

WILSON BAMBIRRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA CARGA MICROBIANA E FÚNGICA DE SISTEMAS
DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS E A EXPRESSÃO APICAL
DE INTEGRINAS, CITOCINAS E QUIMIOKINAS NOS TECIDOS
PERIRRADICULARES ADJACENTES**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2022**

Wilson Bambirra Júnior

**AVALIAÇÃO DA CARGA MICROBIANA E FÚNGICA DE SISTEMAS
DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS E A EXPRESSÃO APICAL
DE INTEGRINAS, CITOCINAS E QUIMIOCINAS NOS TECIDOS
PERIRRADICULARES ADJACENTES**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Belo Horizonte
2022

Ficha Catalográfica

B199a Bambirra Júnior, Wilson.
2022 Avaliação da carga microbiana e fúngica de sistemas de
T canais radiculares infectados e a expressão apical de
integrinas, citocinas e quimiocinas nos tecidos / Wilson
Bambirra Júnior. -- 2022.

70 f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

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

1. Contagem de colônia microbiana. 2. Integrinas. 3.
Periodontite periapical. 4. Citocinas. 5. Quimiocinas. I.
Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047

Elaborada por Miriam Cândida de Jesus -

CRB 6/2727.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA CARGA MICROBIANA E FÚNGICA DE SISTEMAS DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS E A EXPRESSÃO APICAL DE INTEGRINAS, CITOCINAS E QUIMIOCINAS NOS TECIDOS PERIRRADICULARES ADJACENTES.

WILSON BAMBIRRA JÚNIOR

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

Aprovada em 27 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

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

Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares
UFMG

Prof(a). Elen Marise Castro de Oliveira
UFMG

Prof(a). Taia Maria Berto Rezende
Universidade Católica de Brasília

Prof(a). Frank Ferreira da Silveira
PUC MG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Taia Maria Berto Rezende, Usuária Externa**, em 27/07/2022, às 18:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elen Marise Castro de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 27/07/2022, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho, Professor do Magistério Superior**, em 28/07/2022, às 08:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Warley Luciano Fonseca Tavares, Coordenador(a)**, em 28/07/2022, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frank Ferreira Silveira, Usuário Externo**, em 28/07/2022, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1623076** e o código CRC **FE6380A0**.

Dedico este trabalho à Deus pela possibilidade de concretizá-lo, à toda a família pelos constantes exemplos de superação, e a todos os educadores que, com sacrifício da própria vida, contribuem na formação de pessoas melhores.

AGRADECIMENTOS

Ao grande arquiteto do universo que, através de seus tortuosos caminhos, mostrou-me sua benevolência e grandiosidade fazendo-me trilhar caminhos onde a constante superação foi dura companheira. Mas superar a nós mesmos é o que nos realiza como pessoas e reafirma quem somos.

À minha esposa Daniela e meus filhos Olga e Lucas. Muito obrigado por entender meus momentos de ausência. Mesmo em dias sacrificantes as únicas palavras proferidas foram de incentivo. E peço desculpas pelo egoísmo na concretização de um antigo sonho. Não existem palavras para explicar e agradecer a importância de vocês em minha vida e o valor desse voto de resignação.

Aos meus pais, Wilson Bambirra (*in memoriam*) e Maria das Graças que foram e sempre serão meus maiores mestres. Foi o apoio e amor incondicional de vocês que me conduziram até aqui. Obrigado por tudo!

À Força Aérea Brasileira (FAB) que contribuiu imensamente na redescoberta de nobres valores e possibilitou-me viver um mundo fascinante ao lado de bravos e fortes infantess.

À UNIMONTES e ao Laboratório de Pesquisa em Saúde, na figura do Professor Doutor André Luiz Sena Guimarães que desde sempre foi amigo, inspirador, íntegro e quando mais precisei acolheu-me com toda a generosidade, coragem e carinho que o momento se apresentou e contribuiu definitivamente pela concretização desse sonho.

Ao Professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pela sabedoria, paciência, compreensão, estímulo constante e orientação. Sua presença nesta etapa da minha vida foi fundamental. Obrigado Professor, mais uma vez, pela oportunidade, pelo carinho, pela confiança e pelos ensinamentos! Levarei para sempre seus exemplos e aprendizado.

Ao Professor Doutor Warley Luciano Fonseca Tavares por sempre estar disposto em ajudar e incentivar, pelos constantes exemplos de garra e determinação, em prol do crescimento profissional e pessoal.

Ao amigo Doutor Victor Hugo Dantas Guimarães que por sua competência, profissionalismo e dedicação foram fundamentais para tornar o árduo trabalho laboratorial em momentos singelos e de muito aprendizado.

Ao amigo Doutor Lucas Moreira Maia cujas palavras sempre foram de incentivo e encorajamento frente aos desafios da vida.

Aos Professores e Educadores que me conduziram até aqui. Agora que tenho conhecimento na área docente vejo o quanto foram maravilhosos ao me apresentar o mundo do conhecimento. E com muita paciência e dedicação capacitaram-me para acessá-lo.

Aos funcionários da FO-UFMG, em especial ao Victor e Valéria, pelo apoio sempre que necessário.

À Dra. Isabela Brandão pela forma brilhante e encantadora de conduzir os desafios que a vida nos apresenta e pela parceria na constante promoção de saúde aos pacientes.

Aos pacientes e seus familiares que gentilmente colaboraram para a realização deste estudo.

Aos colegas de pós-graduação, pelo companheirismo, amizade e por compartilharem além de conhecimentos muitos bons momentos. Em especial, aos queridos amigos: Lígia, Sylvia, Fran, Luíza, Batata, Alexandre, Roberta, Marcela, Betânia e Gustavo Campos.

“Coloque fé quando surgir o medo; coloque esperança quando vier o desespero; coloque positividade quando parecer difícil; coloque otimismo quando escurecer.”

Tiago Santana

RESUMO

Este estudo busca avaliar quantitativamente a expressão do RNA mensageiro (mRNA) das integrinas alfa1, alfa4, alfa 5, alfa L, citocinas e quimiocinas, a partir de células presentes no líquido intersticial periapical adjacente a dentes com infecção do canal radicular. Foram selecionados 22 indivíduos com necessidade de tratamento endodôntico e encaminhados à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brasil). As amostras foram coletadas em 11 dentes necróticos e portadores de infecções endodônticas e 11 dentes hígidos que necessitavam de tratamento endodôntico por motivos protéticos. Após a cirurgia de acesso e antes dos procedimentos de limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares (T0), imediatamente após a limpeza e formatação do sistema de canais radiculares (T1), em 7 (T2) e 14 dias (T3), um cone de papel esterilizado endodôntico # 20 foi inserido no SCR, mantido por 2 min, e posteriormente armazenado a -70°C. Real-Time PCR analisou microbiologicamente essas amostras para ler a expressão gênica do rRNA microbiano 16S e fragmentos da região ITS do gDNA fúngico da espécie *Candida*. Após os procedimentos de limpeza e formatação do SCR, três cones de papel absorvente esterilizados foram inseridos. Passivamente, a ponta do papel ultrapassou o ápice radicular em 2 mm e permaneceu por 2 minutos. As amostras foram coletadas imediatamente após a limpeza e modelagem do RCS, 7 e 14 dias após a primeira sessão. As pontas de papel tiveram os 4 mm finais cortados, inseridos em Eppendorf e armazenados a -70°C. Com este procedimento, o RNA foi extraído do líquido intersticial periapical para caracterizar as expressões dos genes ITGA1, ITGA4, ITGA5, ITGAL, IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-10, IFN- γ , CCL2/MCP-1, CCL5, CXCR4, e 16S usando PCR em tempo real. O DNA genômico (gDNA) foi extraído para se avaliar a abundância de *Candida* utilizando-se sequências ITS, por PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que os níveis de expressão de mRNA do 16S diminuíram após os procedimentos de limpeza e modelagem e que a abundância de *Candida* foi insipiente na amostra analisada. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-17 apresentaram níveis de expressão elevados frente a infecção, reduzindo significativamente após os procedimentos de limpeza e formatação. Os níveis de expressão gênica de TNF- α significativamente aumentaram, em ambos os grupos. Não se observou diferença significativa quanto a expressão gênica das citocinas IFN- γ , IL-10, CCL-2 e CCL-5 e das integrinas ITGAL e ITGA5 nos tempos avaliados. A expressão gênica de CXCR4 reduziu significativamente do tempo T1 para o T2, no grupo experimental. As expressões gênicas de ITGA1 e ITGA4, no grupo experimental, reduziram significativamente de maneira tempo dependente. Finalmente, não houve alteração significativa na expressão de marcadores de macrófagos (CD64), enquanto expressão de marcadores de fibroblastos (S100A4) aumentou significativamente no grupo controle. Concluiu-se que a carga microbiana e a abundância de leveduras correlacionam-se positivamente com a expressão de mediadores pró-inflamatórios e que a que terapia endodôntica negativamente impacta a expressão dos mediadores pró-inflamatórios e das integrinas nos tecidos perirradiculares.

Palavras-chave: Carga bacteriana. Integrinas. Doença periapical. Citocinas. Quimiocinas.

ABSTRACT

Assessment of the microbial and fungal load of infected root canal systems and the apical expression of integrins, cytokines and chemokines in adjacent periradicular tissues

This study seeks to quantitatively evaluate the expression of messenger RNA (mRNA) of integrins alpha1, alpha4, alpha 5, alpha L, cytokines, and chemokines, from cells present in the periapical interstitial fluid adjacent to teeth with root canal infection. Twenty-two individuals needing endodontic treatment and referred to the School of Dentistry of the Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brazil) were selected. The samples were collected in 11 necrotic teeth and carriers of endodontic infections and 11 healthy teeth needing endodontic treatment for prosthetic reasons. After access surgery and before root canal system (RCS) cleaning and shaping procedures (T0), immediately after cleaning and shaping the root canal system (T1), in 7 (T2) and 14 days (T3) an endodontic sterilized paper point #20 was inserted into the RCS, maintained for 2 min, and subsequently stored at -70°C. Real-Time PCR microbiologically analyzed these samples to read the gene expression of microbial rRNA 16S and fragments of the ITS region of the Fungus *Candida* species gDNA. After RCS cleaning and shaping procedures, three sterilized absorbent paper cones were inserted. Passively, the paper point exceeded the root apex by 2 mm and remained for 2 minutes. Samples were collected immediately after RCS cleaning and shaping, 7 and 14 days after the first session. The paper points have the 4 mm of their tip cut, inserted in Eppendorf, and stored at -70°C. This procedure extracted RNA from the periapical interstitial fluid to characterize the expressions of the genes ITGA1, ITGA4, ITGA5, ITGAL, IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-10, IFN- γ , CCL2/MCP-1, CCL5, CXCR4, ITS using Real-Time PCR. The results showed that 16S mRNA expression levels decreased after cleaning and modeling procedures and that *Candida* abundance was incipient in the analyzed sample. Pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-17 showed high expression levels against infection, significantly reduced after cleaning and formatting procedures. TNF- α gene expression levels significantly increased in both experimental and control groups. No significant difference was observed regarding the gene expression of the cytokines IFN- γ , IL-10, CCL-2, and CCL-5 and the integrins ITGAL and ITGA5. The gene expressions of ITGA1 and ITGA4 in the experimental group were significantly reduced time-dependent. Finally, there was no significant change in their macrophage markers (CD64) expression, while fibroblast markers (S100A4) expression significantly increased in the control group. It was concluded that microbial load and yeast abundance are positively correlated with the expression of pro-inflammatory mediators and that endodontic therapy negatively impacts the expression of pro-inflammatory mediators and integrins in periradicular tissues.

Keywords: Bacterial load. Integrin. Periapical disease. Cytokines. Chemokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão gênica de mRNA 16S ribossômico.....	33
Figura 2 - Expressão gênica de mRNA de IL1 β	35
Figura 3 - Expressão gênica de mRNA de TNF- α	35
Figura 4 - Expressão gênica de mRNA de IL-17.....	36
Figura 5 - Expressão gênica de mRNA de CXCR4.....	36
Figura 6 - Expressão gênica de mRNA de ITGA1.....	37
Figura 7 - Expressão gênica de mRNA de ITGA4.....	37
Figura 8 - Expressão gênica de mRNA de CD64.....	38
Figura 9 - Expressão gênica de mRNA de S100A4.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers.....	31
Tabela 2. Expressão gênica - gDna (<i>Gênero Cândida</i>)	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2/MCP-1	do inglês, <i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
CCL5	do inglês, <i>Chemokine ligant 5</i>
cDNA	do inglês, <i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CXCR4	do inglês, <i>C-X-C chemokine receptor type</i>
CT	Limiar de ciclo, do inglês, <i>threshold cycle</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	do inglês, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNTP	do inglês, <i>Deoxynucleoside triphosphate</i>
GAPDH	do inglês, <i>Gene Glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	do inglês, <i>genomic Desoxyribonucleic Acid</i>
mRNA	do inglês, <i>messenger Ribonucleic acid</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ITGA1	Integrina alfa 1
ITGA4	Integrina alfa 4
ITGA5	Integrina alfa 5
ITGAL	Integrina alfa L
ITS	do inglês, <i>Internal Transcribed Spacer</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
OTU	do inglês, <i>Operational Taxonomic Unit</i>
RANK	do inglês, <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL	Ligante RANK
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
SCR	Sistema de canais radiculares
<i>Real time PCR</i>	do inglês, <i>real time Polymerase Chain Reaction</i>
TCD4+	do inglês, <i>Lymphocytes T CD4+</i>
TCD8+	do inglês, <i>Lymphocytes T CD8+</i>
TGF	do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i>
Th	do inglês, <i>Lymohocytes T helper</i>
TNF	do inglês, <i>Tumor Necrotic Factor</i>
TNFR2	do inglês, <i>Tumour Necrosis Factor Receptor 2</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos da pesquisa.....	17
1.1.1 Objetivo geral.....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Infecção endodôntica.....	19
2.2 Imunologia das infecções endodônticas.....	21
2.3 Integrinas.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Pacientes	27
3.2 Coleta de amostras.....	27
3.3 Extração de DNA genômico.....	29
3.4 Extração de mRNA.....	29
3.5 Síntese de cDNA.....	29
3.6 Síntese de gDNA.....	30
3.7 Real time PCR.....	30
3.8 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Discussão.....	39
5 CONCLUSÕES	44
5.1 Perspectivas futuras.....	45
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

As alterações pulpares e perirradiculares são normalmente resultados do envolvimento direto ou indireto dos microrganismos presentes na cavidade oral, que são essenciais à progressão e perpetuação das diferentes formas de alterações periapicais (FABRICIUS *et al.*, 2006; KAKEHASHI *et al.*, 1965; MÖLLER *et al.*, 1966; SUNDQVIST, 1992).

Apesar de hoje se estimar que na cavidade oral existam mais de 700 espécies bacterianas (HENRIQUES *et al.*, 2016; PASTER *et al.*, 2001), em condições normais, os sistemas de canais radiculares (SCR) não albergam uma microbiota residente. Entretanto, nos dentes cujo suprimento vascular encontra-se comprometido, o ambiente torna-se favorável à contaminação por patógenos oportunistas (BAUMGARTNER & FALKLER, 1991; SUNDQVIST, 1992).

Com o desenvolvimento das técnicas de coleta, transporte e cultivo dos isolados, pôde-se observar que a verdadeira infecção endodôntica é mista e se constitui, em sua maioria, de espécies anaeróbias estritas (BERGENHOLTZ, 1974; GOMES *et al.*, 1994; LANA *et al.*, 2001; SUNDQVIST, 1992).

Recentemente, com o advento das técnicas de biologia molecular, houve uma melhora significativa na sensibilidade, especificidade e custo benefício das análises microbiológicas associadas à cavidade oral (BRITO *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2020; HENRIQUES *et al.*, 2016; SEOL *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2000b; SIQUEIRA *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2005; SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRANSKY *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2011; TELES *et al.*, 2007b). Entretanto, das centenas de espécies microbianas que habitam a cavidade oral humana, 50% permanecem ainda hoje não cultivadas (PASTER *et al.*, 2001; PASTER *et al.*, 2002).

Embora as bactérias sejam os principais agentes envolvidos nas infecções endodônticas, fungos, arqueas e vírus também são detectados nessas infecções (PERSOON *et al.*, 2017a, b; SABOIA-DANTAS *et al.*, 2007; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2014; SIQUEIRA & SEN, 2004; VIANNA *et al.*, 2006; WALTIMO *et al.*, 1997). Esses microrganismos, na forma de comunidades complexas de biofilme, criam um ambiente de proteção mútua e tolerância a agentes antimicrobianos. Como relatado por ABUSREWIL *et al.* (2020), a presença de fungos, como *Candida albicans*, em

infecções endodônticas polimicrobianas, permitem sua interação com várias taxa bacterianas diferentes.

A habilidade dos microrganismos em se implantar em certos sítios dependerá, dentre outros fatores, de seu número, virulência e da resistência do hospedeiro. Uma vez instalados nos SCR, esses microrganismos induzirão uma resposta de defesa nos arredores do ápice radicular (STASHENKO, 1990). A patogenicidade das espécies bacterianas presentes no SCR determinará seus efeitos diretos sobre os tecidos circunjacentes por meio da produção de enzimas e de toxinas que degradam estes tecidos. Por sua vez, atuam indiretamente, estimulando a liberação de mediadores solúveis derivados do hospedeiro, como as citocinas e quimiocinas por células do sistema imune. A resposta inflamatória, que aí se processa, recrutará células imunocompetentes para conter e impedir a disseminação dessa infecção para outros sítios, culminando com a formação de uma lesão crônica e concomitante reabsorção dos tecidos de suporte periodontal (BAMBIRRA *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2012; FUKADA *et al.*, 2009; GARLET *et al.*, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2011; MAIA *et al.*, 2020 RITTLING *et al.*, 2009).

A organização tecidual e as funções fisiológicas dos órgãos e tecidos são desempenhadas fundamentalmente pela adesão celular. As moléculas de adesão celular são proteínas expressas na superfície celular que participam das interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC). Atuam na sinalização entre o interior e o exterior da célula, no crescimento e proliferação, na organização espacial e na migração celular. Desempenham papel de moléculas de adesão celular as integrinas, caderinas, selectinas, imunoglobulinas e outras, como o CD44, que é uma glicoproteína envolvida nas interações célula-célula. Operam em processos biológicos normais e patológicos, como metástases, angiogênese, inflamação, migração celular, proliferação e diferenciação celular, epitelialização, deposição e remodelação de matriz extracelular (FERRAZ & FERNANDEZ, 2014; GARLET *et al.*, 2012;).

As integrinas são glicoproteínas que agem como mediadores no processo inflamatório, exercendo importante papel na adesão leucocitária, na quimiotaxia, fagocitose, na adesão endotelial e na agregação celular. Como proteínas sinalizadoras, possuem receptores primários capazes de realizar a transdução de mensagens por vias de sinalização clássica atuando na modulação do comportamento celular. Em células mielomonocíticas as interações adesivas mediadas pela integrina α -L (ITGAL) regulam diferentes respostas celulares, como a transmigração para os

locais inflamados, secreção de citocinas, degranulação e fagocitose, reconhecendo ligantes extracelulares específicos (ZHANG *et al.*, 2021). Nas alterações perirradiculares, as integrinas α 1 (ITGA1), α 4 (ITGA4) e α 5 (ITGA5) participam da modulação da migração celular, organização do citoesqueleto e da produção de metaloproteinases (SCHWARTZ *et al.*, 2018). Em conjunto com glicoproteínas, como a laminina, fibronectina, colágenos, proteoglicanos, atuam dando forma e preenchendo os espaços intercelulares da matriz extracelular no entorno dos ápices dentários de dentes portadores de infecção endodôntica (OHSHIMA *et al.*, 2006; YU & GAFFEN, 2008).

Nas alterações perirradiculares, os linfócitos e macrófagos são as células mais prevalentes (STASHENKO *et al.*, 1998). Componentes microbianos provenientes dos SCR infectados entram em contato com as células apresentadoras de antígenos (APC), como os macrófagos, polarizando os Linfócitos T (Th). Assim, as alterações perirradiculares ocorrem como consequência da produção de mediadores inflamatórios, quimiocinas e citocinas, pró ou anti-inflamatórias (GALLER *et al.*, 2021) por estas células, sem a necessidade de uma ação direta dos microrganismos.

Uma consequência das respostas imune perirradiculares à infecção é a ocorrência da reabsorção óssea. Este é o efeito de uma resposta imune do tipo 1, mediada por citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL- 1 β) (BRYANT & SLADE, 2015), que estimulam a produção de RANKL por osteoblastos, ativando os pré-osteoclastos ali presentes (ESPALADORI *et al.*, 2021).

Outro subtipo de células T, Th17, que expressa citocinas IL-17 e IL-22, participa da exacerbação da inflamação com potentes efeitos em diversas células do sistema imune inato (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021).

Os processos de cura e reparo tecidual estão associados a uma resposta imune do tipo 2, com a produção de citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-13 (TEIXEIRA *et al.*, 2022). Por sua vez, ambas as respostas, do tipo 1 e 2, são reguladas por células Treg que expressam citocinas como a IL-10 e o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β).

As quimiocinas CCL2, CXCR4, CCL5 e CXCL8 atuam como agentes quimiotáticos que coordenam a migração das células do sistema imune ao sítio inflamatório. Apresentam também outras funções biológicas, estando envolvidas na

homeostase, angiogênese e a ativação e regulação do sistema imune (OZGA *et al.*, 2021).

A instituição da terapia endodôntica visa a interferir na ação dos microrganismos, direta ou indiretamente, sobre os tecidos perirradiculares, contribuindo para que ocorra a cicatrização apical. Por meio das etapas de limpeza e formatação, o tratamento endodôntico procura remover química e mecanicamente o microbioma aí presente, promovendo uma obturação hermética que impeça a recontaminação dos SCR. Contudo, apesar do grande avanço científico, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na instalação e reparo das lesões perirradiculares ainda não são totalmente conhecidos (BAMBIRRA *et al.*, 2015; BRAGA DINIZ *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2012; DE ROSSI *et al.*, 2008; ESPALADORI *et al.*, 2021; KAWASHIMA *et al.*, 1999; STASHENKO *et al.*, 1998; TAVARES *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2022). Neste contexto, este estudo procurou inicialmente determinar a presença ou ausência de bactérias e fungos nos SCR humanos, correlacionando tais achados à expressão de integrinas, citocinas e quimiocinas, em diferentes momentos da terapia endodôntica. Como controle, avaliou os mesmos parâmetros em SCR humanos apresentando vitalidade pulpar, que foram tratados por finalidade protética, ou seja, sem a presença de uma infecção intra-radicular.

1.1 OBJETIVOS DA PESQUISA

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da terapia endodôntica, longitudinalmente, sobre a carga microbiana e fúngica em sistemas de canais humanos infectados e seus efeitos sobre a expressão de integrinas, citocinas e quimiocinas no fluído intersticial periapical, por meio da PCR em tempo real.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a carga microbiana e fúngica presente em canais radiculares humanos infectados por meio da expressão gênica do rRNA 16S microbiano e fragmentos da região ITS do gDNA de fungos do gênero *Candida*, nos tempos T0 (na presença de infecção), T1 imediatamente após a limpeza e formatação do Sistema de Canais Radiculares, T2 (7 dias após a limpeza e formatação dos SCR) e T3 (14 dias após a limpeza e formatação dos SCR);

- Avaliar a expressão gênica de integrinas (ITGA1, ITGA4, ITGA5, ITGAL) nos tecidos perirradiculares, imediatamente após a limpeza e formatação dos SCR (T1) (resposta à infecção), 7 dias (T2) e 14 dias (T3), nos canais radiculares humanos infectados;

- Avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL-5 e CXCR-4, nos fluidos intersticiais de canais radiculares humanos infectados, nos tempos T1, T2 e T3;

- Avaliar a expressão gênica dos marcadores celulares de macrófagos (CD64) e de fibroblastos (S100A4) nos fluidos intersticiais de canais radiculares humanos infectados, nos tempos T1, T2 e T3;

- Correlacionar a expressão gênica de integrinas, citocinas, quimiocinas e dos marcadores celulares de macrófagos e fibroblastos expressos nos tempos T1, T2 e T3, nos fluidos intersticiais de canais radiculares humanos infectados;

- Avaliar os mesmos parâmetros, longitudinalmente, em canais radiculares humanos não infectados, submetidos à terapia endodôntica por finalidade protética, selecionados como grupo controle;

- Comparar a expressão gênica dos mediadores avaliados em canais radiculares humanos infectados (grupo experimental) com aqueles não infectados (grupo controle).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção endodôntica

A cavidade oral alberga sete centenas de taxa microbianas que coabitam comunidades compostas por múltiplas espécies. O termo microbiota define uma coleção de microrganismos que habitam um dado ecossistema. O ecossistema oral contém uma das mais ricas microbiotas do corpo humano, dominada por bactérias, embora Archaea, fungos, vírus e protozoas possam também ser encontrados (AVILA *et al.*, 2009; COSTALONGA & HERZBERG, 2014; HERNÁNDEZ VIGUERAS *et al.*, 2016). De forma diversa, os sistemas de canais radiculares (SCR) contém em seu interior um tecido conjuntivo pulpar fisiológico, livre de microrganismos, que quando em sua presença demonstra sinais de uma patologia ali instalada. Durante décadas, vários estudos debruçaram sobre as infecções endodônticas procurando entender sua patogenicidade, inclusive a composição microbiana, biologia do biofilme e as respostas do hospedeiro a estas infecções (WONG *et al.*, 2021).

O estado da arte atual demonstra que a real infecção endodôntica é polimicrobiana, organizando-se principalmente na forma de biofilme, intra e extraradicularmente (RICCUCI & SIQUEIRA, 2010; SIQUEIRA & ROÇAS, 2009). Atualmente, não mais que 775 bactérias foram catalogadas no nível de espécie no “Human oral microbiome database” (HOMD) (BRITO *et al.*, 2007; DEWHIRST *et al.*, 2010; GATTI *et al.*, 2000; HENRIQUES *et al.*, 2016; TAVARES *et al.*, 2012).

Por muitos anos, os conhecimentos a respeito das infecções endodônticas se baseavam em técnicas de culturas ou em abordagens moleculares tais como hibridização *in situ* fluorescente (FISH), hibridização DNA-DNA ou PCR e suas variações (FERNANDEZ *et al.*, 2014; ZEHNDER *et al.*, 2017). Estas abordagens identificaram grupos de taxa bacterianas que parecem ser dominados por espécies anaeróbias estritas gram negativas, dos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema* (BRITO *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2012; MUNSON *et al.*, 2002; SIQUEIRA & ROÇAS, 2005). Encontram-se também diversas comunidades microbianas compostas por anaeróbios facultativos gram-positivos, incluindo espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* e *Enterococcus* (BRITO *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2003; SAKAMOTO *et al.*, 2008).

Dentre outros microrganismos presentes nas infecções endodônticas, MIRANDA *et al.*, (2009) avaliaram a frequência e a diversidade de leveduras em canais radiculares necróticos associados a periapicopatia. Verificaram que a quantidade de fungos isolados nas amostras de SCR infectados são minimizados pelas técnicas e métodos de isolamento utilizadas, que favorecem o isolamento de bactérias. LANA *et al.*, (2001) utilizando métodos de coleta e meios de cultura específicos para detecção de *Cândida albicans*, avaliaram microbiologicamente 31 canais com necrose pulpar, em três tempos: logo após a obtenção do acesso intracoronário, antes e após a terapia endodôntica. Os autores encontraram a presença de *Candida* em apenas 3 casos do total avaliado (9,67%). Sabe-se, contudo, que a *Candida albicans* tem a capacidade de produzir e secretar a enzima aspartil protease, que a permite utilizar proteínas de diferentes substratos, incluindo o colágeno dental, como fonte de energia, permitindo sua sobrevivência e atuação na colonização dos SCR. Além disso, acredita-se que padrões pleomórficos de crescimento são fatores possivelmente relacionados à maior frequência dessas leveduras em infecções endodônticas (PERSONN *et al.*, 2017).

Na última década, tecnologias de sequenciamento de nova geração (next-generation sequencing – NGS), que permitem um alto rendimento no sequenciamento do DNA, se tornaram ferramentas relevantes no estudo da complexidade da comunidade microbiana (YARZA *et al.*, 2014). Em endodontia, a identificação principalmente se volta para o sequenciamento parcial do gene 16S ribossomal RNA (16S rRNA) (MANOIL *et al.*, 2020). Este gene tem a vantagem de ser onipresente em bactéria e possuir regiões conservadas que podem ser empregadas para detectar virtualmente toda taxa presente em uma amostra, junto com regiões variáveis que diferem entre diferentes taxa e tornam-se alvos para a identificação bacteriana (KUCZYNSKI *et al.*, 2011). O perfil do microbioma presente em infecções endodônticas, utilizando-se NGS, revelou uma diversidade previamente desconhecida, substancialmente expandindo o catálogo de bactérias aí identificadas para mais de 400 taxa, em média (MANOIL *et al.*, 2020).

Como resultado desta diversidade, demonstrou-se que este microbioma não é espécie-específica em uma dada infecção, ou seja, as mesmas taxa tendem a ser identificadas em toda infecção dos SCR, embora em diferentes abundâncias. No geral, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, e *Fusobacteria* são os filos mais abundantes detectados nas infecções endodônticas (MANOIL *et al.*,

2020). Em mais baixos níveis taxonômicos, são frequentemente confirmados os gêneros *Fusobacterium*, *Pseudoramibacter*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, ou *Ralstonia* (GOMES *et al.*, 2015; OZOK *et al.*, 2012; PERSON *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Recentemente, de BRITO *et al.* (2020), utilizaram o MiSeq sequencing (Illumina) para explorar o microbioma da porção apical de infecções endodônticas. As Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) encontradas foram atribuídas a 10 filos bacterianos, liderados por *Bacteroidetes* (51,2%) e *Firmicutes* (27,1%). Posteriormente, combinou-se a análise microbiana realizada pelo MiSeq, com o HOMINGS, que utiliza uma rápida e eficiente NGS, com um refinamento na identificação bacteriana no nível de espécie baseado nas comparações do rDNA 16S. No geral, os gêneros mais prevalentes foram *Prevotella* (17,9%) e *Bacteroidaceae G-1* (14,3%). Por sua vez, as mais numerosas espécies/filotipos foram *Bacteroidaceae [G-1] sp ot 272*, *P. micra*, *P. oris*, *P. endodontalis*, e *Bacteroidetes [G-5] sp ot 511*. Este estudo demonstrou a complexidade do microbioma dos SCR e os “denominadores comuns” das infecções dos canais radiculares, identificando taxa cuja virulência deve ser futuramente explorada.

2.2 Imunologia das infecções endodônticas

A inflamação que ocorre nos tecidos perirradiculares é uma continuidade da inflamação pulpar que muitas vezes se desenvolve antes mesmo da necrose total da polpa (GALLER *et al.*, 2021). Uma resposta imune inata se inicia tão logo a invasão microbiana atinge os tecidos, levando a um aumento da permeabilidade vascular e, por conseguinte, um grande influxo de células de defesa nos tecidos circunvizinhos. Dentre estas, encontram-se os linfócitos TCD4+ e TCD8+, macrófagos CD64, células plasmáticas, mastócitos, eosinófilos que, a partir da interação com os microrganismos presentes nos sistemas de canais radiculares (SCR), procuram conter e impedir a disseminação da infecção para outros sítios. Tal resposta imuno-inflamatória levará ao desencadeamento de alterações nos tecidos perirradiculares (BRITO *et al.*, 2012; LY *et al.*, 2021; MÁRTON *et al.*, 2014; STASHENKO, 1990; VIRTEJ *et al.*, 2013).

A resposta imune que aí se processa, além do recrutamento de células inflamatórias, leva a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e

imunorregulatórias. Os linfócitos TCD4⁺ têm um papel importante neste processo (STASHENKO, 1990). Sabe-se hoje que os Linfócitos T *helper* (Th) ativados se subdividem em subgrupos Th1, Th2, Th17 e Treg que se caracterizam principalmente pelo perfil de citocinas produzidas e seus efeitos sobre o organismo (MCGEACHY & CUA, 2008). A resposta imune do tipo 1 (Th1) caracteriza-se principalmente pela produção de TNF- α , IFN- γ e interleucina (IL)-1 β . Esta resposta ativará os osteoblastos a produzirem RANK que induzirá a diferenciação e ativação dos pré-osteoclastos, por meio do ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), levando pois, à reabsorção óssea periapical (BRAGA DINIZ *et al.*, 2019; FUKADA *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2020).

A resposta celular do tipo 2 (Th2) produz as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que estão relacionadas aos processos de cura e reparo da área afetada (TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010). Esses dois subgrupos, Th1 e Th2, apresentam regulação cruzada, através de liberação de citocinas antagônicas entre si. Ou seja, as células Th1 inibem a resposta Th2 pela produção de IFN- γ e IL-12, enquanto as células Th2 inibem a geração de uma resposta Th1 produzindo citocinas como a IL-4 e IL-10 (MOSMMAM & COFFMAN, 1989).

Os linfócitos T reguladores (Treg) atuam como agentes imunossupressores e reestabelecem o equilíbrio entre a progressão da infecção e a resposta imunológica do hospedeiro restringindo uma reação inflamatória mais intensa e danosa ao próprio organismo (YANG *et al.*, 2014).

Células Th17 são caracterizadas por expressarem a IL-17 e IL-22 e estão relacionadas à exacerbação de processos inflamatórios em lesões periradiculares, através da indução de secreção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-8, TNF- α , IL-1, e IL-6 que promovem rapidamente o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, sendo consideradas pontes entre a resposta adaptativa e a inata (YU & GAFFEN, 2008). Ademais, estimulam a produção de outras citocinas pró-inflamatórias que atuam na progressão de lesões periapicais (BRITO *et al.*, 2012b; COLIC *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2020).

As quimiocinas participam do processo inflamatório ao promoverem a ativação de selectinas que, por sua vez, estão envolvidas na adesão de células às paredes endoteliais. Sua expressão, localizada nos tecidos, gera gradientes quimiotáticos que são responsáveis pela migração guiada e a manutenção de células inflamatórias nesses locais (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021; CAIRES *et al.* 2019; SILVA *et al.*, 2005).

Apresentam ainda atividades em uma série de processos biológicos como homeostase, angiogênese, e ativação e regulação imunológica (BRYANT & SLADE 2015). A proteína quimiotática de monócitos, CCL2/MCP-1, e CCL-5 estão associadas a quimiotaxia e diferenciação de osteoclastos, enquanto medeiam o recrutamento de monócitos para sítios inflamatórios ósseos (MARÇAL *et al.*, 2010; SETTE-DIAS *et al.*, 2016). A quimiocina CXCR4 atua na agregação de linfócitos e como um modulador anti-inflamatório devido a presença do ligante ubiquitina que é uma proteína conservada encontrada nas células eucariotas que desempenha uma função importante na regulação de proteínas (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021).

A resposta imuno-inflamatória que ocorre nos tecidos perirradiculares adjacentes a um dente portador de infecção leva a formação de granulomas ou cistos. Os linfócitos T CD4+, LT CD8+, neutrófilos, macrófagos, mastócitos e eosinófilos são as principais células presentes nestes sítios e, juntos, formam um intenso infiltrado inflamatório circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo (BRITO *et al.*, 2012b; BRITO *et al.*, 2015; NEVILLE *et al.*, 2004). Os macrófagos residentes, importantes células apresentadoras de antígeno (APC's), têm um papel relevante na fagocitose de patógenos na região perirradicular, bem como nos processos reparativos pós-terapia (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2010; REZENDE *et al.*, 2008). Uma das formas de mensurar a presença dessas células neste sítio é a quantificação da expressão de marcadores celulares específicos, tais como o CD64. Quando sua expressão se encontra aumentada em determinado sítio, se associa à presença de macrófagos M1 com característica pró-inflamatórias, sendo um marcador útil na análise de infecções bacterianas agudas. Apresentando-se expressão diminuída, indica-se uma maior presença de macrófagos M2, envolvidos em processos anti-inflamatórios no reparo tecidual (CARESTIA *et al.*, 2019; MARTINEZ & GORDON, 2014; ZHANG *et al.*, 2016).

A intervenção endodôntica, por meio dos procedimentos de limpeza e modelagem dos SCR, promove a diminuição drástica da carga bacteriana e possibilita a reparação da área afetada, uma vez que os canais radiculares infectados são inacessíveis às defesas do hospedeiro e/ou à ação de antibióticos sistêmicos (BAMBIRRA *et al.*, 2015; ESPALADORI *et al.*, 2021; FABRICIUS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2017). Nesse processo, os fibroblastos têm grande importância, sendo células responsáveis pela produção de colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que são os principais componentes da matriz extracelular. Os fibroblastos são tipos celulares de difícil identificação devido a sua heterogeneidade.

Contudo, a proteína específica para fibroblasto (FSP1) foi identificada como um gene expresso em fibroblastos mas não em células epiteliais (STRUTZ *et al.*, 1995). FSP1 é também conhecida como S100A4 e pertence a superfamília S100 de proteínas ligadas ao cálcio citoplasmáticas. FSP1/ S100A4 é expressa em fibroblastos em diferentes órgãos sob reparo tecidual (LAWSON *et al.*, 2005; SCHENEIDER *et al.*, 2007; STRUTZ *et al.*, 1995).

2.3 Integrinas

A organização tecidual e as funções fisiológicas dos órgãos e tecidos são desempenhadas fundamentalmente pela adesão celular (GUMBINER, 1996). As moléculas de adesão celular são proteínas expressas na superfície celular e participam das interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC). Atuam na sinalização entre o interior e o exterior da célula, no crescimento e proliferação, na organização espacial e migração celular. Desempenham papel de moléculas de adesão celular as integrinas, caderinas, selectinas, imunoglobulinas e outras, como o CD44, que é uma glicoproteína envolvida nas interações célula-célula. Atuam em processos biológicos normais e processos patológicos, como metástases, angiogênese, inflamação, migração celular, proliferação e diferenciação celular, epitelialização, deposição e remodelação de matriz extracelular (FERRAZ & FERNANDEZ, 2014; GARLET *et al.*, 2012).

O termo integrina foi inicialmente utilizado devido a seu papel em processos celulares mediados através de interações célula-célula, célula-matriz extracelular e célula-patógeno, por meio de ligações a ligantes distintos ou a combinação de ligantes (SOO-HYUN *et al.*, 2011; SPRINGER & WANG, 2004). As integrinas são glicoproteínas que atuam como mediadores no processo inflamatório, exercendo importante papel na adesão leucocitária, na quimiotaxia, fagocitose, na adesão endotelial e agregação celular (CANALLI *et al.*, 2004). Como proteínas sinalizadoras possuem receptores primários capazes de realizar a transdução de mensagens por vias de sinalização clássica, atuando na modulação do comportamento celular (JONES & WALKER, 1999; MITROULIS *et al.*, 2015). Em células mielomonocíticas as interações adesivas mediadas pela integrinas regulam diferentes respostas celulares,

como a transmigração para os locais inflamados, secreção de citocinas, degranulação e fagocitose (BAMBIRRA *et al.*, 2015).

A classificação das integrinas é feita de acordo com a subunidade β comum. Sua afinidade se dá pelo ligante na matriz extracelular que é conferida pela cadeia α (DONG *et al.*, 2016) o que determina a formação de diferentes proteínas com diferentes especificidades e, conseqüentemente, com diferentes atividades biológicas (PLOW *et al.*, 2000; UOTILA *et al.*, 2014). Atualmente, em humanos, são conhecidos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (BRUCE *et al.*, 2002; KIYOSHI *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2022).

A matriz extracelular é constituída por diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e várias glicoproteínas como a laminina e fibronectina, que atuam de forma a preencher os espaços intercelulares (HAUBNER *et al.*, 1997). As integrinas $\alpha 1$ (ITGA1), $\alpha 2$ (ITGA2), $\alpha 5$ (ITGA5) são consideradas as principais integrinas que se ligam ao colágeno, laminina e fibronectina, muito presentes no ambiente perirradicular e também em lesões perirradiculares (DELZANGLES *et al.*, 1997), atuando não apenas como receptores para essas proteínas, mas também participando na modulação da migração celular, organização do citoesqueleto e na produção de metaloproteinases (YU & GAFFEN, 2008).

As ITGA4 e ITGA5 desempenham importante papel na remodelação tecidual em lesões crônicas periapicais uma vez que, como moléculas adesivas, permitem a interação entre monócitos e a matriz extracelular (MEC) e, conseqüentemente, a migração de macrófagos presentes em granulomas perirradiculares inativos, controlando a migração de células Tregs (AUNG-HTUT *et al.*, 2019; CHAKRAVARTHY *et al.* 2017; GARLET *et al.*, 2012). BLEACHER *et al.* (1993), destacaram que de todas as células presentes na lesão perirradicular, os macrófagos têm merecido destaque na função fagocitária, desempenhando o papel de células apresentadoras de antígenos e secretando fatores de crescimento que estimularão o recrutamento de fibroblastos, proliferação e deposição de colágeno. Assim, desempenham papel fundamental na coordenação da reparação tecidual, onde ocorrem interações celulares entre a matriz extracelular e mediadores solúveis (BAMBIRRA *et al.*, 2015; KAWASHIMA *et al.*, 1996; STASHENKO *et al.*, 1998).

GLATIGNY *et al.* (2015) observaram em modelo animal de esclerose múltipla que mesmo com a supressão de ITGA4 em células que expressam Foxp3, altos níveis

de integrina α L (ITGAL) estavam associadas as células Treg. Sugeriram que existe algum mecanismo compensatório que permite a migração de células T, uma vez que as integrinas estão envolvidas no tráfico de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido extravascular, em locais de inflamação ativa ou até mesmo durante a vigilância imunológica (YONEKAWA & HARLAN, 2005). O contato inicial dos leucócitos com a superfície endotelial os prende e permite que quimiocinas ativem as integrinas de leucócitos, sinalização *inside-out*, de modo que as integrinas α L realizem a diapedese entre as junções endoteliais (FERRAZ & FERNANDEZ, 2014).

Os tecidos possuem a capacidade de restaurar sua estrutura original após a remoção do agente agressor por meio de processos reparativos regulados através de sinalizações e liberação de mediadores químicos. Essas sinalizações ocorrem entre célula-célula e célula-matriz com a participação de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que promoverão mitoses celulares e apoptoses, que visam o reparo dos tecidos afetados pela infecção (LIAPATAS *et al.*, 2003). O conhecimento desses processos de inter-relações celular e tecidual tem desvendado, cada vez mais, a patogênese e a cura das doenças endodônticas, podendo levar ao desenvolvimento de novos métodos para a prevenção, diagnósticos e tratamento da periodontite apical. Nesse contexto, este estudo procurou avaliar a expressão gênica apical de integrinas α 1, α 4, α 5, e α L, no fluido intersticial apical, adjacente a dentes necrosados e portadores de infecções, confrontando tais achados àqueles observados em dentes saudáveis hígidos, submetidos ao tratamento endodôntico, por meio da PCR em tempo real. Os efeitos da infecção bacteriana e fúngica sobre a expressão destes mediadores foi avaliada, antes e após a instituição da terapia endodôntica, longitudinalmente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 20426819.2.0000.5149), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS no. 466/12 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo A) e Termo de Constituição de Biorrepositório (TCB- Anexo B).

3.1 *Pacientes*

Para a caracterização da carga bacteriana e fúngica, e a resposta imune periapical, 22 pacientes foram atendidos nas Clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brasil) após serem encaminhados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os critérios de exclusão empregados foram a utilização de algum antibiótico e/ou anti-inflamatório pelo paciente nos três meses anteriores à terapia endodôntica, paciente com ausência de doença periodontal, dentes portadores de anatomias complexas e pacientes com alguma alteração sistêmica. Os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido juntamente com o Termo de Constituição de Biorrepositório.

3.2 *Coletas de amostras*

As amostras clínicas foram coletadas em dentes uni ou multirradiculares, neste sempre do mesmo canal, que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical (grupo experimental, n=11) e dentes apresentando vitalidade pulpar e tratados endodonticamente por fins protéticos (grupo controle, n=11). A condição pulpar foi determinada por análises clínicas, radiográficas, testes de sensibilidade pulpar e testes de percussão vertical e horizontal. Os dentes que foram submetidos ao

tratamento endodôntico tiveram as cavidades de acesso realizadas, sob isolamento absoluto com lençol de borracha posicionado, seguido de completa assepsia do campo operatório, como previamente descrito (BRITO *et al.*, 2012; HENRIQUES *et al.*, 2011). A seguir, coletou-se as amostras para análise microbiológica, utilizando-se cones de papel absorvente estéreis (#20), que, subsequentemente, foram acondicionados em eppendorf e armazenados a temperatura de -80°C (ESPALADORI *et al.*, 2021). Findada a coleta microbiológica, realizou-se os procedimentos de limpeza e formatação dos SCR, utilizando-se limas do sistema Protaper Next (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). O Comprimento de Trabalho (CT) foi determinado com localizador apical em seguida de Rx para confirmação da medida e como solução irrigadora foi utilizado hipoclorito de sódio a 2,5%. Ao final da instrumentação com lima X3 (30.07), realizou-se a primeira coleta para a análise imunológica, que correspondeu à resposta do hospedeiro à infecção recém eliminada dos SCR. Para tal, três cones de papel absorvente estéreis (#20) foram introduzidos passivamente no interior do canal radicular, perpassando dois mm além do ápice radicular, e deixados permanecer por 2 minutos, coletando-se o mRNA presente no fluido intersticial adjacente. Ao serem retirados, os cones absorventes tiveram os quatro mm da ponta cortados, inseridos em tubos de micro centrifuga e armazenados a -80°C (BRITO *et al.*, 2012). As demais coletas, tanto para a análise microbiológica quanto a imunológica, foram realizadas em dois outros momentos: 7 e 14 dias após a primeira coleta, conforme acima descrito. Em dentes com canais múltiplos, as coletadas subsequentes ocorreram sempre no mesmo canal radicular. Após as coletas, os dentes foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (Ultracal XS Optident, International), atuando como barreira física a fim de evitar a recontaminação dos SCR e foram restaurados, provisoriamente, com ionômero de vidro químico restaurador (Vidrion R, SS White, Gloucester, UK). Nas coletas subsequentes, os dentes foram isolados, abertos, removida a medicação intracanal, utilizando-se limas K e solução fisiológica como solução irrigadora, quando os canais foram secos e o fluido intersticial periapical coletado, como descrito anteriormente. Após a última coleta, os canais radiculares foram obturados pela técnica da condensação lateral da gutapercha, quando, então, os pacientes foram encaminhados às clínicas de reabilitação da unidade.

3.3 Extração de DNA genômico

As amostras foram processadas no Laboratório de Pesquisa em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). O DNA genômico (gDNA) foi extraído dos cones de papel absorventes utilizando reagente TRIzol (Invitrogen Corp.®, San Diego, Califórnia, EUA) conforme descrito anteriormente (CHOMCZYNSKI, P., 1993). As amostras foram diluídas a 8 µg/µL e armazenadas a -80°C até a análise molecular para se quantificar: citocinas, quimiocinas, integrinas, marcadores celulares de macrófagos e de fibroblastos e, a carga microbiana a partir do cDNA, bem como a abundância de *Cândida*, a partir do gDNA, por Real – time PCR.

3.4 Extração de mRNA

Para se extrair o RNA total, os tubos foram centrifugados em uma micro centrífuga contendo reagente TRIzol (Invitrogen Corp.®, San Diego, Califórnia, USA). Acrescentou-se clorofórmio à mistura e, posteriormente, a mesma foi centrifugada em 12.000 x g a 4 °C, por 15 minutos; em seguida, a fase aquosa foi coletada e o RNA permaneceu precipitado pelo isopropanol. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 x g, a 4 °C, por 10 minutos. O precipitado de RNA foi lavado uma vez com etanol frio a 75%, seco e dissolvido em água, sem RNase, e incubado a 55° C, por 10 minutos. Para em seguida receber um tratamento com DNase (PROMEGA ®, Madison, WI USA). O RNA foi armazenado a -80°C (BRITO *et al.*, 2012).

3.5 Síntese do cDNA

DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se 1 micrograma de RNA através da reação de transcriptase reversa, como descrita por BARBOSA SILVA *et al.*, 2008).

3.6 Síntese do gDNA

Para avaliação da abundância de *Candida* foram utilizadas sequências ITS. Os primers de sequência foram validados e otimizados com cepas de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. Albicans* (ATCC 10231) (PIRES *et al.*,2015). As cepas foram fornecidas pelo Dr. Sérgio Avelino Mota Nobre do laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos da Unimontes em Minas Gerais, Brasil. O Power SYBR Green PCR Master Mix (Power SYBR™ Green PCR Master Mix - Applied Biosystems) contendo a enzima Taq DNA polimerase foi utilizado para realizar o teste molecular RT-qPCR, em duplicata, associado ao sistema de detecção de PCR em tempo real e o equipamento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems®), conforme descrito (Zhang *et al.*,2016). O gDNA foi inicialmente ativado pela DNA polimerase AmpliTaq a 95°C por dez minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C, por 30 segundos (desnaturação) e, 60°C por um minuto (anelamento e extensão). Em seguida, os amplicons foram submetidos a uma análise da curva de fusão aumentando gradualmente a temperatura de 65°C para 95°C, a 0,1°C/s. Dois primers pan-*Candida* foram usados como alvos: 8S-1F/5.8S-1R GCAAGTCATCAGCTTGCGTT, TCGGTTCTTCCATCGATGCGA e 5.8S-1F/28S-1R CAACGGATCTCTTGGTTCTC, CGGGTAGTCCTACCTGATTT. O *C. Albicans* ATCC 10231 foi utilizado como controle positivo interno da reação. Os valores médios de CT foram registrados e usados para comparar a abundância de *Candida* entre os grupos.

3.7 Real – time PCR

O PCR foi realizado sob condições padrões: período de espera a 95°C (10 minutos); uma fase de 40 ciclos, a 95°C (15 segundos) e, em seguida, a 60°C (1 minuto); uma fase de curva de fusão a 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto) e 95°C (15 segundos). Para análise quantitativa do PCR de integrina $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ e αL , a sequência de primers humanos foi designada usando-se software PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems, Foster City,CA), baseado nas sequências nucleotídicas disponíveis no *GenBank database*. O Real-time PCR foi realizado utilizando-se o QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems®). E Power SYBR–Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) para detectar e ampliar os primers obtidos. Os dados foram calculados e mensurados para cada paciente e os níveis de gliceraldeído 3-fosfato

desidrogenase endógena (GAPDH) foram utilizados como genes referentes. Todas as amostras foram duplamente realizadas em um volume de reação de 10µl com 1µl de cDNA. Um software de detecção de sequência, versão 2.4.1 (Applied Biosystems), foi utilizado para analisar os dados após a amplificação por meio do método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$. Nesse método, os dados obtidos são comparados entre grupos ou dentro dos grupos nas amostras da primeira (dia 0), da segunda (dia 7) e da terceira (dia 14) coletas. Os valores foram calculados como valor médio das duplicatas de cada amostra, e a expressão dos níveis de cada primer específico foi definida em proporção à expressão de GAPDH. As sequências de primers utilizados para a detecção dos achados micro e imunológicos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1- Sequência de Primers

Primers	Sequência 5' -3'	BP	MT (°C)
GAPDH	FW: CATCCCATCGGGTTCCCATAA RV: CCTTAGTTTTCCGTTGCTTAACGAC	96	80
16S	FW: TGCGGGACTTAACCCAACA RV: TGCAGCATGTGGTTTAATTCGA	49	60.1
ITS	FW:TCCGTAGGTGAACCTGCGG RV:TCCTCCGCTTATTGATATGC	variável	47
ITGA1	FW: GGGAAAGCTGCCAGTGAGATT RV: TCACATCCCAGACGGATTGC	75	60.11
ITGA4	FW: CTCTTGCTGAGCCCAGAGC RV: AGGGAAGAGGAGGGGAAGTC	307	60.45
ITGA5	FW: GGAGGTTTAGGAAGCGGCTC RV: TCCGCGTCTAAGTTGAAGCC	197	60.46
ITGAL	FW: AGGCACACCTCCCTCCC RV: TTGCTGGCAACCTAGACAGG	122	60.26
IL-1-β	FW: TGGCAGAAAGGGAACAGAA RV: ACAACAGGAAAGTCCAGGCTA	59	73
IL10	FW: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA RV: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	190	81
IL17	FW: CAATGACCTGGAATTACCCAA RV: TGAAGGCATGTGAAATCGAGA	70	70
IFN-γ	FW: CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA RV: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	90	80
TNF	FW: ATCTTCTCAAAATTCGAGTGACCA RV: TGGAGTAGACAAGGTACAACC	171	76
CCL2	FW: AAGACCATTGTGCCAAGGA RV: CGGAGTTTGGGTTTGCTTGT	93	80
CXCR4	FW: TGT TGG CTG AAA AGG TGG TC RV: AAA GATGTC GGG AAT AGT C	71	80
S100A4	FW: TTTCTTGGTTTGATCCTGACT RV: CAGCAGGTAGCAAAGTGAC	118	55
CD64	FW: CTT CTC CTT CTA TGT GGG CAG T	92	60

	RV: GCT ACC TCG CAC CAG TAT GAT		
CCL5	FW: CGT GCC CAC ATC AAG GAG TA RV: CAC ACA CTT GGC GGT TCT TTC	80	91

Fonte: Software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA).

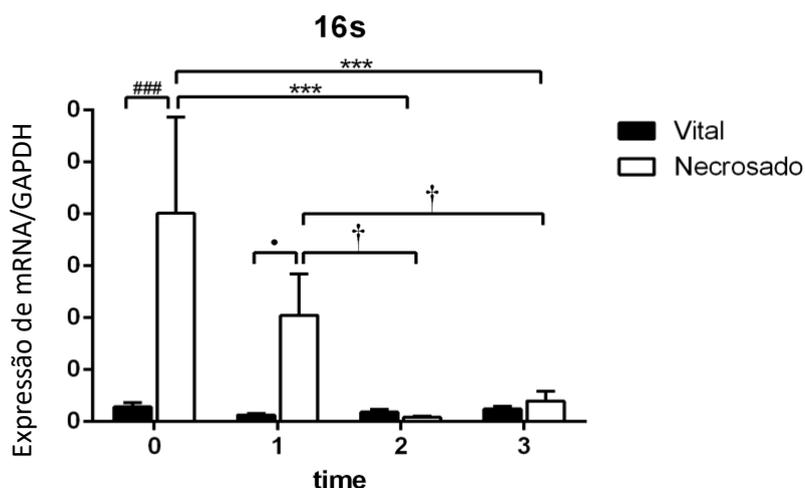
3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism software (version 6.0®, San Diego, California, USA), com 95% ($p < 0,05$) de confiança. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão médio (SEM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk. A diferença entre os grupos ao longo do tempo foi estimada com *Two-way* ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Como análise complementar foi realizado o Test *t* não pareado. Já para verificar as mudanças nos níveis de expressões do mRNA de ambos os grupos, utilizou-se *Two-way* RM ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Ainda, como teste complementar, foi realizado o test *t* pareado.

4. RESULTADOS

A Figura 1 demonstra que os níveis da expressão gênica do rRNA 16S microbiano no grupo controle (vital) e experimental (necrosado), nos quatro tempos avaliados. Observa-se diferença significativa entre ambos os grupos nos tempos T0 e T1 ($p < 0.05$). Por outro lado, na análise intra-grupo, não se observa diferença estatística entre os tempos T0 e T1, mas sim entre T0 e T2/T3 e entre T1 e T2/T3, no grupo experimental (necrosado) ($p < 0.05$). Tais achados confirmam a presença de uma elevada carga bacteriana nos sistemas de canais radiculares do grupo experimental, antes da instituição da terapia endodôntica, e a não recolonização microbiana durante todos os períodos experimentais, em ambos os grupos.

Figura 1 - A expressão gênica de mRNA ribossômico 16S procariótico



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno antes dos procedimentos de limpeza e modelagem (T0) e após os procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias após (T3); as barras representam o erro padrão, * $p < 0,05$, pelos dois testes Two-way RM ANOVA *** $p < 0,001$, Test t pareado † $p < 0,05$ e Test t não pareado • $p < 0,05$.

No que diz respeito a expressão gênica do ITS gDNA, que permitiu avaliar a abundância de *Candida*, os dados foram insipientes. No grupo controle (vital), duas amostras testaram positivo no momento inicial da coleta (T0) e, em uma delas também no tempo T2 (7 dias após). Outra amostra que testou positivo no tempo T1, também o foi no tempo T3. Quanto às amostras do grupo experimental (necrosado), apenas uma positivou para a expressão do gDNA ITS imediatamente após a instrumentação

(T1) e, outras duas amostras diversas, no tempo (T2). Em outra amostra distinta, o ITS gDNA foi expresso no tempo T3 (TABELA 2).

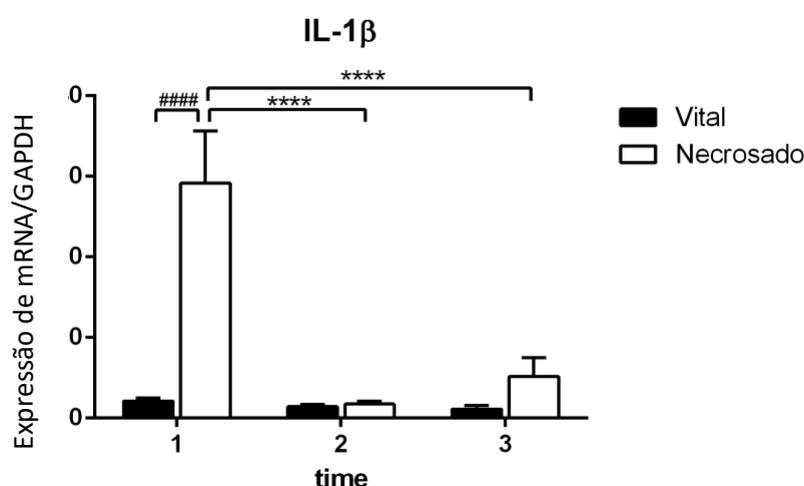
TABELA 2. Expressão gênica - gDna (*Gênero Cândida*)

Amostras	Tempos			
1	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
2	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
3	T0 (+)	T1 (-)	T2 (+)	T3 (-)
4	T0 (-)	T1 (+)	T2 (-)	T3 (+)
5	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
6	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
7	T0 (+)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
8	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
9	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
10	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
11	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
12	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
13	T0 (-)	T1 (-)	T2 (+)	T3 (-)
14	T0 (-)	T1 (+)	T2 (-)	T3 (-)
15	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
16	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
17	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
18	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
19	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
20	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (-)
21	T0 (-)	T1 (-)	T2 (+)	T3 (-)
22	T0 (-)	T1 (-)	T2 (-)	T3 (+)

(+/-) Expressão detectada ou não de gDNA do fragmento 28Sr/58Sf de ITS nos tempos T0, T2, T2 e T3, (antes e imediatamente após os procedimentos de limpeza e modelagem e, nos 7 e 14 dias subsequentes, respectivamente). Os níveis de gDNA foram determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação com o nível de GAPDH endógeno. (■) Controle; (□) Experimental

Observou-se diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de IL-1 β no grupo experimental (necrosado), no tempo T1, em relação aos tempos T2 e T3. O grupo controle apresentou expressão basal em todos os tempos avaliados. Na análise intergrupos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o T1 (grupo experimental) e os tempos T1, T2 e T3 (grupo controle). Vê-se, pois, que a expressão desta citocina foi significativamente maior no período pós instrumentação no grupo experimental (T1) que nos demais tempos ($p < 0.05$), em ambos os grupos (Fig 2).

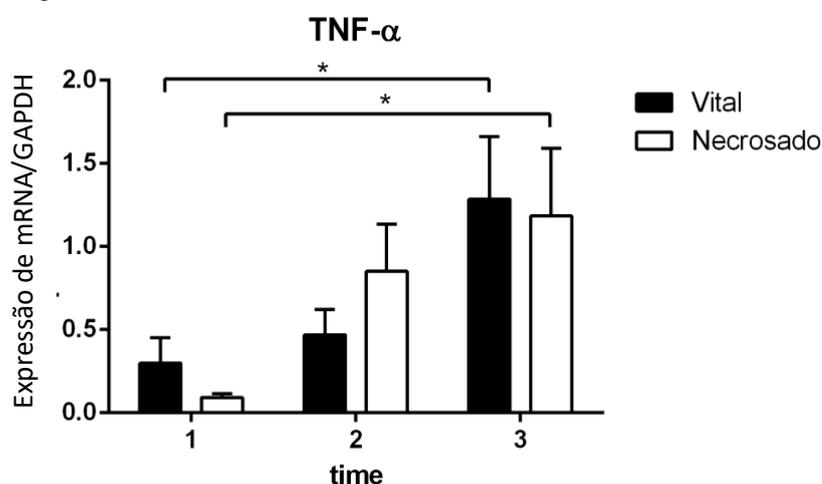
Figura 2 - Expressão gênica de mRNA de IL-1 β



Fonte: Os níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, por dois testes: Two-way ANOVA ##### $p < 0,0001$ e Two-way RM ANOVA **** $p < 0,0001$.

Interessantemente, a expressão gênica do mRNA de TNF- α foi significativamente maior no tempo T3, em ambos os grupos, experimental e controle, quando comparado ao tempo T1, nos mesmos grupos ($p < 0.05$) (Fig. 3).

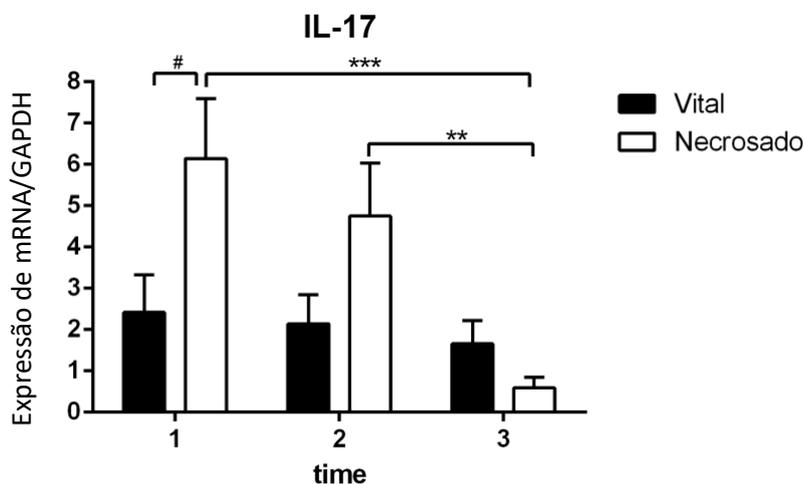
Figura 3 - Expressão gênica de mRNA de TNF- α



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, pelo teste Two-way RM ANOVA * $p < 0,05$.

Por sua vez, os níveis de expressão do mRNA da IL-17 foram maiores significativamente nos tempos T1 e T2 do grupo experimental em relação ao tempo T3 do mesmo grupo ($p < 0.05$). O grupo controle apresentou expressão basal nos três tempos avaliados (Fig. 4).

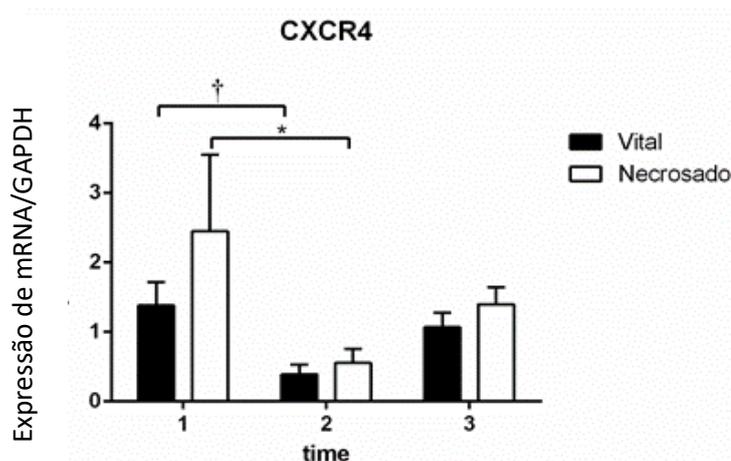
Figura 4 - Expressão gênica de mRNA de IL-17A



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, pelos testes Two-way RM ANOVA * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, e Two-way ANOVA # $p < 0,05$.

A expressão gênica de CXCR4 encontra-se na fig. 5. Observa-se a expressão desta quimiocina no grupo controle (vital) em todos os tempos avaliados, sem, contudo, apresentar diferença estatisticamente significativa. Por sua vez, no grupo experimental (necrosado), observa-se redução significativa dos níveis de sua expressão, do tempo T1 para o T2 ($p < 0.05$). Vê-se, pois, que a terapia endodôntica promove a redução da expressão gênica desta quimiocina.

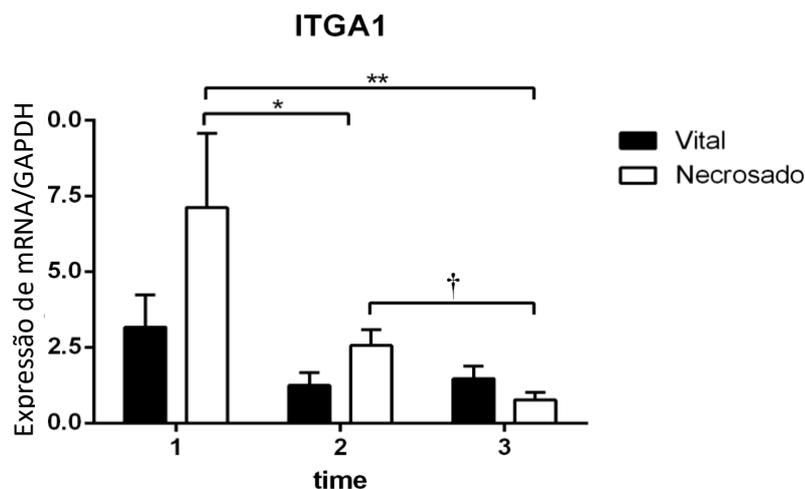
Figura 5 - Expressão gênica de mRNA de CXCR4



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, pelo Test t pareado † $p < 0,05$ e Two-way ANOVA * $p < 0,05$.

A fig. 6 demonstra a expressão gênica de ITGA-1. Observa-se uma expressão basal desta integrina no grupo controle (vital) em todos os tempos avaliados. Por sua vez, no grupo experimental (necrosado), os níveis de expressão foram significativamente maiores no tempo T1 que T2/T3 e, também, maior no tempo T2 que no T3 ($p < 0.05$). Vê-se, pois, que a terapia instituída promove a redução da expressão desta integrina de maneira tempo dependente.

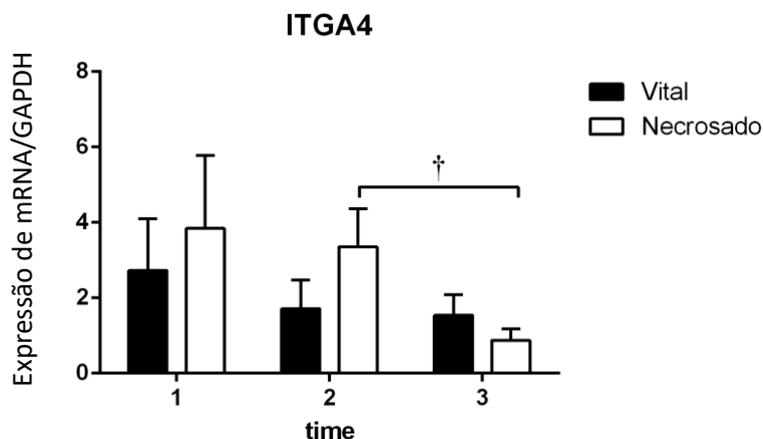
Figura 6 - Expressão gênica de mRNA de ITGA1



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, pelos testes Two-way RM ANOVA * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, e Test t pareado † $p < 0,05$.

Os níveis de expressão gênica de ITGA4 estão demonstrados na Figura 7. Observa-se, no grupo experimental, uma redução significativa de sua expressão entre os tempos T2 e T3, sem alteração nos níveis basais de sua expressão no grupo controle.

Figura 7 - Expressão gênica de mRNA de ITGA4

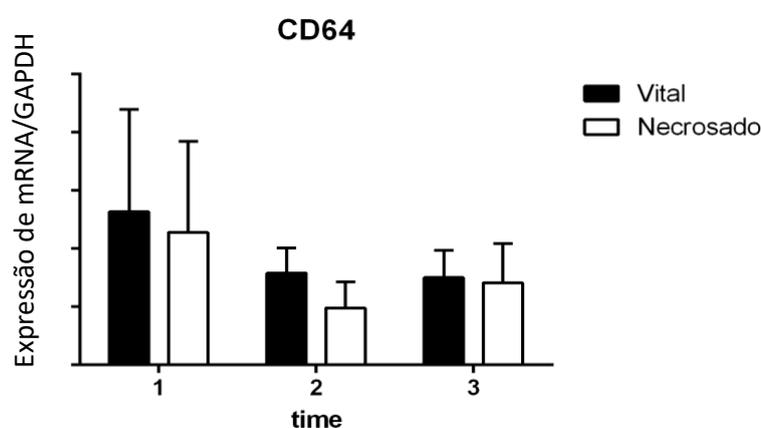


Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, pelo teste Test t pareado † ($p < 0,05$).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre tempos intergrupos e ou entre os grupos durante a análise da expressão gênica das citocinas IFN- γ , IL-10, CCL-2 e CCL-5, e das integrinas ITGA-5 e ITGA-L ($p > 0.05$) (dados não mostrados).

Finalmente, avaliou-se a expressão dos marcadores celulares de macrófagos (CD64) e de fibroblastos (S100A4), como demonstrado nas figuras 7 e 8, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada quanto a expressão de CD64, nos tempos avaliados, nos dois diferentes grupos ($p > 0.05$) (Fig. 8).

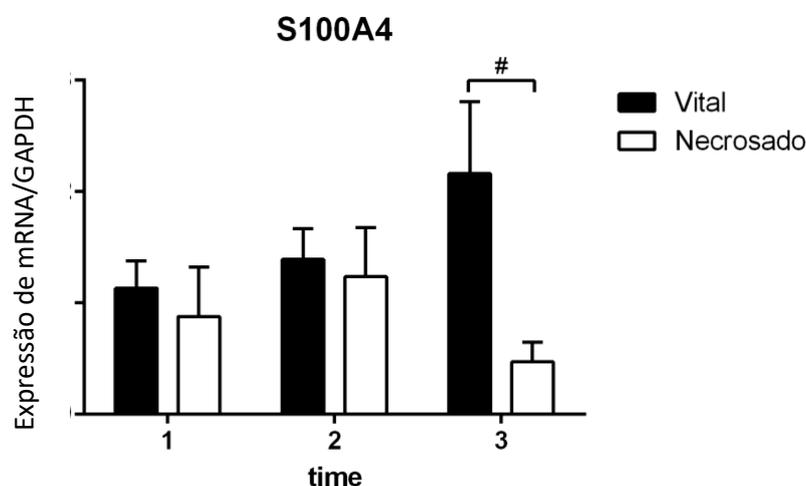
Figura 8 - Expressão gênica de mRNA de CD64



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação ao nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão.

Por outro lado, os níveis de expressão gênica de mRNA de S100A4 foram significativamente maiores no grupo controle, no tempo T3, que aqueles determinados no mesmo tempo, no grupo experimental ($p < 0.05$) (Fig. 9).

Figura 9 - Expressão gênica de mRNA de S100A4



Fonte: Níveis de mRNA determinados por PCR em tempo real e quantificados em comparação com o nível de mRNA do GAPDH endógeno após procedimentos de limpeza e modelagem (T1), 7 (T2) e 14 dias depois (T3). As barras representam o erro padrão, # $p < 0,05$, pelo Two-way ANOVA *.

4.1 Discussão

A infecção microbiana que se instala no interior do SCR possui correlação direta com o desenvolvimento de alterações perirradiculares (BRITO *et al.*, 2020; HENRIQUES *et al.*, 2016). Os procedimentos de limpeza e modelagem diminuem drasticamente a carga bacteriana do canal radicular que, posteriormente, promoverá a iniciação da cicatrização dos tecidos que envolvem o ápice radicular (BRAGA DINIZ *et al.*, 2019; ESPALADORI *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Neste estudo, o nível de expressão gênica do fragmento 16S, uma porção conservada do genoma bacteriano, foi avaliado após a abertura coronária (T0), após a desinfecção e formatação do SCR (T1), e nos 7 (T2) e 14 (T3) dias seguintes. Os níveis de expressão de mRNA do fragmento 16S diminuíram no dia 7, após os procedimentos de limpeza e modelagem, mostrando uma redução microbiana significativa (Fig. 1), como previamente evidenciado (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021; ESPALADORI *et al.*, 2021). Ademais, estes resultados corroboram com aqueles observados de que a terapia endodôntica é efetiva em reduzir a carga microbiana intracanal (BAMBIRRA *et al.*, 2015; ESPALADORI *et al.*, 2021; FABRICIUS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2017). Os resultados demonstram ainda que não houve a ocorrência de recontaminação microbiana dos canais radiculares ao longo do percurso experimental. Isto provavelmente se deve à efetividade da barreira física de hidróxido de cálcio mantido no interior dos SCR durante as inter-consultas, como previamente asseverado (ESPALADORI *et al.*, 2021; TAVARES *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2013).

Diante da evidência literária da importância de espécies do Gênero *Cândida* nas infecções endodônticas (RICCUCI & SIQUEIRA, 2010; WALTIMO *et al.* 2004) avaliou-se a abundância de *Candida* utilizando-se sequências genicas de ITS, otimizadas de cepas de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. Albicans* (PIRES *et al.*, 2015). A literatura tem demonstrado a participação do gênero *Cândida* em casos esparsos, sugerindo seu envolvimento na persistência de algumas infecções (BERNAL-TREVIÑO *et al.*, 2018; PERSONN *et al.*, 2017). Neste estudo, detectou-se de maneira insipiente a presença de *Candida* na amostra analisada. Duas amostras do grupo controle positivaram para a presença de *Cândida* apenas no tempo inicial (T0), devendo este achado estar relacionado a uma contaminação durante os procedimentos de coleta. Outra amostra do grupo controle, distinta das duas

primeiras, positivou-se tanto no tempo T1 quanto no T3. No grupo experimental, os achados da abundância de *Candida* foram esparsos, com apenas três amostras positivando após os procedimentos de limpeza e formatação. Tais achados, talvez se devam à capacidade da levedura de se evadir dos efeitos da terapia endodôntica, como demonstrado previamente (ALBERTI *et al.*, 2021; LANA *et al.*, 2001; MERGONI *et al.*, 2018). A participação de infecções fúngicas nas alterações endodônticas permanece, pois, como objeto de debate, mas este estudo vem contribuir com esta discussão.

Tendo definido a carga bacteriana e a abundância de *Candida* nas amostras analisadas, e sabendo-se que o microbioma presente nos SCR infectados, composto por multi-espécies, atua como uma unidade para levar à ocorrência da periodontite apical, este estudo analisou a expressão gênica de mediadores aí envolvidos. Como amplamente demonstrado, uma resposta pró-inflamatória prevalece na presença de micróbios intracanalais (RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, 2002; RICUCCI & SPANGBERG, 2009; SAKKO *et al.*, 2016). Neste estudo, a citocina IL-1 β apresentou níveis de expressão elevados no tempo T1, nos dentes portadores de infecção, reduzindo significativamente após os procedimentos de limpeza e formatação. Similarmente, IL-17 demonstrou altos níveis de expressão nas mesmas condições, nos tempos iniciais (T1 e T2), reduzindo tardiamente após a instituição da terapia. Em ambas as análises, os grupos controles apresentaram níveis basais de expressão, para ambos os mediadores. O envolvimento da IL-1 β com os processos pró-inflamatórios e reabsortivos perirradiculares, e da IL-17 nesses sítios, é corroborado por vários estudos (FERREIRA *et al.*, 2015; GATTI *et al.*, 2000; STASHENKO *et al.*, 2007; XIONG *et al.*, 2019). Estes resultados, tomados em conjunto, reforçam a correlação entre a infecção e uma resposta pró-inflamatória e, ao mesmo tempo, a efetividade dos procedimentos operatórios que promovem a sanificação dos SCR na redução de tal resposta (BRAGA DINIZ *et al.*, 2019; BRITO *et al.*, 2012b; COLIC *et al.*, 2009; FUKADA *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2020)

TNF- α é comumente conhecida como uma citocina pró-inflamatória, mas tem sido demonstrado que possui efeitos pleiotrópicos sobre vários modelos celulares (JANG *et al.*, 2021). Em estudos utilizando metodologia similar à aqui avaliada, não se observou efeitos da terapia endodôntica sobre sua expressão (BRITO *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2012), enquanto outros demonstram um aumento significativo em sua expressão após a limpeza e a formatação dos SCR (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021;

ESPALADORI *et al.*, 2021). Os resultados deste estudo, por sua vez, estão de acordo com os resultados dos dois últimos, demonstrando uma expressão gênica do mRNA de TNF- α significativamente maior no tempo T3, em ambos os grupos, experimental e controle. Apesar de parecer contraditório esta expressão tardia aumentada, em contraposição à expressão reduzida de IL-1 β e IL-17 nos tempos T3, o papel do TNF- α nas doenças não foi ainda totalmente esclarecido. Demonstrou-se, previamente, que patógenos endodônticos são capazes de utilizar o Receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral (TNFR2) como via de indução de apoptose de linfócitos, permitindo aos microrganismos inibir a resposta imune periapical via indução do aumento da expressão de TNF- α (RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, 2005). De acordo, também foi demonstrado que a associação intracanal (hidróxido de cálcio/selênio) pode promover um aumento da expressão de TNF- α estimulando o *cleareance* periapical após a terapia endodôntica (ESPALADORI *et al.*, 2021). Como se observa, o papel do TNF- α nas respostas perirradiculares é também uma questão passível de discussão.

Por outro lado, não se contemplou nenhuma diferença significativa quanto a expressão gênica das citocinas e quimiocinas IFN- γ , IL-10, CCL-2 e CCL-5, entre os tempos avaliados intergrupos e ou entre os grupos. Diferentemente, uma redução na expressão de IFN- γ após 7 dias da limpeza e formatação dos SCR e um aumento na expressão de IL-10, demonstrando uma regulação cruzada entre os grupos de linfócitos Th, foi previamente relatado (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2012).

O CXCR-4 é um receptor específico para CXCL12, com potente atividade quimiotática para linfócitos, além de ser um co-receptor que o HIV pode utilizar para infectar as células T CD4⁺. O CXCR4 é um ligante natural para a ubiquinina (BERNHAGEN *et al.*, 2007) que, em inúmeros modelos animais, tem sido demonstrado ser um modulador imune anti-inflamatório (MAJETSCHAK, 2011). Neste estudo, após os procedimentos de limpeza e formatação ocorreu um significativo decréscimo na expressão gênica desta quimiocina, diferentemente do que fora previamente demonstrado (BRAGA DINIZ *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2015; ESPALADORI *et al.*, 2021).

As integrinas atuam na sinalização entre o interior e o exterior da célula, participando da organização tecidual e das funções fisiológicas dos órgãos e tecidos (GUMBINER, 1996). ITGA1, ITGA4, ITGA5 e ITGAL são glicoproteínas que possuem afinidade com um ligante, sendo que a ITGA1 interage com o colágeno e a laminina presentes no ambiente e em lesões perirradiculares (DELZANGLES *et al.*, 1997). O

ITGA4 e a ITGAL se ligam aos leucócitos, enquanto o ITGA5 atua diretamente na remodelação tecidual em lesões crônicas periapicais (SLACK *et al.*, 2022). Neste estudo, avaliou-se os efeitos da infecção e de sua eliminação dos SCR, longitudinalmente, sobre a expressão dessas integrinas. As expressões gênicas de ITGA1 e ITGA4, no grupo experimental, reduziram significativamente de maneira tempo dependente. A expressão reduzida de ITGA4, em paralelo com o decréscimo da expressão de CXCR-4, após a redução da carga microbiana intracanal se justifica, uma vez que se espera uma migração diminuída de leucócitos para os sítios periapicais. Ademais, durante a persistência da infecção endodôntica, é de suma importância a retenção de células funcionais do sistema imune nos tecidos perirradiculares promovida pela ITGA1 (GARDNER, 2014), que também deve sofrer alteração após eliminação da infecção. Do exposto, vê-se uma íntima relação entre dinâmica da expressão longitudinal das citocinas pró-inflamatórias e a das integrinas ITGA1 e ITGA4 durante os processos da terapia endodôntica avaliados no presente estudo.

Após a instituição do tratamento endodôntico, espera-se que se inicie um processo de cicatrização nos tecidos perirradiculares adjacentes (FERREIRA *et al.*, 2015; GARLET *et al.*, 2012; RAJARAJAN *et al.*, 2012; SETTE-DIAS *et al.*, 2016). Tal processo é caracterizado pela formação de tecido conjuntivo no sítio da lesão e a infiltração de fibroblastos. O processo de cicatrização começa com a inflamação, que é resolvida pelo *clearance* celular (CHILDS & MURTHY, 2017); sendo os macrófagos uma das células prevalentes nas alterações perirradiculares (MÁRTON & KISS, 2014), estes têm um papel relevante nessa atuação. Neste estudo, avaliou-se a expressão gênica do marcador celular específico de macrófago, o CD64, nas diferentes condições clínicas aqui estudadas, não se observando alteração significativa em sua expressão. Ou seja, nem a presença ou a ausência de infecção, ou mesmo as mudanças na expressão de mediadores inflamatórios, correlacionou-se a alterações em sua expressão. Macrófagos residentes, que se diferenciam dos monócitos, migram no tecido e têm papel importante na regulação imune e na liberação de fatores de crescimento que serão necessários para se iniciar a proliferação e migração de células do tecido conjuntivo (DAVIES *et al.*, 2013). Anteriormente, estudos haviam correlacionado a ação de macrófagos pró (M1) e anti-inflamatórios (M2) a sua maior ou menor expressão nos tecidos perirradiculares (CARESTIA *et al.*, 2019; MARTINEZ & GORDON, 2014; ZHANG *et al.*, 2016), o que não se confirmou no presente estudo.

Contudo, sua expressão encontra-se relevante ao longo de todo o período experimental, em ambos os grupos.

Os fibroblastos têm um papel crítico durante a cicatrização periodontal, sendo populações celulares necessárias à regeneração do tecido conjuntivo (SMITH *et al.*, 2019). A duração dos procedimentos de remodelagem tecidual varia e depende de vários fatores, iniciando-se aproximadamente 2 semanas após a remoção do agente causal, podendo levar até mais de anos para se completar (GURTNER *et al.*, 2008). Neste estudo, avaliou-se os níveis de expressão gênica de mRNA de S100A4, expresso em fibroblastos sob reparo tecidual (STRUTZ *et al.*, 1995), nas diferentes condições clínicas aqui avaliadas. Observou-se uma expressão significativamente aumentada de mRNA de S100A4 no grupo controle, especificamente no tempo T3. Estes resultados parecem demonstrar que a expressão destes marcadores é intimamente dependente da ausência de infecção intracanal, expressando-se significativamente nas amostras oriundas de dentes vitais. Tal achado, nos permitiu inferir que provavelmente os processos de cicatrização apical se antecipam em dentes que não apresentavam uma infecção endodôntica.

Outro fator relevante nos processos cicatriciais é que a reorganização da matriz tecidual depende de receptores. Assim, os fibroblastos aderem às fibras colágenas por meio de diferentes tipos de receptores de adesão, tais como as integrinas e outras proteínas de adesão (SEGAL *et al.*, 2001; STAUDINER *et al.*, 2013). Este estudo além de demonstrar a correlação entre a expressão de S100A4 e a ausência de infecção, demonstra que a terapia endodôntica, reduzindo a carga microbiana e a abundância de *Candida* e interferindo na expressão de ITGA1 e ITGA4, tem papel importante nesses fenômenos reparativos que acontecem após a terapia endodôntica.

Finalmente, este estudo, ao avaliar a participação e a identificação de novos alvos envolvidos na patogênese das alterações periapicais, contribuiu para o desenvolvimento futuro de planos de tratamento individualizados e procedimentos reparadores dos tecidos periapicais.

5.CONCLUSÕES

Pôde-se observar:

- a) Por meio da expressão gênica do rRNA 16S microbiano, uma elevada carga microbiana nos SCR infectados que foi reduzida após os procedimentos de limpeza e formatação. Viu-se também que não ocorreu a recolonização microbiana dos SCR durante todos os períodos experimentais, em ambos os grupos;
- b) A expressão gênica do ITS gDNA permitiu avaliar a abundância de *Candida*, nos SCR ao longo do período experimental e que sua presença foi insipiente nas amostras analisadas;
- c) As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-17 apresentaram níveis significativamente expressivos em resposta a infecção endodôntica, representada pelas amostras do grupo experimental;
- d) A expressão gênica do mRNA de TNF- α aumentou significativamente após a instituição da terapia endodôntica, em ambos os grupos;
- e) A expressão gênica do mRNA de CXCR4 reduziu significativamente no grupo experimental, do tempo T1 para o T2;
- f) As integrinas ITGA-1 e ITGA4 têm sua expressão gênica diminuída após a instituição da terapia endodôntica nos grupos experimentais, de maneira tempo dependente;
- g) A expressão dos marcadores celulares de macrófagos (CD64) não apresentou diferença significativa em ambos os grupos, nos diferentes tempos analisados.
- h) A expressão gênica de mRNA de S100A4 foi significativamente maior no grupo controle ao final do tempo analisado que aqueles observados no grupo experimental.

Conclui-se, que:

Existe uma correlação positiva entre a carga microbiana e a abundância de leveduras intracanal e a expressão de mediadores pró-inflamatórios; a instituição da terapia endodôntica reduz a expressão tanto de mediadores pró-inflamatórios quanto de integrinas expressas nos tecidos perirradiculares. Finalmente, que um aumento precoce da expressão de fibroblastos nos dentes vitais em relação aos infectados demonstra que o reparo tecidual pós-terapia deve ocorrer mais rapidamente nos sítios não infectados.

5.1 *Perspectivas futuras*

Como demonstrado na literatura, existe uma correlação direta entre a presença de uma infecção microbiana no interior dos SCR e o desenvolvimento de alterações perirradiculares (BRITO *et al.*, 2020; HENRIQUES *et al.*, 2016). Muitos estudos demonstraram a expressão de mediadores inflamatórios nesses tecidos em resposta à infecção que induz uma resposta imune do hospedeiro com o objetivo de evitar a disseminação dessa infecção endodôntica pelo forame periapical (DE BRITO *et al.*, 2012; HENRIQUES *et al.*, 2016; MAIA *et al.*, 2020). Os procedimentos de limpeza e modelagem diminuem drasticamente a carga bacteriana do canal radicular e sua patogenicidade e, posteriormente, inicia-se a fase de cicatrização nos tecidos que envolvem o ápice radicular (BRAGA *et al.*, 2019; ESPALADORI *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Esse processo envolve fases sobrepostas de inflamação, proliferação e remodelação, cada uma caracterizada por interações dinâmicas entre componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento e células (BAMBIRRA *et al.*, 2015; HOLLAND *et al.*, 2017).

Recentemente, após o desenvolvimento de uma metodologia que permitiu a dosagem de mediadores presentes nos tecidos perirradiculares de maneira não invasiva e longitudinal, passou-se a avaliar, em um mesmo paciente, a resposta a uma dada infecção e os efeitos da terapia endodôntica sobre tais mediadores (BRAGA *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2012; HENRIQUES *et al.*, 2011; MAIA *et al.*, 2020). Esta estratégia tem permitido a identificação de alvos que podem atuar na progressão das lesões periapicais e, por conseguinte, melhorar a compreensão de tais patologias.

De particular importância tem sido a identificação de novos patógenos nas infecções endodônticas após o surgimento de técnicas de biologia molecular (BAMBIRRA *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2015). Muitas espécies microbianas, que se acreditava não estarem presentes nessas infecções, são hoje detectadas e confirmadas como integrantes dessa microbiota (TENNERT *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado que a terapia endodôntica após instituída reduz a carga microbiana, mas não é capaz de eliminar todos os organismos ali presentes (PLOTINO *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2012). Muitos advogam a necessidade da utilização de medicações intracanal entre sessões de tratamento na busca por aumentar os índices de efetividade (ENGAR, 2020; ESPALADORI *et al.*, 2021). Alguns estudos, contudo, demonstram que, principalmente os fungos são capazes de evadir dos efeitos desta terapia podendo ser detectados numa taxa entre 7% a 18% de canais radiculares infectados (ALBERTI *et al.*, 2021; MERGONI *et al.*, 2018). Por sua vez, muitos outros estudiosos advogam a realização do tratamento em sessão única, sob o pretexto de que, após a limpeza e formatação, e subsequente obturação tridimensional dos SCR, a microbiota residual, enjaulada nos istmos e túbulos dentinários, na ausência de condições favoráveis à sua expansão, não será capaz de perpetuar seus efeitos sobre os tecidos periapicais adjacentes (DARBINYAN *et al.*, 2005, MOLANDER *et al.*, 2007, NUNES *et al.*, 2021).

Tendo em vista que as funções fisiológicas dos órgãos e tecidos são desempenhadas fundamentalmente pela adesão celular (GUMBINER, 1996), as integrinas atuam em processos fisiológicos e patológicos, tais como aqueles que ocorrem nos tecidos perirradiculares na presença de uma infecção dos SCR e, posteriormente, nas fases que sucedem aos procedimentos de limpeza e formatação, quando do início do processo de reparo. Ademais, as sinalizações entre célula-célula e célula-matriz, como aquelas promovidas pelas integrinas, interagem com a expressão de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que promovem mitoses celulares e apoptose durante a resposta inflamatória e reparo dos tecidos adjacentes ao sítio infeccioso (BAMBIRRA *et al.*, 2015; ZHANG & YELICK, 2021).

Este estudo demonstrou que ainda há lacunas no conhecimento quando se busca correlacionar a presença e ou ausência microbiana com a expressão das integrinas nos tecidos perirradiculares e sua relação com citocinas e quimiocinas ali presentes. Recentemente, demonstrou-se a inter-relação de integrina alfa2, proteína de choque térmico, citocinas pro-inflamatórias e imunorregulatórias em resposta à

infecção endodôntica (BAMBIRRA *et al.*, 2015). Observou-se níveis significativamente mais baixos de TNF- α , CCL5, CCL2 / MCP-1, IL-8, Quinase de Adesão Focal e Osteoprotegerina após os procedimentos de limpeza e formatação dos SCR, paralelamente à expressão significativamente maior da citocina reguladora IL-10. Aqueles achados trouxeram a necessidade de aprofundamento dos estudos na busca por compreender a interação dos mecanismos de adesão celular nas repostas imunoperirradiculares de dentes portadores de infecções endodônticas.

Apesar do aprofundamento no contexto aqui apresentado, este estudo deixa ainda muitas questões a serem respondidas. Contudo, trás luz à relação entre a presença e a ausência de um microbioma nos SCR, longitudinalmente, com a expressão de integrinas, citocinas e quimiocinas inflamatórias, além da expressão de células envolvidas no processo cicatricial, como os macrófagos e fibroblastos. Em síntese, demonstra que a terapia endodôntica é eficaz na eliminação dos patógenos que infectam os SCR, sejam de origem bacteriana ou fúngica, e que tal procedimento medeia sinalizações célula-célula e célula matriz, orquestrada por uma rede de citocinas e quimiocinas que têm sua expressão alterada no transcurso da terapia.

REFERÊNCIAS

ABUSREWIL S, ALSHANTA OA, ALBASHAIREH K, ALQAHTANI S, NILE CJ, SCOTT JA, MCLEAN W. Detection, treatment and prevention of endodontic biofilm infections: what's new in 2020? **Critical Reviews in Microbiology**, v.46, n. 2, p.194-212, Mar. 2020.

ALBERTI A, CORBELLA S, TASCHIERI S, FRANCETTI L, FAKHRUDDIN KS, SAMARANAYAKE LP. Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 16, n.7, e0255003, Jul. 2021.

AUNG-HTUT MT, COMERFORD I, JOHNSEN R, FOYLE K, FLETCHER S & WILTON SD. Reduction of integrin alpha 4 activity through splice modulating antisense oligonucleotides. **Scientific Reports**, vol. 9, n.1, p. 12994, Sep. 2019.

AVILA M, OJCIUS DM, YILMAZ O. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA and Cell Biology**, v. 28, n.8, p.05-11, Aug. 2009.

BAMBIRRA W JR, MACIEL KF, THEBIT MM, DE BRITO LC, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection. **Journal of Endodontics**, vol. 41, n.7, p. 1085-90, Jul. 2015.

BARBOSA SILVA MJ, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 105, n.5, e70-6, May.2008.

BAUMGARTNER JC, FALKLER WA JR. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **Journal of Endodontics**, v. 17, n. 8, p.380-3. Aug. 1991.

BERGENHOLTZ G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. **Odontologisk Revy**, v. 25, n.4, p.347-58, 1974.

BERNHAGEN J, KROHN R, LUE H, GREGORY JL, ZERNECKE A, KOENEN RR, DEWOR M, GEORGIEV I, SCHOBER A, LENG L, KOOISTRA T, FINGERLE-ROWSON G, GHEZZI P, KLEEMANN R, MCCOLL SR, BUCALA R, HICKEY MJ,

WEBER C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. **Nature Medicine**, v. 13, n.5, p.587-96, May. 2007.

BERNAL-TREVIÑO A, GONZÁLEZ-AMARO AM, MÉNDEZ GONZÁLEZ V, POZOS-GUILLEN A. Frequency of Candida in root canals of teeth with primary and persistent endodontic infections. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n.2, p.78-82, Apr-Jun.2018.

BLEACHER JC; ADOLPH VR; DILLON PW; KRUMMEL TM. Fetal tissue repair and wound healing. **Dermatologic Clinics**, v. 11, n.4, p. 677-83, Oct. 1993.

BRADLEY JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n.2, p.149-60, Jan. 2008.

BRAGA DINIZ JM, ESPALADORI, SOUZA E SILVA ME, BRITO LCN, VIEIRA LQ& RIBEIRO SOBRINHO AP. Immunological profile of teeth with inflammatory periapical disease from chronic liver disease patients. **International Endodontic Journal**, v. 52, n.2, p.149-157, Feb. 2019.

BRAGA DINIZ JM, ESPALADORI, SOUZA E SILVA ME, BRITO LCN, VIEIRA LQ& RIBEIRO SOBRINHO AP. Immunological profile of periapical endodontic infection in patients undergoing hematopoietic transplantation. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n.3, p.1403-1410, Mar. 2021.

BRITO LC, SOBRINHO AP, TELES RP, SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, VIEIRA LQ, TELES FR. Microbiologic profile of endodontic infections from HIV- and HIV+ patients using multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization. **Oral Diseases**, v. 18, n.6, p. 558-67, Feb. 2012.

BRITO LC, TELES FR, TELES RP, NOGUEIRA PM, VIEIRA LQ, RIBEIRO SOBRINHO AP Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 6, p. 533-41, Jun-2015.

BRITO LCN, DOOLITTLE-HALL J, LEE CT, BAMBIRRA WJ, TAVARES LF, RIBEIRO SOBRINHO AP & TELES FRF. The apical root canal system microbial communities determined by next-generation sequencing. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, p.10932, Jul. 2020.

BRITO LCN, TELES FR, TELES RP, FRANÇA EC, RIBEIRO-SOBRINHO AP, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. The use of multiple displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3039-49, Set. 2007.

BRUCE A, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. "**Integrins**". **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

BRYANT VL, SLADE CA. Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, n.4, p.364-71, Apr. 2015.

CAIRES NCM, ESPALADORI MC, TAVARES WLF, BRITO LCN, VIEIRA LQ, RIBEIRO SOBRINHO AP. Influence of genetic regulatory effects modified by environmental immune activation on periapical disease. **Brazilian Oral Research**, v.2, n.33, e109, Dec. 2019.

CANALLI AA, CONRAN N, FATTORI A, SAAD STO, COSTA FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle disease. **Experimental Hematology**, v. 32, n.8, p.728-34, Aug. 2004.

CARESTIA A, MENA HA, OLEXEN CM, ORTIZ WILCZYŃSKI JM, NEGROTTO S, ERRASTI AE, GÓMEZ RM, JENNE CN, CARRERA SILVA EA, SCHATTNER M. Platelets Promote Macrophage Polarization toward Pro-inflammatory Phenotype and Increase Survival of Septic Mice. **Cell Reports**, v. 28, n.4, p.896-908, Jul-2019.

CHAKRAVARTHY M, AUNG-HTUT MT, LE BT & VEEDU RN. Novel Chemically-modified DNzyme targeting Integrin alpha-4 RNA transcript as a potential molecule to reduce inflammation in multiple sclerosis. **Scientific Reports**, v. 7, p.1 1613, May. 2017.

CHILDS, DYLAN R, AND ANANTH S MURTHY. OVERVIEW OF WOUND HEALING AND MANAGEMENT. **The Surgical Clinics of North America**, v. 97, n.1, p.189-207, Feb-2017.

CHOMCZYNSKI P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n.3, p. 536-7, Sep-1993.

COLIC M, GAZIVODA D, VUCEVIC D, SASA V, RUDOLF R, LUKIC A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular Immunology**, v. 47, n.1, p.101-13, Nov.2009.

COSTALONGA M, HERZBERG MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunology Letters**, v. 162, n.2 PtA, p.22-38, Nov. 2014.

DARBINYAN M, BOGAERTS P, VAN NIEUWENHUYSEN JP. Endodontic treatment in one or several sessions? Review of the literature. **Revue Belge de Medecine Dentaire**, v. 60, n.4, p.337-44, 2005.

DAVIES L. C., JENKINS S. J., ALLEN J. E., TAYLOR P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n.10, p.986-95, Oct. 2013.

DE BRITO LC, TELES FR, TELES RP, TOTOLA AH, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP. T-Lymphocyte and Cytokine expression in human inflammatory Periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 38, n.4, p.481-5, Apr. 2012.

DE OLIVEIRA MENDES ST, DE BRITO LC, REZENDE TM, DE OLIVEIRA REIS R, CARDOSO FP, VIEIRA LQ, RIBEIRO SOBRINHO AP. A decrease in the innate immune response to infection in the presence of root canal sealers. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 109, n.2, p. 315-23, Dec.2010.

DE ROSSI, A, ROCHA, LB, ROSSI, MA. Interferon-gamma, Interleukin-10, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Chemokine Receptor 5, but not Interleukin-4, Attenuate the Development of Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 34, n.1, p.31-8, Jan. 2008.

DELZANGLES B, BOYLEFEVRE ML, FOREST N. Glycoproteins expression in apical pathologic tissues: Clinical incidences. **Journal of Endodontics**, v. 23, n.9, p. 565-8, Sep.1997.

DEWHIRST FE, CHEN T, IZARD J, PASTER BJ, TANNER AC, YU WH, *et al.* The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002-17, Oct. 2010.

DONG C, PALLADINO SP, HELTON ES, UBOGU EE. The pathogenic relevance of α_M -integrin in Guillain-Barré syndrome. **Acta Neuropathologica**, v. 132, n.5, p.739-752, Nov.2016.

ENGAR RC. More on Calcium Hydroxide in Endodontics. **Journal of the American Dental Association**, v. 151, n.8, p.554, Aug.2020.

ESPALADORI MC, DINIZ JMB, DE BRITO LCN, TAVARES WLF, KAWAI T, VIEIRA LQ, SOBRINHO APR. Selenium intracanal dressing: effects on the periapical immune response. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n.5, p.2951-2958, May.2021.

FABRICIUS L, DAHLÉN G, SUNDQVIST G, HAPPONEN RP, MÖLLER AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, n.4, p.278-85, Aug.2006.

FERNANDES CDO C, RECHENBERG DK, ZEHNDER M, BELIBASAKIS GN. Identification of Synergistetes in endodontic infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 73, p.1-6, Aug.2014.

FERRAZ FB, FERNANDEZ JH. Integrins acting in cell adhesion, migration and cell signaling: association with pathologies and clinical studies. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 9: p.25-34, 2014.

FERREIRA SB, DE BRITO LC, OLIVEIRA MP, MACIEL KF, MARTELLI JÚNIOR H, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP. Periapical cytokine expression in sickle cell disease. **Journal of Endodontics**, v. 41, n.3, p.358–362, Mar. 2015.

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 osteoclastic regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n.1, p. 25-31, Feb. 2009.

GALLER KM, WEBER M, KORKMAZ Y, WIDBILLER M, FEUERER M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.3, p.1480, Feb. 2021.

GARDNER H. Integrin $\alpha 1\beta 1$. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 819, p. 21-39, 2014.

GARLET GP, HORWAT R, RAY HLJ, GARLET TP, SILVEIRA EM, CAMPANELLI AP, TROMBONE APF, LETRA A, SILVA RM. Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature. **Journal of Endodontics**, v. 38, n.2, p.185-90, Feb.2012.

GARLET GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n.12, p.1349-63, Dec. 2010.

GATTI JJ, DOBECK JM, SMITH C, WHITE RR, SOCRANSKY SS, SKOBE Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 16, n.5, p.197-204, Oct.2000.

GLATIGNY S, DUHEN R, ARBELAEZ C, KUMARI S, BETTELLI E. Integrin alpha L controls the homing of regulatory T cells during CNS autoimmunity in the absence of integrin alpha 4. **Scientific Reports**, v. 5, p.7834, Jan. 2015.

GOMES BP, BERBER VB, KOKARAS AS, CHEN T, PASTER BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. **Journal of Endodontics**, v. 41, n.12, p.1975-84, Dec. 2015.

GOMES BPA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **International Endodontic Journal**, v. 27, n.6, p.291-8, Nov. 1994.

GUMBINER BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84: p.345-57, Feb.1996.

GURTNER, G. C., WERNER, S., BARRANDON, Y., AND LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453: p.314–321, May. 2008.

HAUBNER R, FINSINGER D, KESSLER H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha v \beta 3$ integrin for a new cancer therapy. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 36: p. 1374-1389, 1997.

HENRIQUES LC, DE BRITO LC, TAVARES WL, TELES RP, VIEIRA LQ, TELES FR, SOBRINHO AP. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 42, n.8, p.1239-45, Aug. 2016.

HENRIQUES LC, DE BRITO LCN, TAVARES WLF, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 12, p.1659-62, Dec. 2011.

HERNÁNDEZ VIGUERAS S, DONOSO ZÚÑIGA M, JANÉ-SALAS E, SALAZAR NAVARRETE L, SEGURA-EGEA JJ, VELASCO-ORTEGA E, LÓPEZ-LÓPEZ J. Viruses in pulp and periapical inflammation: a review. **Odontology**, v.104, n.2, p.184-91, May. 2016.

HOLLAND R, GOMES JE FILHO, CINTRA LTA, QUEIROZ ÍOA, ESTRELA C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. **Journal of Applied Oral Science : revista FOB**, v.25, n.5, p.465-476, Oct.2017.

JANG DI, LEE AH, SHIN HY, SONG HR, PARK JH, KANG TB, LEE SR, YANG SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.5, p.2719, Mar. 2021.

JONES JL, WALKER RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. **Molecular Pathology**, v. 52: p. 208-13, Aug.1999.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, HR; FITZGERALD, RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 20, p.340-349, Sep. 1965.

KAWASHIMA N, OKIJI T, KOSAKA T, SUDA H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immune histochemical study. **Journal of Endodontics**, v. 22, p.311-6, Jun.1996.

KAWASHIMA N, STASHENKO P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Archives of Oral Biology**, v. 44, n.1, p.55-66, Jan.1999

KIYOSHI Y, KRISTEN FM, LINDSAY SL, CHRISTINA YC, JANG-JUNE P, KELLY LO, RYOUICHI T, TOSHIO H, NORIO I, SHOICHI H, YUKIHOKO K, JESSE WK, JOHN MT, FUMIN C, LEWIS HR, AJAY J, CHRISTINE ID, MASAOKI O, DREW MP, RICHARD DS. Integrin $\alpha 2$ Mediates selective metastasis to the liver. **Cancer Research**, v. 69, n.18, p.7320-28, Sep.2009.

KUCZYNSKI J, LAUBER CL, WALTERS WA, PARFREY LW, CLEMENTE JC, GEVERS D, KNIGHT R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n.1, p.47-58, Dec.2011.

LANA, MA; RIBEIRO-SOBRINHO, AP; STEHLING, R; GARCIA, GD; SILVA, BK; HAMDAN, JS; NICOLI, JR; CARVALHO, MA; FARIAS, LM. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v.16, n.2, p.100-05, Apr.2001.

LAWSON WE, POLOSUKHIN VV, ZOIA O, STATHOPOULOS GT, HAN W, PLIETH D, LOYD JE, NEILSON EG, BLACKWELL TS. Characterization of fibroblast-specific protein 1 in pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.171, n.8, p.899-907, Apr.2005.

LI Y, LING J, JIANG Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. **Frontiers in Immunology**, v.9, n.12, p.691013, Jun.2021.

LIAPATAS S, NAKOU M, RONTOGIANNI D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **International Endodontic Journal**, v. 36, n.7, p. 464-71, Jul.2003.

MAIA LM, ESPALADORI MC, DINIZ JMB, TAVARES WLF, DE BRITO LCN, VIEIRA LQ, SOBRINHO APR. Clinical endodontic procedures modulate periapical cytokine and chemokine gene expressions. **Clinical Oral Investigations**, v.24, n.10, p.3691-3697, Oct.2020.

MAJETSCHAK M. Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n.2, p.205-19, Feb. 2011.

MANOIL D, AL-MANEI K, BELIBASAKIS GN. A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. **Proteomics. Clinical Applications**, v. 14, n.3, e1900060, May.2020.

MARÇAL JR, SAMUEL RO, FERNANDES D, DE ARAUJO MS, NAPIMOGA MH, PEREIRA SA, CLEMENTE-NAPIMOGA JT, ALVES PM, MATTAR R, RODRIGUES V JR, RODRIGUES DB. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 36, n.6, p.995-9, Jun.2010.

MARTINEZ FO, GORDON S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime Reports**, v. 3, n.6, p. 13, Mar. 2014.

MÁRTON IJ, KISS C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.40, n.2, p. 155-63, Feb. 2014.

MARTINHO FC, CAMARGO SEA, FERNANDES AMM, CAMPOS MS, PRADO RF, CAMARGO CHR, *ET AL*. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. **International Endodontic Journal**, v. 51, n.1, p.41-57, Jan.2018.

MCGEACHY MJ, CUA DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v.28, n.4, p. 445-53, Apr.2008.

MERGONI G, PERCUDANI D, LODI G, BERTANI P, MANFREDI M. Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v.44, n.11, p. 1616-25, Nov. 2018.

MIRANDA TT, VIANNA CR, RODRIGUES L, MONTEIRO AS, ROSA CA, CORRÊA A JR. Diversity and frequency of yeasts from the dorsum of the tongue and necrotic root canals associated with primary apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.42, n.9, p.839-44, Sep. 2009.

MITROULIS, I, ALEXAKI VI, KOURTZELIS I, ZIOGAS A, HAJISHENGALLIS G, AND CHAVAKIS T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v.147, p.123 - 35, Mar. 2015.

MOLANDER A, WARFVINGE J, REIT C, KVIST T. Clinical and radiographic evaluation of one- and two- visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. **Journal of Endodontics**, v. 33, n.10, p.1145-8, Oct. 2007.

MÖLLER AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. **Odontologisk Tidskrift**, v.74, n.5, Suppl:1-380, Dec.1966.

MOSMMAM TR, COFFMAN RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. **Advances in Immunology**, v. 46, p.111-47, 1989.

MUNSON MA, PITT-FORD T, CHONG B, WEIGHTMAN A, WADE WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **Journal of Dental Research**, v. 81, n.11, p.761-6, Nov.2002

NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE. **Doenças da polpa e do periápice**. Patologia oral e maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2004; 3: p. 105-29.

NUNES GP, DELBEM ACB, GOMES JML, LEMOS CAA, PELLIZZER EP. Postoperative pain in endodontic retreatment of one visit versus multiple visits: a systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials. **Clinical Oral Investigation**, v. 25, n.2, p. 455-68, Feb. 2021.

OHSHIMA M, YAMAGUCHI Y, OTSUKA K, SATO M, ISHIKAWA M. Laminin expression by human periodontal ligament fibroblasts. **Connective Tissue Research**, v. 47, n.3, p.149-56, 2006.

OLIVEIRA RR, TAVARES WLF, REIS AL, SILVA VA, VIEIRA LQ, RIBEIRO SOBRINHO AP. Cytokine expression in response to root repair agents. **International Endodontic Journal**, v. 51, n.11, p.1253-60, Nov.2018.

OZGA AJ, CHOW MT, LUSTER AD. Chemokines and the immune response to cancer. **Immunity**, v. 54, n. 5, p.859-74, May. 2021.

OZOK AR, PERSON IF, HUSE SM, KEIJSER BJ, WESSELINK PR, CRIELAARD W, ZAURA E. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. **International Endodontic Journal**, v. 45, n.6, p.530-41, Jun. 2012.

PASTER BJ, BOCHES SK, GALVIN JL, ERICSON RE, LAU CN, LEVANOS VA, SAHASRABUDHE A, DEWHIRST FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.12, p. 3770-83, Jun. 2001.

PASTER, BJ, FALKLER, WA, ENWONWU, CO, IDIGBE, EO, SAVAGE, KO, LEVANOS,VA, TAMER, MA, ERICSON, RL, LAU, CN, DEWHIRST, FE. Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.6, p.2187-91, Jun. 2002.

PERSON IF, BUIJS MJ, ÖZOK AR, CRIELAARD W, KROM BP, ZAURA E & BRANDT BW. The mycobioeme of root canal infections is correlated to the bacteriome. **Clinical Oral Investigation**, v.21, p.1871-81, Jun. 2017.

PERSOON IF, W. CRIELAARD W & OZOK AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v.50, n.11, p. 1055 - 1066, Nov. 2017.

PINHEIRO ET, GOMES BP, FERRAZ CC, SOUSA EL, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v.36, n.1, p.1-11, Jan. 2003.

PIRES EG, FREITAS EM DE, BONAN PRF, NOBRE SAM. Agreement between RAPD, API20C AUX, CHROMagar Candida and microculture on oral Candida identification. **Brazilian Journal of Oral Science**, v.14, n.2, p.149-53, 2015.

PLOTINO G, GRANDE NM, MERCADE M. Photodynamic therapy in endodontics. **International Endodontic Journal**, v.52, n.6, p.760-74, Jun. 2019.

PLOW EF, HAAS TA, ZHANG L, LOFTUS J, SMITH JW. Ligand binding to integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.29, p.21785-8, Jun. 2000.

RAJARAJAN A, STOKES A, BLOOR BK, CEDER R, DESAI H, GRAFSTRÖM RC, ODELL EW. CD44 expression in oro-pharyngeal carcinoma tissues and cell lines. **PLoS One**, v. 7, n.1, e28776, Jan. 2012.

REZENDE TM, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP, OLIVEIRA RR, TAUBMAN MA, KAWAI T. The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. **Journal of Endodontics**, v.34, n.9, p.1066-71, Sep. 2008.

RIBEIRO SOBRINHO AP, DE MELO MALTOS SM, FARIAS LM, DE CARVALHO MA, NICOLI JR, DE UZEDA M, VIEIRA LQ. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. **Oral Microbiology and Immunology**, v.17, n.6, p.344-53, Dec. 2002.

RIBEIRO-SOBRINHO AP, RABELO F, FIGUEIREDO CB, ALVAREZ-LEITE JI, NICOLI JR, UZEDA M, VIEIRA LQ. Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells. **Journal Medical Microbiology**, v.54, Pt 4, p.413-16, Apr.2005.

RICUCCI D, LIN LM, SPANGBERG LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.108, n.4, p.609-21, Oct.2009.

RICUCCI D, SIQUEIRA JF JR. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, v. 36, n.8, p.1277-88, Aug.2010.

RITTLING SR, ZETTERBERG C, YAGIZ K, SKINNER S, SUZUKI N, FUJIMURA A, SASAKI H. Protective role of osteopontin in endodontic infection. **Immunology**, v.129, n.1, p.105-14, Jan. 2009.

RODRIGUES RCV, ZANDI H, KRISTOFFERSEN AK, ENERSEN M, MDALA I, ØRSTAVIK D, RÔÇAS IN, SIQUEIRA JF JR. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.43, n.7, p.1058-63, Jul. 2017.

SABOIA-DANTAS CJ, COUTRIN DE TOLEDO LF, SAMPAIO-FILHO HR, SIQUEIRA JF JR. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. **Oral Microbiology Immunology**, v.22, n.5, p.320-25, Oct. 2007.

SAKAMOTO M, SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN, BENNO Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. **Oral Microbiology and Immunology**, v.23, n.4, p.275-81, Aug.2008.

SAKKO M, TJÄDERHANE L, RAUTEMAA-RICHARDSON R. Microbiology of Root Canal Infections. **Primary Dental Journal**, v.5, n.2, p.84-89, May.2016.

SCHNEIDER M, KOSTIN S, STRØM CC, APLIN M, LYNGBAEK S, THEILADE J, GRIGORIAN M, ANDERSEN CB, LUKANIDIN E, LERCHE HANSEN J, SHEIKH SP. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 75, n.1, p.40-50, Jul.2007

SCHWARTZ AD, HALL CL, BARNEY LE, BABBITT CC, PEYTON SR. Integrin α_6 and EGFR signaling converge at mechanosensitive calpain 2. **Biomaterials**, v.178, p.73-82, Sep. 2018.

SEGAL G, LEE W, ARORA PD, MCKEE M, DOWNEY G, MCCULLOCH CA. Involvement of actin filaments and integrins in the binding step in collagen phagocytosis by human fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v.114, Pt 1, p.119-129, Jan. 2001.

SEOL JH, CHO BH, CHUNG CP, BAE KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, v.32, n.2, p. 110-114, Feb. 2006.

SETTE-DIAS AC, MACIEL KF, ABDO EN, BRITO LC, CARVALHO MA, VIEIRA LQ, FARIAS LM, RIBEIRO-SOBRINHO AP, MAGALHÃES PP. Cytokine Expression in Patients Hospitalized for Severe Odontogenic Infection in Brazil. **Journal of Endodontics**, v.42, n.5, p.706-10, May. 2016.

SILVA TA, GARLET GP, LARA VS, MARTINS W JR, SILVA JS, CUNHA FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral Microbiology Immunology**, v.20, n.5, p.310-16, Oct. 2005.

SIQUEIRA JF JR, ALVES FR, RÔÇAS IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. **Journal of Endodontics**, v.37, n.11, p.1499-503, Nov.2011.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN, FAVIERI A, SANTOS KR. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **Oral Microbiology Immunology**, v.15, n.5, p.335-37, Oct. 2000.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.107, n.6, p.870-78, Jun. 2009.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. **Journal of Endodontics**, v.31, n.7, p.488-98, Jul. 2005.

SIQUEIRA JF JR, ROÇAS IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.7, p.3314-19, Jul.2005.

SIQUEIRA JF JR, SEN BH. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.97, n.5, p. 632-41, May.2004.

SIQUEIRA JFJR, ROÇAS IN, SOUTO R, UZEDA M, COLOMBO AP. *Actinomyces* species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. **Journal of Endodontics**, v.28, n.3, p. 168-72, Mar.2002.

SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN, FAVIERI A, OLIVEIRA JC, SANTOS KR. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. **International Endodontic Journal**, v.349, n.4, p.280-84, Jun.2001.

SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN. Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. **Journal of Dental Research**, v.88, n.11, p. 969–81, Nov.2009.

SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. **International Endodontic Journal**, v. 55, sup. 3, p.512-30, May.2022.

SLACK RJ, MACDONALD SJF, ROPER JA, JENKINS RG, HATLEY RJD. Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.21, n.1, p.60-78, Jan. 2022.

SMITH PC, MARTÍNEZ C, MARTÍNEZ J, MCCULLOCH CA. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n.1, p.270, Apr. 2019.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, n.2, p.134-44, Feb. 1998.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, SMITH C, MARTIN L, HAFFAJEE JA, UZEL NG, GOODSON JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiology and Immunology**, v.19, n.6, p.352-62, Dec. 2004.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Periodontal microbial ecology. **Periodontology** 2000, v. 38, p.135-87, 2005.

SOO-HYUN K, JEREMY T, SCOTT G. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **The Journal of Endocrinology**, v.209, n.2, p. 139–51, May. 2011.

SPRINGER TA, WANG JH. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. **Advances in Protein Chemistry**, v. 68, p. 29-63, 2004.

STASHENKO O, GONÇALVES RB, LIPKIN B, *et al.* Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by *Porphyromonas gingivalis*. **The American Journal of Pathology**, v.170, n.1, p.203-13, Jan. 2007.

STASHENKO P, TELES R, D'SOUZA R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.9, n.4., p.498-521, 1998.

STASHENKO P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endodontics & Dental Traumatology**, v.6, n.3, p. 89-96, Jun. 1990.

STAUDINGER LA, SPANO SJ, LEE W, COELHO N, RAJSHANKAR D, BENDECK MP, MORIARTY T, MCCULLOCH CA. Interactions between the discoidin domain receptor 1 and $\beta 1$ integrin regulate attachment to collagen. **Biology Open**, v.2, n.11, p.1148-5, Sep.2013.

STRUTZ F, OKADA H, LO CW, DANOFF T, CARONE RL, TOMASZEWSKI JE, NEILSON EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. **The Journal of Cell Biology**, v.130, n.2, p.393-405, Jul.1995.

SUNDQVIST G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiology and Immunology**, v.7, n.5, p.257-62, Oct.1992.

TAVARES WL, DE BRITO LC, HENRIQUES LC, TELES FR, TELES RP, VIEIRA LQ, RIBEIRO SOBRINHO AP. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v.38, n.10, p.1368-71, Oct. 2012.

TAVARES WL, NEVES DE BRITO LC, TELES RP, MASSARA ML, RIBEIRO SOBRINHO AP, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS, TELES FR. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. **International Endodontic Journal**, v.44, n.3, p.225-35, Mar.2011.

TAVARES WLF, *et al.*, The Impact of Chlorhexidine-based Endodontic Treatment on Periapical Cytokine Expression in Teeth. **Journal of Endodontics**, v.39, n.7, p.889-92, Jul. 2013.

TEIXEIRA FFC, CARDOSO FGR, FERREIRA NS, CORAZZA BJM, VALERA MMC, NASCIMENTO GG, MARTINHO FC. Effects of Calcium Hydroxide Intracanal Medications on T Helper (Th1, Th2, Th9, Th17, and Tfh) and Regulatory T (Treg) Cell Cytokines in Apical Periodontitis: A CONSORT RCT. **Journal of Endodontics**, v. 48, n.8, p.975-84, Aug.2022.

TEIXEIRA-SALUM TB, RODRIGUES DBR, GERVÁSIO AM, SOUZA CJA, RODRIGES JR V, LOYOLA AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.39, n.3, p. 250-56, Mar. 2010.

TELES F, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Multiple displacement amplification as an aid in checkerboard DNA–DNA hybridization. **Oral Microbiology and Immunology**, v.22, n.2, p. 118-25, Apr.2007.

TENNERT C, FUHRMANN M, WITTMER A, KARYGIANNI L, ALTENBURGER MJ, PELZ K, HELLOWIG E, AL-AHMAD A. New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings 2014. **Journal of Endodontics**, v.40, n.5, p.670-77, May. 2014.

UOTILA LM, JAHAN F, SOTO HINOJOSA L, MELANDRI E, GRÖNHOLM M, GAHMBERG CG. Specific phosphorylations transmit signals from leukocyte $\beta 2$ to $\beta 1$ integrins and regulate adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n.46, p.32230-42, Nov.2014.

VIANNA ME, HORZ H.P, GOMES BP, CONRADS G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **International Endodontic Journal**, v.39, n.6, p.484-92, Jun. 2006.

VIRTEJ A, LØES SS, BERGGREEN E, BLETSA A. Localization and signaling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.39, n.5, p.605-11, May.2013.

WALTIMO TM, SIRÉN EK, TORKKO HL, OLSEN I, HAAPASALO MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.30, n.2, p.96-101, Mar.1997.

WALTIMO, TMT. *et al.* Clinical aspects related to endodontic yeast infections. **Endodontic Topics**, v. 9, p. 66–78, 2004.

WONG J, MANOIL D, NÄSMAN P, BELIBASAKIS GN AND NEELAKANTAN P. Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges. **Frontiers in Oral Health**, v.25, n.2: p.672887, Jun.2021.

XIONG H, WEI L, PENG B. The Presence and involvement of interleukin-17 in apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.52, n.8, p.1128-37, Aug.2019.

YANG S, ZHU L, XIAO L, SHEN Y, WANG L, PENG B, HAAPASALO M. Imbalance of Interleukin-17+ T-cell and Fosp3+ Regulatory T-cell Dynamics in Rat Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v.40, n.1, p. 56-62, Jan.2014.

YARZA P, YILMAZ P, PRUESSE E, GLÖCKNER FO, LUDWIG W, SCHLEIFER KH, WHITMAN WB, EUZÉBY J, AMANN R, ROSSELLÓ-MÓRA R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews. Microbiology**, v.12, n.9, p.635-45, Sep.2014.

YONEKAWA K, HARLAN JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v.77, n.2, p. 129-40, Feb.2005.

YU JJ, GAFFEN SL. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.170-77, Jan.2008.

ZEHNDER M, RECHENBERG DK, THURNHEER T, LÜTHI-SCHALLER H, BELIBASAKIS GN. FISHing for gutta-percha-adhered biofilms in purulent post-treatment apical periodontitis. **Molecular Oral Microbiology**, v.32, n.3, p.226-235, Jun.2017.

ZHANG J, HUNG GC, NAGAMINE K, LI B, TSAI S, LO SC. Development of Candida-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important Candida Species. **Microbiology Insights**, v.18, n.9, p.21-8, Apr.2016.

ZHANG W, YELICK PC. Tooth Repair and Regeneration: Potential of Dental Stem Cells. **Trends in Molecular Medicine**, v.27, n.5, p.501-511, May.2021.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar desta pesquisa: Avaliação da expressão apical de integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, e αL , citocinas e quimiocinas em resposta a infecção endodôntica. Pedimos a sua autorização para a coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte do material biológico humano coletado durante seu tratamento endodôntico. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa temos o objetivo de avaliar a expressão de proteínas que atuam na inflamação em dentes portadores de necrose pulpar, utilizando métodos laboratoriais, que de forma nenhuma irá prejudicar no resultado do tratamento. Durante o tratamento de canal pode ocorrer complicações próprias da dificuldade do tratamento de canal, como:

- Não localização de todos os canais radiculares e assim comprometer a limpeza por completo da polpa dentária, o que pode ocasionar sinais e sintomas da inflamação pulpar.

- Fraturas verticais da raiz entre as sessões do tratamento, impossibilitando a reparação completa do dente.

- Recontaminação dos canais levando provocando sinais e sintomas de inflamação pulpar devido a perda ou fratura das restaurações temporárias (entre uma sessão e outra) ou até mesmo restaurações definitivas mal adaptadas, causando infiltração e recontaminação do interior do dente.

- Fratura do instrumento utilizado durante o tratamento endodôntico, dificultando ou impossibilitando a limpeza completa do dente.

– Anatomias atípicas das raízes de dentes que dificultam um tratamento de canal ideal. O risco que você participante da pesquisa poderá ter é o mesmo daquele que qualquer pessoa que necessite de tratamento canal se submete. Durante toda a pesquisa o paciente é livre para desistir do tratamento proposto, devido ao cansaço ou constrangimento de participar do estudo. 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.

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

Data: ____/____/____

ANEXO B - Termo de Constituição de Biorrepositório

O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa “Avaliação da carga microbiana e fúngica de Sistemas de Canais Radiculares infectados e a expressão apical de integrinas, citocinas e quimiocinas nos tecidos perirradiculares adjacentes”, a ser gerenciado pelo pesquisador Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Professor na Faculdade de Odontologia- Departamento de Odontologia Restauradora ODR. Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha. CEP: 31270-901/ Belo Horizonte- MG. Telefone: (31) 3409-2470/email: sobrinho.bhz@gmail.com.br conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto nas Resoluções nº 441/11 e nº 466/12, ambas do CNS e complementares.

- 1- O Biorrepositório, constituído por amostras de fluido periapical coletado durante o tratamento de canal atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG;
- 2- O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezer a - 80C° até sua utilização;
- 3- O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP- UFMG);
- 4- A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente

cadastrados na Plataforma Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Projeto de Pesquisa e mediante aprovação da análise ética;

- 5- O Biorrepositório estará sob a responsabilidade do pesquisador, competindo aos acordantes o cumprimento das disposições aqui constantes e observância das normas contidas no regulamento de Biorrepositório;
- 6- Havendo a retirada ou desistência por parte do participante da pesquisa, referente à amostra coletada e armazenada, deverá o pesquisador e a instituição que mantém a guarda disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso, será facultado ao participante da pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;
- 7- Em caso de encerramento do projeto de pesquisa, havendo interesse de uso futuro das amostras do Biorrepositório e quando autorizado pelo participante da pesquisa em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- 8- Para uso futuro das amostras em nova pesquisa, em atendimento ao disposto na Resolução nº 441/2011 do CNS, deverá haver submissão de novo Projeto de Pesquisa ao Sistema CEP/CONEP;
- 9- Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão destruídos ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da Cláusula.

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

Telefone: (31) 3409-2470

Email: sobrinho.bhz@gmail.com.br

Rubrica do pesquisador:_____ Rubrica do participante:_____