

MARCELA CARVALHO ESPALADORI

**PERFURAÇÕES EXPERIMENTAIS DE FURCA TRATADAS COM MTA
ACRESCIDO DE SELÊNIO: *ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2015**

Marcela Carvalho Espaladori

**PERFURAÇÕES EXPERIMENTAIS DE FURCA TRATADAS COM MTA
ACRESCIDO DE SELÊNIO: *ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE***

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

Orientador: Prof^o. Dr. Antônio Paulino R. Sobrinho
Coorientadora: Prof^a Dra. Leda Quercia Vieira

Belo Horizonte
2015

Ficha Catalográfica

E77p Espaladori, Marcela Carvalho.
2015 Perfurações experimentais de furca tratadas com MTA
T acrescido de selênio : análise da resposta imune / Marcela
Carvalho Espaladori. -- 2015.

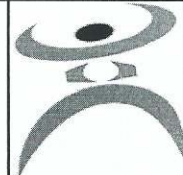
29 p. f. : il.

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

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Selênio. 2. Periodontia. 3. Citocinas. I. Ribeiro
Sobrinho, Antônio Paulino . II. Vieira, Leda Quércia . III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



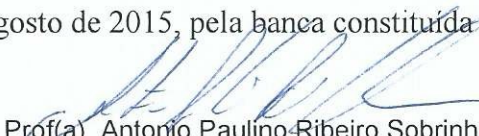
FOLHA DE APROVAÇÃO

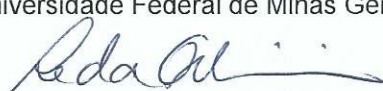
Perfurações experimentais de furca tratadas com MTA acrescido de Selênio : Análise da Resposta Imune

MARCELA CARVALHO ESPALADORI

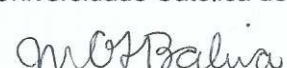
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 31 de agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Antonio Paulino-Ribeiro Sobrinho - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Leda Quercia Vieira
Universidade federal de minas gerais


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


Prof(a). Maria Guiomar de Azevedo Bahia
Universidade federal de minas gerais

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2015.

Dedico este trabalho ao meu esposo, Ferrnando, pelo amor e apoio incondicional. Otávio, que veio no meio de tudo para transformar o sabor da conquista, filho a mamãe te ama. Aos meus familiares; mãe, avô, irmãos, sogro, cunhadas e cunhados.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos.

Em especial, ao orientador Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pelos ensinamentos, dedicação, compreensão e paciência.

Aos amigos, Bernardo Henrique Bampirra e Kamila Maciel cuja amizade e companheirismo foram essenciais para a chegada desse momento.

À Luciana Carla Neves Brito, cujo auxílio foi fundamental.

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

RESUMO

A perfuração de furca é uma comunicação mecânica ou patológica entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente, permitindo contaminação bacteriana do tecido periodontal e consequente inflamação e perda do tecido de suporte. Atualmente, o MTA (Agregado de trióxido mineral) é o material mais indicado no tratamento dessas perfurações, por ser biocompatível e apresentar bom selamento. A literatura atual relata a capacidade do selênio em inibir crescimento bacteriano, alterar o metabolismo ósseo e estimular o sistema imunitário. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica do MTA acrescido de selênio. Neste estudo, induziram-se perfurações experimentais de furca em molares de camundongos isentos de germes. O primeiro molar superior esquerdo teve a furca perfurada e tratada com MTA + Selênio (grupo experimental) e no lado direito a furca foi perfurada e tratada com MTA (grupo controle). Os animais foram sacrificados com 07, 14 e 21 dias após a intervenção sendo 5 animais para cada grupo, (n=5). Os tecidos perirradiculares adjacentes à lesão foram extraídos e macerados, fazendo-se, a seguir, a extração do RNA. As expressões das citocinas TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4, RANK, RANKL, IL-1 α , IL-17A e HPRT foram investigados por PCR em tempo real. No grupo experimental, após o 21 dias, houve um aumento da expressão de TNF- α e IL-10 em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). A avaliação revelou expressão basal de IL-1 α , IFN- γ , RANK, RANKL, IL-17A, IL-4 e TGF- β nos níveis de mRNA, em ambos os grupos experimental e controle, em todos os tempos experimentais ($p > 0,05$). O selamento com MTA + Se favoreceu a expressão da citocinas pró-inflamatórias TNF- α na fase tardia de resposta (21^o dia) paralelo ao aumento da citocina regulatória IL-10 no mesmo período. Concluiu-se que, o aumento destas citocinas no grupo tratado com selênio na fase tardia da resposta, provavelmente, se deveu aos seus efeitos imunoregulatórios.

Palavras-chave: Selênio. MTA. Perfuração de Furca. Citocinas

ABSTRACT

Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response

Furcal perforation is a mechanical or pathological communication between the root canal system and outer surface of the tooth. It may allow bacterial contamination and subsequent periodontal tissue inflammation and loss of supportive tissue. Currently, the MTA (mineral trioxide aggregate) is the most suitable material in the treatment of these perforations to be biocompatible and provide good sealing. The literature reports the selenium's ability to inhibit bacterial growth, alter bone metabolism and stimulate the immune system. The objective of this study was to evaluate the immune response of MTA associated with selenium. In this study, experimental furcal perforations were induced in molar of germ-free mice. The first maxillary left molar had the furcal perforated and treated with MTA / Selenium (experimental group) and the right molar, furcal was perforated and treated with MTA (control group). The animals were killed in 07, 14 and 21 days after the intervention (n = 5). mRNA was extracted from periradicular tissues and the expressions of TGF- β , TNF- α , IFN γ , IL-10, IL-4, RANK, RANKL, IL-1 α , IL-17A e HPRT were investigated by *real time* PCR. In the experimental groups, on 21 days post MTA+Se sealing it was observed an up-regulation of the mRNA levels of TNF- α and IL-10 compared with the control group (p<0.05). Assessment revealed basal expression of IL-1 α , IFN- γ , RANK, RANKL, IL-17A, IL-4 and TGF- β gene expression all long of the experimental times, in both groups treated with MTA or MTA+Se (p>0.05). The MTA+Se sealing favored the expression of TNF- α and IL-10 in the later phase of response (21th day). The increase of these cytokines was probably due to immunoregulation of Se levels.

Keywords: Selenium. MTA. Furcal Perforation. Cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC Células Apresentadoras de Antígenos

IFN- γ Interferon Gama

Ig Imunoglobulina

IL Interleucina

IRM Material Restaurador Intermediário

NK *Natural Killer*

MTA Agregado de Trióxido Mineral

PCR Reação em Polimerase de Cadeia

RANK Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

RANKL Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

Se Selênio

TGF Fator de Crescimento e Transformação

Th Linfócito T *helper*

TNF Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 10 |
| 2 OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Objetivo Geral | 14 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 14 |
| 3 METODOLOGIA EXPANDIDA | 15 |
| 3.1 Etapa clinica | 15 |
| 3.1.1 Animais | 15 |
| 3.1.2 Anestesia | 15 |
| 3.1.3 Perfuração e selamento da furca | 15 |
| 3.2 Análise imunológica | 16 |
| 3.2.1 Extração e preparo das amostras | 16 |
| 3.2.2 Extração do RNA | 16 |
| 3.2.3 Quantificação do mRNA | 16 |
| 3.2.4 Preparo do cDNA por transcriptase reversa | 17 |
| 3.2.5 Detecção e quantificação das citocinas | 17 |
| 4 ARTIGO CIENTIFICO | 19 |
| REFERÊNCIAS | 27 |
| ANEXOS | 30 |

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O tecido pulpar é constituído por um tecido conjuntivo frouxo, circundado por paredes rígidas de dentina. É composto pela matriz extracelular, que é formada pela substância fundamental amorfa e fibras colágenas, por arteríolas e vênulas, que compõem a microcirculação pulpar; por fibras nervosas, responsáveis pela inervação sensorial e vasomotora do tecido pulpar; e por várias células, principalmente fibroblastos, odontoblastos, células indiferenciadas, linfócitos, macrófagos e células dendríticas (JONTELL, *et al.* 1998).

Quando ocorre alguma agressão sobre esse tecido, seja ela de origem bacteriana, química ou física, há o desencadeamento de uma resposta imunológica, que tem como objetivo principal eliminar a agressão (JONTELL, *et al.*, 1998). Essa resposta imune é didaticamente dividida em resposta imune inata e resposta imune adquirida.

A resposta imune inata representa a primeira linha de defesa, reconhecendo substâncias ou elementos que não são próprios do organismo. Não é específica e os neutrófilos, células *natural killer* (NK) e macrófagos são seus principais componentes celulares. Essas células têm a capacidade de eliminar os antígenos bacterianos, além de liberarem mediadores inflamatórios, que são responsáveis por recrutarem mais células de defesa para o local da inflamação (HAHN *et al.*, 2007).

A resposta imune adaptativa é ativada quando a resposta imune inata não é capaz de remover a agressão por si só. É especializada, específica e possui memória. É composta por linfócitos T e B e seus produtos, isto é, quimiocinas inflamatórias, citocinas e anticorpos (HAHN & LIEWER, 2007A). Diferentes citocinas estimulam diversas respostas das células envolvidas na imunidade e na inflamação (ABBAS, *et al.* 2007). Sabe-se que a resposta imune adaptativa pode ser dividida em dois grupos dependendo dos componentes e da via de eliminação dos microrganismos. A resposta humoral é caracterizada pela presença de imunoglobulinas, sintetizadas por plasmócitos, com o objetivo de eliminar os antígenos. As citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 estão envolvidas na ativação desta resposta (FUKADA *et al.*, 2009). A resposta celular é mediada por linfócitos T e é caracterizada pela produção das citocinas IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α (FUKADA *et al.*, 2009).

Uma vez estabelecida uma agressão no sistema de canais radiculares, o sistema imune (resposta inata e adaptativa) entra em ação com objetivo de remover e eliminar essa agressão. Porém, à medida que a infecção avança, há também destruição tecidual (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Para combater a infecção, o tratamento endodôntico deve ser realizado. Este, além de promover o saneamento do sistema de canais radiculares, a partir da eliminação do maior número de microrganismos presentes, promove o reparo tecidual (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

As perfurações radiculares são acidentes que podem ocorrer durante o tratamento endodôntico. Ela é caracterizada como uma comunicação mecânica ou patológica entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente. Pode ser consequência de reabsorções, cáries (HAMAD *et al.*, 2006), ocorrer durante o retratamento endodôntico ou preparo protético (HOLLAND *et al.*, 2007). Este acidente provoca a contaminação bacteriana do tecido periodontal, levando à inflamação e à perda do tecido de suporte, comprometendo o prognóstico do dente (HAMAD *et al.*, 2006). Observa-se a invasão bacteriana, seguida pela inflamação no tecido periodontal subjacente, reabsorção óssea, destruição do ligamento periodontal, proliferação epitelial e bolsa periodontal (HAMAD *et al.*, 2006).

Após uma perfuração, o ideal é que se utilize um material biocompatível que tenha a capacidade de selar a cavidade, prevenindo assim a invasão bacteriana e o desenvolvimento da inflamação. Ao longo dos anos, vários materiais foram utilizados, como o amálgama, IRM, hidróxido de cálcio, ionômero de vidro, cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado (Super-EBA). Porém, em 1993 foi descrito na literatura o Agregado Trióxido Mineral (MTA) (Lee *et al.*, 1993). Suas principais características são a biocompatibilidade, a estimulação de mineralização óssea e dental, a regeneração do ligamento periodontal e produção de adequado selamento (DE DEUS *et al.*, 2007, YASUDA *et al.*, 2008).

Recentemente foi desenvolvido o MTA Bios (Ângelus, Londrina, PR, Brasil), que é completamente sintetizado em laboratório, apresentando elevado controle de qualidade e livre de contaminação, especialmente de arsênio (DE DEUS *et al.*, 2007). Esse produto apresenta teor de óxido de cálcio e óxido de alumínio livre superior ao MTA Ângelus, previamente disponibilizado.

Rezende *et al.* em 2007 descreveram que o MTA não afeta a fagocitose e nem a habilidade dos dois subtipos de macrófagos M1 e M2, em eliminar

microrganismos. Os mesmos autores acima citados, avaliaram a influência do MTA na resposta imune adaptativa e concluíram que o MTA aumentou a resposta imunológica adaptativa humoral e pouco afetou a produção das citocinas pró- e anti-inflamatórias produzidas pelas células T_m (células T de memória) (REZENDE *et al.*, 2008).

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

O selênio pertence ao grupo dos metalóides, que são compostos metais e não metais, ou seja, possuem características de ambos. É encontrado naturalmente em humanos, animais e plantas (TRAN *et al.*, 2009). As selenoproteínas apresentam um importante papel em muitas funções corporais, tais como na defesa antioxidante e na formação de hormônios da tiróide (MEDHI *et al.*, 2013).

Em estudos prévios tem sido demonstrado que o selênio orgânico serviu como um gerador catalítico de radicais superóxido a partir da oxidação de tióis (SEKO & IMURA 1997). A formação de radical superóxido parece ser o responsável pela maior parte da toxicidade do selênio em diferentes bactérias, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e de *Escherichia coli in vitro* (BABIOR *et al.*, 1975.; BORTOLUSSI *et al.*, 1987, KRAMER e AMES, 1988). Estudos mostram que Se covalentemente ligado a diferentes biomateriais e dispositivos médicos, tais como cateteres intravenosos e lentes de contato, por osmose inversa bloqueou a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MATHEWS *et al.*, 2006; TRAN *et al.* 2009, 2012). Baixas concentrações de organo-selênio (0,1% ou 0,2%) são suficientes para inibir a adesão bacteriana nesses materiais, de acordo com Tran *et al.*, 2013.

Alguns estudos revelaram que a proliferação de células imunes são aparentemente sensíveis a privação de Se, por exemplo, quando o derivado T imunitário e células B foram cultivadas num meio isento de soro e deficientes em Se, atividades de GPX e TRR foram baixas e as células não sobreviveram (ZENG *et al.*, 2002 e SAITO *et al.*, 2003). Linfócitos em meio deficiente em selênio possuem menor capacidade de proliferarem em resposta a um agressor, mas a resposta pode ser melhorada suplementando-o com Se (ZENG *et al.* 2013). A ausência de

selenioproteínas levou a uma diminuição na activação de células T maduras (SHRIMALI *et al.*, 2008).

O nível adequado de Se é importante para iniciar a imunidade, mas também está envolvido na regulação da resposta imunitária excessiva e na inflamação crônica (HUANG *et al.*, 2012) e o desequilíbrio deste nível afeta tanto a imunidade inata quanto a adquirida (BHASKARAM 2002).

A deficiência de Se tem sido relatada impactar negativamente células do sistema imunológico durante sua ativação, diferenciação e proliferação. Evidências estão surgindo elucidando o papel das selenoproteínas na regulação inflamação e da imunidade e isso têm proporcionado importantes conhecimentos sobre os mecanismos pelos quais Se influencia nestes processos (HUANG *et al.*, 2012).

Para avaliar o perfil da resposta imune que se processa nas perfurações de furca, este estudo procurou determinar a expressão de citocinas nos tecidos periodontais adjacentes a essas lesões em camundongos isentos de germes, induzidas experimentalmente e tratadas com o MTA Bios acrescido de selênio, em três períodos consecutivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a resposta imune do tecido periodontal adjacente a lesões de furca experimentais, tratadas com MTA e MTA com adição de selênio, em camundongos isentos de germes.

2.2 Objetivo específico

Avaliar a expressão das citocinas : TNF- α , TGF- β , RANKL, IL-4, IL-10 e IFN- γ em resposta ao tratamento de MTA/Selênio.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Etapa clínica

3.1.1 Animais

Foram utilizados 15 camundongos entre 4 e 8 semanas de vida de ambos os sexos (BALB/c - ICB Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Os camundongos foram mantidos em gaiolas convencionais e com ciclo de luz controlado e alimentados com dieta comercial (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) *ad libitum*. O protocolo experimental foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) protocolo #67/2014.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais definidos como: grupo 1, animais sacrificados com 07 dias após a realização do experimento; grupo 2, animais sacrificados com 14 dias após a realização do experimento; e grupo 3, animais sacrificados com 21 dias após a realização do experimento. Cada grupo foi composto por 5 animais. Em todos os grupos, o primeiro molar do lado direito foi utilizado como dente controle, enquanto o primeiro molar do lado esquerdo como experimental.

3.1.2 Anestesia

Antes de qualquer procedimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente utilizando-se 100mg/kg de Hidroclorido de Ketamina (Dopalen, Division Vetbrands Animal Health, Jacareí, SP, Brasil) e 10mg/kg de Xilazina (Anasedan, Agribands do Brasil LTDA, Paulínia, SP, Brasil) administrados com seringas tipo PPD (SILVA *et al.*, 2008).

3.1.3 Perfuração e selamento da furca

A coroa clínica do primeiro molar superior foi trepanada utilizando-se uma broca esférica 1/4 de baixa rotação com controle de rotação (Driller, São Paulo, Brasil). O acesso do canal radicular foi estabelecido com auxílio de uma lima endodôntica de níquel titânio com ponta biselada seguida de pulpotomia e a cavidade secada com cones de papel estéreis. Após esse momento, a furca sfoi perfurada, utilizando-se broca esférica de pequeno diâmetro.

No primeiro molar do lado direito o MTA Bios (Ângelus, Londrina, PR, Brasil) foi manipulado e inserido como selante sobre a perfuração em condições assépticas e de acordo com as especificações do fabricante: coloca-se MTA em quantidade de uma pá dosadora e uma gota de água destilada sobre a placa de vidro; espatula-se por 30 segundos, até a completa mistura do pó com a água; leva-se o MTA à perfuração da furca; condensa-se o MTA com uma bolinha de algodão seguido do selamento da cavidade coronária com Coltosol®.

No grupo experimental, primeiros molares esquerdos, o MTA foi manipulado com uma solução de 1µM de Sn em água destilada estéril em seguida manipula-se de acordo com as especificações do fabricante, a cavidade coronária selada com Coltosol®.

Quinze camundongos, cinco de cada grupo foram sacrificados para dosagem das citocinas dos tecidos adjacentes.

3.2 Análise Imunológica

3.2.1 Extração e preparo das amostras

Após o sacrifício dos animais, as peças cirúrgicas contendo o tecido adjacente aos molares onde se procedeu a aplicação do MTA foram removidas e colocadas em 500µl de Trizol, e em seguida foram trituradas.

3.2.2 Extração do RNA

Aos sobrenadantes foram acrescentados 200µl de clorofórmio. Foram então levados ao vórtex e deixados em descanso por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois de centrifugados a 12.000 g, por 10 minutos a 4° C, foram transferidos para novos *ependorfs* o sobrenadante (parte aquosa) de cada tubo e em seguida acréscimo de 800µl de etanol a 95% a cada tubo e estes foram novamente centrifugados a 12.000g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e sobre o pellet acrescentou-se 1000 µl de etanol 75%, sendo em seguida levados ao vórtex. Novamente as amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 10 minutos a 4°C, ressuspendidas em 20 µl de água DEPC de alta qualidade e armazenadas em freezer a -70°C.

3.2.3 Quantificação do mRNA

O mRNA foi diluído em água destilada nas proporções de 1:100 e 1:500, para que as amostras possam ser lidas em espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de quartzo, com comprimento de onda de 260/280OD.

A quantificação foi obtida utilizando-se a formula: [mRNA- mg/ml]=OD260 x diluição x 40.

3.2.4 Preparo de cDNA por Transcrição Reversa

Preparo das soluções com os seguintes reagentes:

1. DNTPs (mistura a 2,5 mM).....1,25 µL
2. Reverse Transcriptase Buffer.....2,50 µL
3. 0,1 M Dithiothreitol (DTT).....1,00 µL
4. Rnasin (inibidor de Rnase).....0,25 µL
5. Oligo dT₁₅ 1/10 - 7.5 ρMoles.....1,00 µL

Nas amostras de RNA foram acrescentadas de 6 µL da solução acima descrita, aquecidas a 70°C por 5 minutos e subsequentemente resfriadas em gelo, por 5 minutos. Acrescidas de 1,5 µL de Transcriptase Reversa (12,5 U/reação – 25 U/reação), e deixadas, em temperatura ambiente, por 5 minutos. As amostras foram incubadas a 37°C durante uma hora, aquecidas a 90°C por 5 minutos e resfriadas em gelo por 5 minutos. A reação final foi diluída, adicionando-se 87,5 µL de água destilada, sendo a seguir estocadas a – 20°C.

3.2.5 Detecção e quantificação das citocinas

A quantificação das citocinas TNF-α, TGF- β, RANKL, IL-4, IL-10 e IFN-γ, foi realizada pelo PCR em tempo real e o gene HPRT utilizado como gene normalizador.

As reações de PCR em tempo real 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 diluído 1:2, os iniciadores específicos para cada determinação (0.2 µM para HPRT e 1 µM para os iniciadores das citocinas), o master mix e água para o volume final de 20 µL. Em seguida as placas foram colocadas no termociclador e as reações

de amplificação realizadas de acordo com o seguinte protocolo: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C por 1 min; seguida da curva de dissociação com incubação a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min e aquecimento até 95°C com análise simultânea.

Tabela 1. Seqüência dos iniciadores das citocinas

| <i>Iniciador</i> | <i>Seqüência (5'-3')</i> | <i>BP</i> |
|-------------------------|---|------------------|
| HPRT | FW: GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT RV: GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC | 162 |
| TNF- α | FW: ATCTTCTCAAATTCGAGTGACCA RV: TGGAGTAGACAAGGTACAACCC | 171 |
| TGF- β | FW: TGACGTCACTGGAGTTGTACG RV: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC | 169 |
| RANKL | FW: CATCCCATCGGGTTCCATAA RV: CCCTTAGTTTTCCGTTGCTTAACGAC | 103 |
| IL-4 | FW: ACAGGAGAAGGGACGCCAT RV: GAAGCCCTACAGACGAGCTCA | 94 |
| IL-10 | FW: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA RV: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT | 190 |
| IFN- γ | FW: CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA RV: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG | 90 |

FW (*forward primer*), RV (*reverse primer*), BP (Pares de Base))

Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response

Marcela Carvalho ESPALADORI^(a)
Kamilla Faria MACIEL^(a)
Luciana Carla Neves de BRITO^(b)
Toshihisa KAWAI^(c)
Leda Quércia VIEIRA^(d)
Antônio Paulino RIBEIRO SOBRINHO^(a)

^(a)Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, School of Dentistry, Department of Operative Dentistry, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^(b)Universidade de Itaúna, School of Dentistry, Itaúna, MG, Brazil.

^(c)The Forsyth Institute, Department of Immunology, Boston, MA, USA.

^(d)Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Institute of Biological Sciences, Department of Biochemistry and Immunology, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Abstract: The aim of this study is to evaluate the expression of cytokines in response to mineral trioxide aggregate (MTA) plus selenium in germ-free mice with experimental furcal perforation. The first left maxillary molar was opened, and the furcal area was perforated and treated with post-MTA-Se (experimental group). The same surgical intervention was performed for the maxillary right first molar, which was treated with MTA (control group). Fifteen mice were sacrificed 7, 14, and 21 days after furcal perforation, and periapical tissue samples were collected. The mRNA expression levels of the cytokines TGF- β , TNF- α , IFN- γ , HPRT, IL-10, IL-4, RANK, RANKL, IL-1, and IL-17 were assessed by using real-time polymerase chain reaction. In the experimental group, at 21-days post-MTA-Se sealing, the mRNA levels of TNF- α and IL-10 were upregulated compared with those in the control group ($p < 0.05$). Further assessment revealed basal mRNA expression levels of IL-1 α , IFN- γ , RANK, RANKL, IL-17A, IL-4, and TGF- β , over long experimental times, in both the experimental and control groups ($p > 0.05$). In conclusion, MTA+Se sealing favoured increased expression of IL-10 and TNF- α at later time points (day 21).

Keywords: Selenium; Cytokines; Immunophenotyping; Models, Animal.

Declaration of Interest: The authors certify that they have no commercial or associative interest that represents a conflict of interest in connection with the manuscript.

Corresponding Author:
Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
E-mail: sobrinho.bhz@gmail.com

<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0103>

Submitted: June 26, 2017
Accepted for publication: August 01, 2018
Last revision: August 23, 2018

Introduction

Furcal perforation is mechanically driven or pathologically induced communication between root canals and supportive dental tissues.¹ Perforations usually result from resorption or, caries or may be produced iatrogenically.^{1,2} Such perforations are the second most common cause of failed endodontic treatments, with serious clinical consequences.¹ Treatment consists of using a biocompatible material to seal the cavity and aims to prevent bacterial invasion, inflammation dissemination, and periradicular bone destruction.¹

Periradicular bone destruction around the perforation depends on the balance between proinflammatory (type 1) and anti-inflammatory (type 2) cytokines.^{3,4,5} Proinflammatory cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , and RANKL, play a key role in lesion progression. IFN- γ and TNF- α act on bone resorption by inducing the release of RANKL, which helps to differentiate and activates osteoclasts.^{4,6} Conversely,



the production of cytokines such as IL-4, IL-10, and IL-13 by lymphocytes inhibits bone resorption and initiates tissue repair.⁷

Mineral trioxide aggregate (MTA) is the main material used to seal root canal perforations given its biocompatibility, insolubility, and sealing ability, among other properties.^{2,8} It has been demonstrated that MTA affects neither phagocytosis nor the ability of macrophages (M1 and M2) to eliminate microorganisms.⁹ Additionally, an evaluation of its effect on the adaptive immune response revealed that it did not interfere with the expression of IL-10, TNF- α , or RANKL by memory T cells.¹⁰

Selenium (Se) is being used in several medical applications, including cancer treatment, as a bacterial growth inhibitor on instruments or biological prostheses, in bone metabolism, and as an immune system booster.^{11,12} Se may slow bone growth by changing bone metabolism.¹³ The blood concentration of Se is inversely related to the rate of bone renewal and positively associated with low bone mineral density in humans.¹⁴ Low intake of Se correlates with a high risk of bone diseases.^{15,16}

Se is an essential mineral present in selenocysteine, an amino acid involved in various biological activities, such as antioxidant defence, cell division and differentiation, and mainly participates in maintaining the proper function of the immune system.¹⁷ The lack of Se leads to a reduction in mature T-cell reserves and the activation of faulty T-cells.^{18,19,20,21,22}

Several studies have demonstrated that MTA presents excellent properties to treat root canal perforations. With that in mind, our experiment involved supplementing MTA with an essential mineral such as Se, which is capable of inhibiting bacterial growth and stimulating the immune system and bone renewal, as a way to enhance the properties of MTA. In the present study, experimental furcal perforations were generated in mandibular molars of germ-free mice. Perforations were sealed with MTA or MTA plus Se in the form of sodium selenite. Animals were longitudinally sacrificed, and the expression of cytokines, namely TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4, RANK, RANKL, IL-1, IL-17, and HPRT, was evaluated by using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Methodology

Animals

Fifteen germ-free mice of both sexes aged between 4 and 8 weeks, were used in this experiment (Swiss/NIH, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil). All animals were maintained in Trexler isolators (Madison, USA) and transferred to micro-isolators (UNO, Roestvastaal BV, Zevenaar, New Zealand) to perform the procedures. All procedures were performed under sterile conditions in laminar flow cabinets (Veco, Campinas, Brazil). The animals were fed *ad libitum*. The present study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Research (67/2014 CEUA/UFMG).

Experimental furcal perforation

The procedures were performed as described previously.^{23,24,25} In brief, before any procedure, animals were anaesthetized intraperitoneally with 100mg/kg ketamine hydrochloride (Dopalen, Division Vetbrands Animal Health, Jacaré, Brazil) and 10mg/kg xylazine (Anasedan, Agribands do Brasil LTDA, Paulínia, Brazil). Pulp chambers of the first upper molars were accessed with a ½ sterile carbide drill (KG Sorensen, Barueri, Brazil) attached to a controlled speed motor (Driller, São Paulo, Brazil), under endodontic operative microscopy (Alliance, São Paulo, Brazil). Furcal perforation was performed using ¼ sterile carbide drills, perpendicular to the furcal zone and parallel to the long axis of the tooth (Figure 1 shows a schematic representation). Perforation cavities of the right molars (control) were sealed with MTA Bios (Ângelus, Londrina, Paraná, Brazil), while those of the left molars (experimental) were sealed with MTA plus Se. All clinical crowns were sealed with Coltosoll® (Coltène/Whaledent AG Altstätten, Suisse).

MTA manipulation

MTA was prepared following the manufacturers' instructions under sterile conditions. Subsequently, 1- μ M sodium selenite solution was incorporated into MTA. To define an adequate Se concentration, macrophages (1×10^5 cells mL⁻¹) isolated from Swiss/NIH

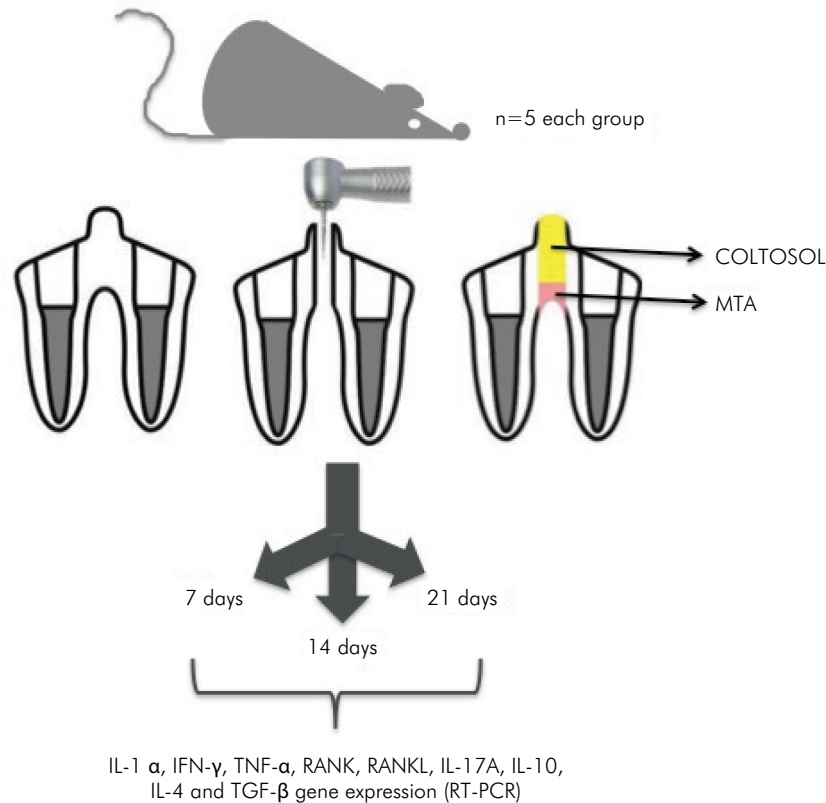


Figure 1. Germ free mouse model of experimental furcation perforation: schematic representation of the treatment protocol.

mice were cultured in 1 mL of medium in 24-well culture plates (Nunclon; Nalge Nunc International, Naperville, USA) in the presence of several dilutions of Se. At Se concentrations $\leq 10 \mu\text{M}$, the viability, adherence and phagocytosis ability of macrophages were not modified (data not shown).

Preparation of the tissue samples

Animals were sacrificed at 7, 14, and 21 days after perforation ($n = 5$). Periradicular tissues adjacent to furcal perforations were aseptically removed and frozen at -70°C . mRNA was isolated by TriZol (Gibco BRL Laboratories, Grand Island, USA), followed by the addition of chloroform and centrifugation at $12,000 \text{ g}$ and 4°C for 10 min. The aqueous phase was collected, and isopropanol was added to precipitate RNA, followed by centrifugation at $12,000 \text{ g}$ and 4°C for 10 min. mRNA was washed with 75% ethanol, dried, dissolved in RNAase-free water, and incubated at 55°C for 10 min.^{24,25}

Real-time PCR

Complementary DNA was synthesized by reverse transcription using $2 \mu\text{g}$ of RNA.²⁴ The standard PCR conditions were as follows: a holding stage of 95°C for 10 min; a cycling stage with 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min; and a melting curve stage of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 95°C for 15 s. The primer sequences used for the analysis of INF- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-10, TGF- β , IL-4, RANK, and RANKL mRNA expression by quantitative real-time PCR are shown in Table. The primer sequences were designed by using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) based on the nucleotide sequences available in GenBank. Real-time PCR was performed using the Step One Real-time PCR System (Applied Biosystem). In addition, the Sybr Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. The housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used to normalise mRNA expression levels. All

Table. Primer sequences used in PCR reactions.

| Gene | Sense and antisense | Length (bp)* | NCBI/GeneBank reference |
|---------------|---|--------------|-------------------------|
| HPRT | FW: GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT RV: GATTCAACTTGCCTCATCTTAGG | 163 | JO0423.4 |
| TNF- α | FW: ATCTTCTCAAATTCGAGTGACCA RV: TGGAGTAGACAAGGTACAACCC | 173 | AB062426.1 |
| TGF- β | FW: TGACGTCCTGGAGTTGTACG RV: GGTCATGTCATGGATGGTGC | 170 | AY340221.1 |
| RANKL | FW: CATCCCATCGGGTTCCCATAA RV: CCTTAGTTTTCCGTTGCTTAACGAC | 100 | AF019048.1 |
| RANK | FW: TGCTGGCATGGTGTATGGA RV: GAATGATGCCAGGTGGTAGGA | 78 | AF019046.1 |
| IL-4 | FW: ACAGGAGAAGGGACGCCAT RV: GAAGCCCTACAGACGAGCTCA | 95 | NM_021283.2 |
| IL-17A | FW: TGAGCTTCCCAGATCACAGA RV: TGCAGAACGCCCTCAGACTA | 101 | NM_010552.3 |
| IL-10 | FW: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA RV: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT | 191 | NM_01058.2 |
| IFN- γ | FW: CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA RV: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG | 91 | NM_008337.4 |
| IL-1 β | FW: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG RV: GATCCCACTCCCAGCTGCA | 152 | NM_008361.4 |
| IL-6 | FW: TTCCATCCAAGTTGCCTTCTTG RV: TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA | 102 | M24221.1 |

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

samples were run in duplicate in a 20 μ L reaction volume with 1 μ g of cDNA. Sequence Detection Software version 2.0 (Applied Biosystems) was used to analyse data after amplification. The results were obtained as threshold cycle (Ct) values. Expression levels were calculated using the comparative C(T) method.²⁶ The Ct values are expressed as the mean of two independent measurements, and the mRNA expression levels for all samples are expressed as the ratio between the expression of the gene of interest and the expression of HPRT.^{24,26,27}

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the normality test (Shapiro-Wilk test) and homogeneity test (Levene test). Subsequently, analysis of variance (for data with a normal distribution) and the Kruskal-Wallis test (for data with a non-normal distribution). Followed by a

post hoc test (with Bonferroni correction), were used for analysing more than two independent variables. For analysing two independent variables, Student's t-test (for a normal distribution) and the Kolmogorov-Smirnov Z test (for non-normal distribution) were used. The level of significance was 95%, and a p-value < 0.05 was considered significant.

Results

The expression of cytokines IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , RANK, RANKL, IL-17A, IL-10, IL-4, and TGF- β was assessed by using real-time PCR and normalised to the HPRT gene. At all time points evaluated and in both groups, basal expression of IL-1 α , IFN- γ , RANK, RANKL, IL-17A, IL-4, and TGF- β was observed (p > 0.05; data not shown). At 21 days after sealing the perforation with MTA/Se, TNF- α expression was significantly

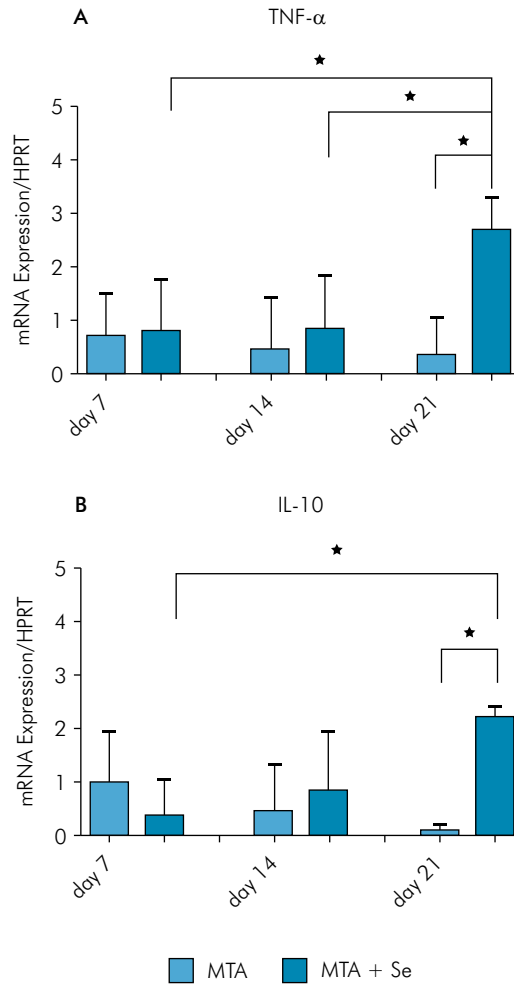


Figure 2. mRNA expression of TNF- α and IL-10 in the furcal area of germ free mouse subjected to experimental furcal perforation sealed with MTA or MTA+Se at 21 days. The expression levels were determined by real time PCR and quantified by comparison with a housekeeping gene (HPRT). Bars represent the average of five experiments performed in duplicate, while horizontal lines represent the standard error.

higher compared to that after sealing with MTA alone (control group) at the same time (Figure 2). Additionally, TNF- α expression at 21 days was significantly higher than that at 7 and 14 days in the experimental group ($p < 0.05$). IL-10 expression presented a similar profile, where it was significantly higher at 21 days in the group treated with MTA/Se, compared to the control group treated with MTA ($p < 0.05$). In the experimental group (MTA/Se), IL-10 expression was significantly higher at day 21 than at day 7 ($p < 0.05$; Figure 2).

Discussion

Gnotobiotic animals are good models for the study of dental materials in vivo.

These animal models are beneficial for determining the real effects of dental materials since the absence of indigenous bacterial microbiota allows for analysis of the relationship between their properties and the host immune system free from bacterial interference.³ In this study, a well tested experimental furcal perforation was used.²⁵

Furcal perforation is mechanical or pathological communication between the root canals and the supportive dental tissues.¹ After tooth perforation, a biocompatible material is chosen to seal the cavity to avoid bacterial invasion and periradicular inflammation.^{28,29} In this regard, MTA has been shown to have excellent potential for endodontic applications.^{2,8} In this study, the expression of cytokines was longitudinally assayed to associate the specific genotype-first response to the biocompatible material used to seal the furcal perforation. This approach can prevent initial phenotypic bias and can allow for the identification of cytokine genes that significantly contribute to the immune response.³⁰

In agreement with previous studies^{9,31} MTA induces a host-protective proinflammatory response, increasing the expression of proinflammatory cytokines in the initial phase after its placement (7 to 14 days) and favouring the expression of immunoregulatory cytokines in the late phase (21 days). In this study, with the intention of potentiating the immune response, inorganic Se was added to MTA to affect the proliferation, differentiation, and function of immunological cells.^{18,19,20,21,22,23,32}

The expression of the proinflammatory cytokines IL-1 α , IFN- γ , RANK, RANKL, and IL-17 and the anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-4 was at basal levels at 7, 14, and 21 days in the control and experimental groups. Similar to the outcomes demonstrated, MTA/Se does not interfere with IFN- γ expression.²⁴ Conversely, we reported an increase in TNF- α , IL-4, and RANKL expression by macrophages in vitro on days 7 and 14, followed by a decrease on day 21.⁹

Some inflammatory cytokines play essential roles in the innate immune response. IL-1 and TNF- α induce the expressions of adhesion molecules by endothelial cells, increasing the trafficking of phagocytes during inflammation.^{23,31,32,33,34} Moreover, these cytokines induce pulpal inflammation²³ and bone resorption in inflamed periradicular tissues.³³ In this study, when comparing the expression of TNF- α between the control and experimental groups, a significant increase in its expression was observed on day 21 in the experimental group. On the other hand, MTA did not interfere with the production of TNF- α by M1 and M2 macrophages.¹ However, an increase in the production of TNF- α by T-memory lymphocytes was observed on days 7 and 14, followed by a reduction on day 21 in the presence of MTA.³⁵ Previously, it was demonstrated that macrophages stimulated with lipopolysaccharide in Se-free cultures secrete significantly lower levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 compared to cultures stimulated with LPS in the presence of Se.³⁶ Accordingly, in this study, the increase in TNF- α expression on day 21 was found only in perforations treated with MTA/Se. Moreover, TNF- α has numerous biological activities, including the ability to stimulate neoangiogenesis.³⁷ This finding suggests that the increased expression of TNF- α in the perforations treated with MTA/Se may stimulate the initiation and progression of angioproliferative processes that will culminate in furcal perforation healing, as demonstrated elsewhere.³⁸

IL-10 is a regulatory cytokine that inhibits proinflammatory responses.³⁹ IL-4 and IL-10 expression is generally reduced in the initial phase and increased in the late chronic phase of the immune response.⁴⁰ Similar to what has been

reported in the literature, a significant increase in IL-10 production was detected on day 21 in the experimental group compared to the control group in this study.^{9,23,33} This higher Se-related IL-10 expression modulates the proinflammatory response that occur during perforation, which is helpful for the perforation healing process, as previously demonstrated.^{41,42} Appropriate intake of Se contributes to the balance of the differentiation of Th1 and Th2 lymphocytes, thus promoting a balance between the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines.³⁶

Conclusion

The results of this study support our hypothesis that Se may indeed improve the ability of MTA to treat root canal perforation. Se not only maintained the same cytokine profile induced by MTA but also led to higher late expression levels of TNF- α and IL-10. TNF- α stimulates angioproliferative processes that culminate in furcal perforation healing. IL-10 inhibits proinflammatory responses and stimulates the beginning of wound healing in a given site. Nonetheless, further experimental studies should be performed to demonstrate whether the addition of Se to MTA definitively contributes to the improvement of its biological properties.

Acknowledgements

This work was supported by FAPEMIG, CAPES, and CNPq. The authors wish to thank the postgraduate programme at the School of Dentistry of UFMG. APRS, LCNB and LQV are CNPq fellows. The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

References

1. Hamad HA, Tordik PA, McClanahan SB. Furcation perforation repair comparing gray and white MTA: a dye extraction study. *J Endod.* 2006 Apr;32(4):337-40. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.002>
2. Yildirim T, Gençoğlu N, Firat I, Perk C, Guzel O. Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Jul;100(1):120-4. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.09.017>
3. Ribeiro Sobrinho AP, Maltos SMM, Farias LM, Carvalho MA, Nicoli JR, Uzeda M et al. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 Dec;17(6):344-53. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2002.170603.x>

4. Čolčić, M, Gazivoda D, Vucevic D, Sasa V, Rudolf R, Lukic A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*. 2009 Nov;47(1):101-13. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.011>
5. Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues Junior V, Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar;39(3):250-6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00863.x>
6. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May;423(6937):337-42. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
7. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Oct;78(4):494-502. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90044-2)
8. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):80-3. <https://doi.org/10.1097/00004770-200402000-00004>
9. Rezende TMB, Vargas DL, Cardoso FP, Ribeiro Sobrinho AP, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J*. 2005 Dec;38(12):896-903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.01036.x>
10. Rezende TMB, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, Mendes STO, Jorge MLR et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J*. 2007 Aug;40(8):603-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01255.x>
11. Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufresne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*. 2013 Mar;18(3):3292-311. <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>
12. Zeng H, Cao JJ, Combs GF Jr. Selenium in bone health: roles in antioxidant protection and cell proliferation. *Nutrients*. 2013 Jan;5(1):97-110. <https://doi.org/10.3390/nu5010097>
13. Moreno-Reyes R, Egrise D, Nève J, Pasteels JL, Schoutens A. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. *J Bone Miner Res*. 2001 Aug;16(8):1556-63. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1556>
14. Hoeg A, Gogakos A, Murphy E, Mueller S, Köhrle J, Reid DM et al. Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Nov;97(11):4061-70. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2121>
15. Johnson CC, Fordyce FM, Rayman MP. Symposium on 'geographical and geological influences on nutrition': factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Procs Nutr Soc*. 2010 Feb; 69(1):119-32. <https://doi.org/10.1017/S0029665109991807>
16. Zhang J, Munger RG, West NA, Cutler DR, Wengreen HJ, Corcoran CD. Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: an effect modified by smoking status. *Am J Epidemiol*. 2006 Jan;163(1):9-17. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj005>
17. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr*. 2001 Apr;4(2b 2B):593-9. <https://doi.org/10.1079/PHN2001143>
18. Shrimali RK, Irons RD, Carlson BA, Sano Y, Gladyshev VN, Park JM et al. Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *J Biol Chem*. 2008 Jul;283(29):20181-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802559200>
19. Behne D, Wolters W. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J Trace Elem Med Biol*. 2009;23(4):258-64. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2009.05.001>
20. Gromer S, Eubel JK, Lee BL, Jacob J. Human selenoproteins at a glance. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Nov;62(21):2414-37. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5143-y>
21. Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview. *Nutr Rev*. 2002 May;60(5 Pt 2 suppl_5):S40-5. <https://doi.org/10.1301/00296640260130722>
22. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. *J Nutr*. 2003 May;133(5 Suppl 1):1457S-9S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1457S>
23. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod*. 2008 Sep;34(9):1057-60. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.06.007>
24. Barbosa Silva MJ, 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 May;105(5):e70-6. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.01.025>
25. Lara VP, Cardoso FP, Brito LC, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP, Rezende TM. Experimental furcal perforation treated with MTA : analysis of the cytokine expression. *Braz Dent J*. 2015 Jul-Aug;26(4):337-41. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300006>
26. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
27. Maciel KF, Brito LCN, Tavares WLF, Moreira Junior G, Nicoli JR, Vieira LQ et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):354-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01983.x>
28. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod*. 1995 Aug;21(8):403-6. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80824-1](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80824-1)
29. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J*. 2007;18(1):3-7. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402007000100002>

30. Stessman HA, Bernier R, Eichler EE. A genotype-first approach to defining the subtypes of a complex disease. *Cell*. 2014 Feb;156(5):872-7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.002>
31. Braga JM, Oliveira RR, Martins RC, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. *Dent Traumatol*. 2015 Oct;31(5):390-5. <https://doi.org/10.1111/edt.12190>
32. Pietschmann N, Rijntjes E, Hoeg A, Stuedter M, Schweizer U, Seemann P et al. Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bones. *Metallomics*. 2014 May;6(5):1043-9. <https://doi.org/10.1039/C4MT00003J>
33. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov;15(6):348-81. <https://doi.org/10.1177/154411130401500604>
34. Zakharova M, Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 2005 Oct;175(8):5024-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5024>
35. Rezende TM, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP, Oliveira RR, Taubman MA, Kawai T. The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. *J Endod*. 2008 Sep;34(9):1066-71. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.06.006>
36. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Apr;16(7):705-43. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>
37. Virtej A. Vascular endothelial growth factors and receptors: from normal dental pulp to apical pathology. [Dissertation]. University of Bergen, Helse Vest; 2016.
38. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Passerini G, Bussolino F, Emanuelli G et al. Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med*. 1994 Jul;180(1):377-82. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.377>
39. Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R et al. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*. 2000 Oct;165(7):3626-30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3626> PMID:11034365
40. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):773-81. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.002>
41. Moon HJ, Ko WK, Han SW, Kim DS, Hwang YS, Park HK et al. Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb;418(2):247-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.005>
42. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J*. 2009 Jul;422(1):11-22. <https://doi.org/10.1042/BJ20090219>

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc. 2003, 566 p.
- BABIOR B.M.; CURNUTTE J.T.; KIPNES R.S. Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 85, p. 235-244, 1975.
- BORTOLUSSI R.; VANDENBROUCKE-GRAULS C.M.; VAN A.B.S. Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems. Infection and Immunity, v.55, p.3197-3203, 1987.
- BHASKARAM, P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: An overview. Nutrition Review, v.60, p.40-45, 2002.
- DE DEUS, G.; *et al.* The ability of Portland cement, MTA, and MTA Bio to prevent through-and-through fluid movement in repaired furcal perforations. Journal of Endodontic, v.33, p.1374-1377, 2007.
- FUKADA, S.Y.; *et al.* Factors involved in the T helper type 1 and 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. Oral Microbiology and Immunology, v.24, p.25-31, 2009.
- HAHN, C., LIEWER, F.R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. Journal of Endodontic, v. 33, p.643-649. 2007.
- HAMAD, H. A.; TORDIK, P. A.; MCCLANAHAN, S. B. Furcation perforation repair comparing gray and white MTA: a dye extraction study. Journal of Endodontic, v.32, p.337-340. 2006.
- HOLLAND, R., *et al.* Reaction of the lateral periodontium of dog's teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. Journal of Endodontic, v. 33, p.1192-1197. 2007.
- HUANG, Z.; ROSE, A.H.; HOLFFMAM, A.R., The role of selenium in inflammation and immunity from molecular. Mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants and Redox Signaling v.16, p. 7-12, 2012.
- JONTELL M.; *et al.* Immune defense mechanisms of the dental pulp. Critical Review in Oral Biology and Medicine, v.9, n.2, p.179-200. 1998.
- KRAMER G.F.; AMES B.N. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research, v. 201, p.169-180, 1988.

LEE, S.J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontic*, v. 19, n. 11, p.541-544, 1993.

MATHEWS S.M.; SPALLHOLZ J.E.; GRIMSON M.J.; DUBIELZIG R.R. Prevention of bacterial colonization of contact lenses with covalently attached selenium and effects on the rabbit cornea. *Cornea*, v. 25, p.806-814, 2006.

MEDHI, Y.; HORNICK J. L.; ISTASSE, L.; DUFRASNE, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules*, v. 18 p 3292-3311, 2013.

REZENDE T.M.B.; *et al.* Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *International Endodontic Journal*, v. 38, p.896-903, 2005.

REZENDE, T.M.B.; *et al.* The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *International Endodontic Journal*, v.40, p.603-611, 2007.

REZENDE, T.M.B.; *et al.* The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. *Journal of Endodontic*, v.34, p.1066-1071. 2008.

SAZAKI, H.; *et al.* IL-10, but not IL-4, supresses infection stimulated bone resorption in vivo. *Journal of Immunology*, v.165, p.3626-3630, 2000.

SAITO, Y.; *et al.* Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 278 p. 39428-34, 2003.

SEKO, Y.; IMURA, N. Active Oxygen generation as a possible mechamism of selenium toxicity. *Biomedical and Environmental Science*, v. 10, p.333-339, 1997.

SHRIMALI, R.K.; *et al.*,. Chem.Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 283, p.20181-20185, 2008.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal*, v.31, p.311-325. 1998.

TRAN, PL.; *et al.*, Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Enviromental Microbilology*, v. 75 p. 3586-3592, 2009.

TRAN, P.L.; *et al.* The organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheteres in vivo. *Antimicrobiane Agents Chemother* v.56 p. 972-978, 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.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 67 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Perfurações experimentais de furca tratadas com MTA acrescido de Selênio : Análise da Resposta Imune.", que tem como responsável Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/06/2014. Este certificado espira-se em 10/06/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 67 / 2014, related to the Project entitled "Experimental furcation perforations treated with MTA plus Selenium: Analysis of the Immune Response.", under the supervision of Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/06/2014. This certificate expires in 10/06/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 10/06/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br