espaladori**, Ana Maria Caetano de Faria- coordenadora.

### **2014-2018**

Efeitos regulatórios genéticos modificados pela ativação imune ambiental contribuem para associações de doenças periapicais. Integrantes: Nely Cristina Medeiros Caires **Marcela Carvalho Espaladori**, Leda Quercia Vieira Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho.

### **2014 - 2018**

Análise da expressão de citocinas em dentes submentidos à Regeneração Endodôntica Igor Vieira Bracks , **Marcela Carvalho Espaladori**, Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

### **2014-2018**

Avaliação da expressão de marcadores angiogênicos em lesões endodônticas periapicais. Caroline Christine Santa Rosa ,Julia Mourão Braga , **Marcela Carvalho Espaladori** ,Leda Quércia Vieira, Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

### **2013-2017**

Perfil imunológico de infecções endodônticas periapicais de pacientes passando por transplante de células estaminais hematopoiéticas e de fígado. Julia Mourão Braga, **Marcela Carvalho Espaladori**, Leda Quércia Vieira, Antônio Paulino Ribeiro



Sobrinho

### **ARTIGOS PUBLICADOS:**

1 Vieira PGM, Rugani KS; Oliveira MA; **Espaladori MC**; Cota LOM, Castro Vieira EA  
Intradermoterapia- Harmonização facial e dental.. TOXUpdate v.3 p.30-46, 2017

2 Vieira PGM, Neves ACPR, Arcanjo LS, **Espaladori MC**. Remoção da bola de Bichat. Lipoplastia facial: Remoção do corpúsculo de Bichat., Castro Vieira EA. TOXUpdate v.3 p.19-29, 2017

3 **M.C. Espaladori**, K.F. Maciel, L.C.N Brito, L.Q. Vieira,A.P.Ribeiro Sobrinho. Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response. Brazilian Oral Research. 2018 Oct 11; 32:e103.

4 J.M Braga Diniz, **M. C. Espaladori**, M. E. Souza e Silva, L.C.N Brito, L.Q. Vieira e A.P. Ribeiro Sobrinho Immunological profile of teeth with inflammatory periapical disease from chronic liver disease patients International Endodontic Journal . 2019 Feb;52(2):149-157.

5 Bracks IV, **Espaladori MC**; Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP . Effect of EDTA irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy.. International Endodontic Journal . 2019

### **ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO:**

1 Caires NCM, **Espaladori MC**, Brito LCN, Tavares WL, Vieira LQ, Sobrinho APR. Genetic regulatory effects modified by environmental immune activation contribute to periapical disease associations. Brazilian Oral Research. 2019.

2 Couto AM, **Espladori MC**, Leite APP, Martins CC, Aguiar MCF. A systematic review on pulp revascularization using a triple antibiotic paste. Pediatric Dentistry. 2019.