

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina

Kelma Campos

**ESTUDO MOLECULAR DO GENE INTERFERON-GAMMA NO
GRANULOMA PERIAPICAL E NO CISTO RADICULAR**

Belo Horizonte
2014

Kelma Campos

**ESTUDO MOLECULAR DO GENE INTERFERON-GAMMA NO
GRANULOMA PERIAPICAL E NO CISTO RADICULAR**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Medicina Molecular.

Professor orientador:
Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Professora coorientadora:
Dra. Jeane de Fátima Correia Silva Alves

Belo Horizonte

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

IMPRIMIR SEPARADAMENTE

ATA DE DEFESA

IMPRIMIR SEPARADAMENTE

Ao meu filho Bernardo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez e à Prof^a. Dr^a. Carolina Cavaliéri Gomes, pelos fundamentais ensinamentos, confiança e oportunidade.

Ao Prof. Dr. Renato Menezes Silva e à Prof^a. Dr^a. Ariadne Letra, pela confiança, credibilidade, amizade e total assistência durante os meses de doutorado na *The University of Texas Health Science Center at Houston* (UTHSC-H).

À comissão examinadora da tese, por aceitarem tão carinhosamente o convite, pelas correções e sugestões neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de doutorado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa para o estágio de doutorado na UTHSC-H.

À Prof^a. Dr^a. Maria Ilma de Souza Gruppioni Côrtes, por ter conduzido os meus primeiros passos na pesquisa, enfatizando sempre a importância da ética, do compromisso, da responsabilidade, da lealdade e da dedicação. Pelos anos de sincera e prazerosa amizade e incentivo constante.

À Prof^a. Dr^a. Kátia Maltos, pelo estímulo, fundamental para o aproveitamento pleno do doutorado, por sua presença fiel e marcante nos momentos mais importantes, decisivos, difíceis e felizes deste período e de muitos outros, pela amizade sincera de tantos anos, pelo carinho e apoio constantes.

A todos os meus colegas — Sílvia Ferreira, Renata Resende, Cláudia Maria Pereira, Elizete Maria, Vanessa Bernardes, Fabrício Tinoco, Thiago Fonseca, Gefer Thiago, Florença Stefani, Thaís Santos, Clarice, Ana Carolina Neto, Telma Arão, Alfonso Gala's, Marina Diniz, Fabrício Amaral, Leonardo, Giovana Ribeiro, Flávia Mendes, Lissur, Alessandra Pires, Nathália Duarte, Marcela e Dani —, pela feliz convivência durante todos esses anos.

À Prof^a. Dr^a. Lucyana Farias — leal com seus princípios e compromissos, exemplo de profissionalismo, competência e doação à pesquisa —, por sua amizade sincera e preciosa e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. João Artur, por estar sempre presente, pelos ensinamentos, confiança, incentivo, pelas conversas, amizade sincera e o apoio incondicional no momento "Bernardo", o mais feliz da minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Jeane de Fátima Correia Silva Alves, pelo profissionalismo, dedicação, atenção e disposição em ensinar.

À Prof^a. Dr^a. Letícia Chaves, pela ajuda constante durante o doutorado sanduíche, preocupação, sensibilidade, carinho, disponibilidade. Enfim, pelos momentos vividos em Houston, que jamais teriam sido tão bons caso ela não estivesse presente.

Ao Prof. Dr. Adriano Loyola, pela oportunidade de conviver com a sua admirável cultura.

Ao departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFMG (FOUFMG), especialmente, ao Prof. Jorge Barbosa Passos, pela importante colaboração durante a coleta das amostras.

Aos pacientes da clínica de cirurgia da FOUFMG, pela fundamental contribuição nesta pesquisa.

À Min Zhao (técnica com nível superior da UTHSC-H), pelo suporte técnico nos experimentos.

Aos meus amigos e colegas de profissão, pela admiração, respeito e incentivo.

À minha família — Dinho, irmãos, sobrinho, afilhados, cunhadas, madrinha e tios —, pelo fundamental apoio durante a minha trajetória profissional e acadêmica.

À minha mãe, exemplo de altruísmo e dedicação plena, por absolutamente tudo. Sem ela eu não conseguiria vencer esta importante etapa da minha vida.

Ao meu pai (*in memoriam*), que, certamente, torceu por mim.

A Deus.

*“Todo saber é vão, exceto quando há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.
E quando trabalhais com amor, vós vos unis
a vós próprios, e uns aos outros, e a Deus”.*

Khalil Gibran

Resumo

O IFN- γ apresenta importante função na patogênese das lesões periapicais e a metilação do gene *IFNG* tem sido associada à inativação da transcrição. O objetivo deste estudo foi investigar a metilação da região promotora do *IFNG* e a associação com a transcrição do gene e com os níveis de proteína no granuloma periapical e no cisto radicular. O PCR específico para metilação (MSP – *Methylation Specific PCR*) foi usado para avaliar o padrão de metilação do DNA do gene *IFNG* em 16 amostras de granuloma periapical e em 13 de cisto radicular. Os níveis de transcrição do RNAm do *IFNG* foram verificados pelo PCR em Tempo Real (qPCR) e a expressão da proteína foi avaliada por meio da imunohistoquímica. Todas as amostras de lesão periapical exibiram metilação total ou parcial do gene *IFNG*. Além disso, um aumento no perfil de metilação foi encontrado nos cistos radiculares em relação aos granulomas periapicais. Observou-se um aumento na expressão do RNAm do *IFNG* em amostras de lesão periapical parcialmente metiladas em relação às aquelas totalmente metiladas. Este estudo apresenta a primeira evidência do possível impacto da metilação do *IFNG* na transcrição do *IFNG* em lesões periapicais.

Palavras-chave: Metilação. Interferon-gamma. Granuloma periapical. Cisto radicular. Lesão periapical.

Abstract

IFN- γ plays an important role in the pathogenesis of periapical lesions, and the methylation of *IFNG* has been associated with transcriptional inactivation. The purpose of the present study was to investigate *IFNG* promoter methylation in association with gene transcription and protein levels in periapical granulomas and radicular cysts. Methylation-specific (MSP) PCR was used to assess the DNA methylation pattern of the *IFNG* gene in 16 periapical granuloma and 13 radicular cyst samples. The transcription levels of *IFNG* mRNA were verified by quantitative real time PCR (qPCR), and protein expression was evaluated by immunohistochemistry. All the periapical lesion samples exhibited partial or total methylation of the *IFNG* gene. In addition, an increased methylation profile was found in radicular cysts compared to periapical granulomas. Increased *IFNG* mRNA expression was observed in the partially methylated periapical lesion samples relative to the samples that were completely methylated. The present study provides the first evidence of the possible impact of *IFNG* methylation on *IFNG* transcription in periapical lesions.

Keywords: Methylation. Interferon-gamma. Periapical granuloma. Radicular cyst. Periapical lesion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de inibição da transcrição gênica por meio da metilação do DNA. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – *Alkaline phosphatase*

APC-BMMs – *Antigen-presenting cell bone marrow-derived macrophages*

APCs – *antigen-presenting cells*

Car2 – *carbonic anhydrase*

cDNA – *complementary DNA*

CIA – *collagen induced arthritis*

Ct – *Threshold cycle*

Ctsk – *cathepsin K*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

DNMTs – *DNA methyltransferases*

FasL – *Fas ligand*

Foxp3 – *transcription factor forkhead box P3*

GATA 3 – *Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3*

HE – *Hematoxilina e Eosina*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

ifng – *Interferon-Gamma*

IFNG – *Interferon-Gamma*

IFN- γ – *Interferon-Gamma (citocina)*

IL – *Interleucina*

iNOS – *Inducible isoform nitric oxide synthases*

JNK – *c-jun-N-Terminal protein kinase*

LPS – *Lipopolissacarídeo*

M-CSF – *Macrophage colony-stimulating factor*

MeCP – *Proteína de ligação metil-CpG*

MHC – *Major of histocompatibility complex*

miRNAs – *MicroRNAs*

MMP – *matrix metalloproteinase*

Oca – *Osteocalcina*

OPG – *Osteoprotegerina*

OPN – *Osteopontina*

PL-MNC – *Periapical lesion mononuclear cells*

rIFN – Interferon-gamma recombinante
RNA – *Ribonucleic acid*
RNAm – RNA mensageiro
RNase – *Ribonuclease*
RANKL – *Receptor activator of nuclear kappa-beta*
RPLPO – *large ribosomal protein*
qRT PCR – *real time polymerase chain reaction*
SAH – S-adenosil-homocisteína
SAM – S-adenosil-metionina
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*
STAT – *Signal transducers and activators of transcription*
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β – *Transforming growth factor beta*
Th – *T helper*
TNF- α – *Tumor necrosis factor alfa*
TNF- β – *Tumor necrosis factor beta*
TRAF 6 – *TNF receptor associated factor 6*
TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligant*
TRAP – *Tartrate-resistant acid phosphatase*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	146
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	168
2.1 Lesões periapicais	168
2.1.1 Participação microbiana nas lesões periapicais	21
2.1.2 Resposta imunológica nas lesões periapicais	23
2.2 Interferon-Gamma	257
2.3 Metilação do DNA	31
2.3.1 Metilação do gene IFNG	323
3 OBJETIVOS	346
3.1 Objetivo geral.....	346
3.2 Objetivos específicos.....	346
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	357
4.1 Considerações éticas	357
4.2 Desenho do estudo	357
4.3 Procedimentos experimentais.....	357
4.3.1 Diagnóstico das lesões periapicais	357
4.3.2 Extração de DNA.....	368
4.3.3 Extração de RNA.....	368
4.3.4 Análise da metilação do gene IFNG.....	368
4.3.5 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para o gene IFNG	379
4.3.5.1 Síntese do cDNA e transcrição reversa	40
4.3.5.2 Quantificação relativa do gene IFNG.....	40
4.3.6 Imunoistoquímica para a proteína IFNG	41
4.3.7 Análise estatística	42
5 ARTIGO	413
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXO 1 - PROJETO CAAE - 0462.0.203.000-11 COEP-UFMG.....	60
APÊNDICE 1- TERMO DE ESCLARECIMENTO/CONSENTIMENTO DESTINADO A ADOLESCENTES (13 A 18 ANOS), QUE POSSUEM DENTE COM LESÃO PERIAPICAL E EXTRAÇÃO INDICADA.....	61
APÊNDICE 2- TERMO DE ESCLARECIMENTO/CONSENTIMENTO DESTINADO A MAIORES DE 18 ANOS QUE POSSUEM DENTE COM LESÃO PERIAPICAL E EXTRAÇÃO INDICADA	63
APÊNDICE 3 - GEL DE AGAROSE PARA VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA EM AMOSTRAS DE LESÃO PERIAPICAL	65
APÊNDICE 4 – GEL DE POLIACRILAMIDA PARA VERIFICAR O PADRÃO DE METILAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LESÃO PERIAPICAL	66

1 INTRODUÇÃO

As lesões periapicais constituem um grupo de doenças imuno-inflamatórias que ocorrem devido à necrose pulpar e podem ser causadas por cáries, traumas ou procedimentos iatrogênicos (FIGDOR; SUNDQVIST, 2007). A presença de microorganismos viáveis no sistema de canais radiculares é considerada a principal razão para o desenvolvimento das lesões periapicais (KAKEHASHI, 1965), que podem provocar a reabsorção de tecidos duros e a destruição do ligamento periodontal (STASHENKO *et al.*, 1998).

Alguns estudos demonstram que as citocinas funcionam como mediadoras do desenvolvimento das lesões periapicais e também da reabsorção óssea periapical (FUKATA *et al.*, 2009; TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010). A citocina Interferon-Gamma (IFN- γ) é codificada pelo gene Interferon-Gamma (*IFNG*) e secretada, principalmente, pelos Linfócitos T *helper* (Th-1). Essa proteína desempenha um papel fundamental na contenção da infecção, por ser a mais eficiente na ativação de macrófagos (MAEDA *et al.*, 1994). Além disso, o IFN- γ tem sido associado a efeitos contraditórios tanto na reabsorção óssea quanto na osteoclastogênese (KOHARA *et al.*, 2011). Foi relatado que o IFN- γ pode inibir (SATO *et al.*, 1992; THOKIN *et al.*, 1994) ou acelerar a reabsorção óssea *in vivo* (GOODMAN *et al.*, 1999; MADYASTHA *et al.*, 2000), além de estimular (GAO *et al.*, 2007) ou dificultar a osteoclastogênese (KOHARA *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2012).

Considerando a importância dessa citocina na inflamação, alterações na expressão do gene *IFNG*, por meio de eventos epigenéticos como a metilação do *deoxyribonucleic acid* (DNA), podem influenciar o desenvolvimento de doenças inflamatórias (GONSKY *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

A metilação do DNA é o evento epigenético mais comum, caracterizado pela adição de um grupo metil na citosina, dentro da região citosina-fosfato-guanina (ilhas CpGs) (ESTELLER *et al.*, 2002). As ilhas CpGs não metiladas estão relacionadas à transcrição ativa do DNA, enquanto o DNA metilado recruta proteínas de ligação metil, levando à compactação da cromatina e prevenindo a ligação de fatores de transcrição (JONES; LAIRD, 1999; EGGER *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm narrado a importância da metilação na patogênese de algumas doenças inflamatórias como na gastrite crônica (KANG *et al.*, 2003), na inflamação das vias aéreas (ADCOCK *et al.*, 2007), na periodontite (OFFENBACHER *et al.*, 2007;

VIANA *et al.*, 2011), e na asma brônquica (KWON *et al.*, 2008). Além disso, evidenciaram que a inflamação na polpa dentária humana está associada à demetilação da região promotora do gene *IFNG* e que o perfil de metilação está associado à transcrição do gene neste tecido (CARDOSO *et al.*, 2010). Entretanto, não há estudos a respeito de alterações epigenéticas em lesões periapicais.

Devido à importância do $\text{IFN-}\gamma$ nas alterações inflamatórias e à possível ação de mecanismos epigenéticos nesse gene, a proposta deste estudo é investigar a metilação do gene *IFNG*, juntamente com a sua transcrição e seus níveis protéicos no granuloma periapical e no cisto radicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões periapicais

As lesões periapicais crônicas de origem endodôntica incluem o granuloma periapical e o cisto radicular, que se desenvolvem como resultado da resposta imunológica à contínua estimulação antigênica, proveniente do sistema de canais radiculares (TORABINEJAD; BACKLAND, 1978). O trauma dentário e as irritações originárias de material endodôntico causam a inflamação perirradicular (NAIR, 1987; WAYMAN, 1992). Entretanto, na maioria dos casos, a inflamação periapical é produzida por bactérias provenientes do sistema de canais radiculares (SCR) infectado (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; NAIR, 1987). Alguns autores consideram que ambas as lesões representam dois estágios distintos do mesmo processo inflamatório, sendo caracterizadas pela infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos nos tecidos periapicais e também pela produção de tecido de granulação. De acordo com esses estudos, o cisto radicular é consequência da proliferação dos restos epiteliais de Malassez, presentes no granuloma periapical. No entanto, os fatores que determinam a ocorrência da transformação cística permanecem controversos. A persistência da inflamação está relacionada à reabsorção óssea periapical (TORABINEJAD; KETTERING, 1985; GAO *et al.*, 1988)

As lesões periapicais crônicas são, normalmente, assintomáticas, mas podem evoluir e apresentar períodos de exacerbação, exibindo uma variedade de manifestações clínicas. Nesse caso, pode haver relato de dor à percussão, presença de fístula, linfadenopatia regional, mobilidade dentária e volume aumentado na região apical. Além disso, a mucosa bucal na região periapical do dente pode apresentar-se dolorida e avermelhada (SANT'ANA FILHO; RADOS, 1998).

Radiograficamente, tanto no granuloma periapical quanto no cisto radicular, observa-se uma imagem radiolúcida, bem delimitada, podendo estar envolvida por uma linha radiopaca, que representa a esclerose óssea. Não é possível realizar o diagnóstico diferencial entre essas duas lesões através da imagem radiográfica (NAIR, PAJAROLA; SCHROEDER, 1996). De acordo com Simon *et al.* (2006), tais lesões podem ser diferenciadas pela mensuração da densidade radiográfica através da tomografia computadorizada, uma vez que os granulomas periapicais são compostos por tecido sólido e os cistos radiculares, por uma área cística semisólida ou liquefeita. Rosenberg *et al.*

(2010) e Peixoto *et al.* (2012) afirmaram que a biópsia e a avaliação histopatológica permanecem como o procedimento padrão para diferenciar as duas lesões.

O granuloma periapical é formado por pequenos vasos sanguíneos, linfócitos e plasmócitos. Quando estes últimos apresentam-se em número acentuado, corpúsculos de Russel podem ser observados (NEVILLE *et al.*, 2004). É constituído também por uma cápsula de tecido conjuntivo bem desenvolvida, formada por densas fibras colágenas, firmemente aderidas à superfície radicular, de tal maneira que, em alguns casos, a lesão é removida em sua totalidade durante a extração do dente. Entre os linfócitos, as células T são, provavelmente, mais numerosas em relação às células B (KOPP; SCHWARTING, 1989). Além disso, o granuloma periapical pode ser epiteliado, caso apresente remanescentes epiteliais, ou não epiteliado (NAIR *et al.*, 1996).

O tratamento centraliza-se na redução e eliminação dos microrganismos agressores. Se o dente puder ser preservado, o tratamento endodôntico deve ser realizado. Os dentes que não podem ser restaurados devem ser extraídos, seguidos pela curetagem de todo o tecido de granulação periapical (MARIN *et al.*, 2000).

O cisto radicular apresenta uma cavidade que pode apresentar-se preenchida por líquidos e células descamadas. Esta lesão encontra-se envolvida por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo denso contendo, muitas vezes, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos, histiócitos e, raramente mastócitos e eosinófilos. Além disso, é revestida por um epitélio do tipo escamoso estratificado que pode apresentar exocitose, espongiose ou hiperplasia. Calcificações distróficas, cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas, hemácias e áreas de pigmentação por hemossiderina podem estar presentes no lúmen, na cápsula ou em ambos (NEVILLE *et al.*, 2004).

Os cistos radiculares são uma consequência direta da periodontite apical crônica. Contudo, nem toda lesão crônica se desenvolverá em um cisto. Os cistos podem ser classificados em cisto verdadeiro — que é aquele que contém uma cavidade completamente envolvida por epitélio — ou em cisto em bolsa, que apresenta cavidade envolvida por epitélio, mas que se comunica com os canais radiculares (SIMON, 1980; NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996).

Muitas teorias foram propostas para explicar a patogênese dos cistos radiculares verdadeiros (NAIR, 2004). Especula-se que ela se desenvolve em três estágios. Durante a primeira fase, os restos epiteliais de Malassez proliferam-se sob a influência dos fatores de crescimento (GAO; FLAITZ; MACKENZIE, 1996 e LIN *et al.*, 1996) que são liberados

por células presentes na lesão. Na segunda fase, começa a formar-se uma cavidade revestida por epitélio. Existem duas teorias a respeito da formação dessa cavidade. Uma delas, a teoria da deficiência nutricional, afirma que as células centrais da camada de epitélio são privadas da fonte de nutrição e, portanto, sofrem necrose e degeneração, e os produtos resultantes, em geral, atraem neutrófilos para a área necrótica. Essas microcavidades, que contêm células epiteliais em degeneração, infiltração de leucócitos e exsudato tecidual coalescem para formar a cavidade cística, envolvida por um epitélio do tipo escamoso e estratificado. A segunda, a “teoria do abscesso”, estabelece que as células epiteliais em proliferação circundam um abscesso formado pela necrose e lise do tecido conjuntivo (NAIR; SUNDQVIST; SJÖGREN, 2008). Durante a terceira fase, aconteceria o crescimento da lesão cística, cujo mecanismo ainda não foi bem esclarecido, mas baseia-se na teoria da diferença de pressão osmótica (TOLLER, 1970), em que a decomposição de restos celulares dentro da luz dos cistos aumenta a concentração de proteínas, produzindo uma pressão osmótica maior, resultando no transporte de fluidos através do revestimento epitelial para o lúmen da cavidade cística. A passagem do fluido ajuda no crescimento do cisto (NEVILLE *et al.*, 2004). Com a reabsorção osteoclástica do osso, o cisto expande-se. Outros fatores de reabsorção óssea, como as prostaglandinas (PG), interleucinas e proteinases, provenientes das células inflamatórias, também permitem o aumento do cisto (ROCHA *et al.*, 1998; SIQUEIRA JÚNIOR; LOPES, 1999). Formigli *et al.* (1995) sugeriram que os neutrófilos mortos no lúmen cístico fornecem uma fonte contínua de prostaglandina, que pode se difundir pelos poros da parede do epitélio em direção aos tecidos. Como a população de células na área periapical é composta por numerosos linfócitos T (TORABINEJAD; KETTERING, 1985) e macrófagos, estes irão produzir uma variedade de citocinas inflamatórias como a Interleucina (IL)- β , que juntamente com a prostaglandina ativarão os osteoclastos, culminando na reabsorção óssea (TERONEN *et al.*, 1995).

O cisto radicular em bolsa forma-se por causa do acúmulo de neutrófilos ao redor do forame apical, em resposta à presença de bactérias no sistema de canais radiculares (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996; NAIR, 1997). Os microabscessos formados são envolvidos por um epitélio em proliferação que, ao entrar em contato com o ápice radicular, formam um colar epitelial com aderência epitelial sem, entretanto, vedar a comunicação entre o lúmen da lesão e o canal radicular (NAIR; SCHROEDER, 1985). A presença de micro-organismos no canal radicular, seus produtos e células necróticas no

lúmen, atraem mais neutrófilos por meio de um gradiente quimiotático. Todavia, o lúmen em forma de bolsa age como uma “armadilha mortal” para os neutrófilos. Como as células necróticas acumulam-se, o lúmen aumenta de volume, estendendo-se dentro da área periapical, levando à degradação da matriz extracelular e à reabsorção óssea (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996; NAIR, 1997). Sob o ponto de vista patogênico, estrutural, da dinâmica tecidual e do hospedeiro, a extensão do tipo bolsa do espaço do canal radicular tem muito em comum com a bolsa periodontal marginal, justificando o nome “cisto periapical em bolsa” (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996).

O acúmulo de células inflamatórias nas lesões periapicais representa uma resposta protetora do hospedeiro com o objetivo de eliminar os micro-organismos, prevenindo a invasão bacteriana direta da região periapical (NAIR, 1997). Por outro lado, os mecanismos responsáveis por combater a infecção também causam a destruição do tecido periapical normal através reabsorção óssea na região (STASHENKO, 1990; MARTON *et al.*, 1993). Os fatores microbianos associados à resposta do hospedeiro resultam na formação de algumas das várias categorias de periodontites apicais. Apesar da capacidade de resposta do hospedeiro, o organismo não consegue destruir os micro-organismos que se encontram no interior do SCR de um dente sem vitalidade pulpar, uma vez que esse ambiente está além do alcance das células de defesa. Logo, as lesões periapicais não se curam espontaneamente. As opções terapêuticas para as lesões císticas periapicais variam entre o tratamento não cirúrgico — que consiste no tratamento endodôntico radical ou retratamento do sistema de canais radiculares — e o tratamento cirúrgico, por apicetomias ou de marsupialização (NAIR, 2004). Em lesões de grande extensão, a manobra de marsupialização ocasiona descompressão da cavidade cística e alívio da pressão interna sobre as células circunvizinhas na área afetada (NEAVERTH; BURG, 1982; SHAH, 1988; TSURUMACHI; SAITO, 1995 e GALLEGO *et al.*, 2002).

2.1.1 Participação microbiana nas lesões periapicais

Takehashi, Stanley e Fitzgerald (1965) comprovaram o papel determinante dos micro-organismos no estabelecimento da necrose pulpar e na formação da lesão periapical.

Durante os estágios iniciais da infecção pulpar, bactérias anaeróbias facultativas e obrigatórias dominam a microflora (FABRICIUS *et al.*, 1982). Com o consumo do oxigênio disponível, sua concentração diminui progressivamente (LOESHE, 1983),

favorecendo o crescimento de anaeróbios obrigatórios no SCR (SATO *et al.*, 2012). A maioria das bactérias encontradas em dentes com lesão periapical, polpa exposta à cavidade oral (BAUMGARTNER; FALKLER, 1991) ou com coroas íntegras (SUNDQVIST, 1992) são anaeróbias obrigatórias.

Nos estudos de Sundqvist (1994) e Nair (1997) um *spectrum* de 300 espécies colonizadoras da cavidade oral humana saudável foram isoladas de canais radiculares infectados de dentes com lesão periapical. Foram encontrados espiroquetas em canais radiculares com polpa necrosada e fungos em dentes com periodontite periapical primária (DAHLE; TRONSTAD; OLSEN, 1993; NAIR, 1987; SEN; PISKIN; DEMIRCI, 1995; WALTIMO *et al.*, 2003 e BALDASSO *et al.*, 2012).

O SCR dos dentes com infecção primária e lesão periapical apresenta maior quantidade e diversidade de bactérias em relação àquele dos dentes com lesão periapical decorrente de infecção secundária (BLOME *et al.*, 2008). Alguns micro-organismos exibem prevalência similar em infecção primária e secundária (CHUGAL *et al.*, 2011). Nos dentes com infecção primária ou secundária e que apresentam lesão periapical, as espécies mais prevalentes são *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas endodontalis* (BLOME *et al.*, 2008).

Rôças e Siqueira Júnior (2008) verificaram que a *Olsenella uli* (74%), *Eikenella corrodens* (63%), *Porphyromonas endodontalis* (56%) e *Peptostreptococcus anaerobius* (54%) eram as espécies mais frequentemente encontradas em dentes unirradiculares, com lesão periapical assintomática e sem bolsa periodontal além de 4 mm de profundidade.

Ribeiro *et al.* (2011) e Santos *et al.* (2011) mostraram que há uma grande variabilidade de espécies entre indivíduos diferentes, apresentando a mesma condição. Santos *et al.* (2011) encontraram 651 filotipos em lesões periapicais agudas e 430 em lesões crônicas, sendo que os gêneros mais abundantes nas primeiras eram *Fusobacterium* (19%), *Parvimonas* (11%) e *Peptostreptococcus* (10%) e, nas últimas, *Phocaeicola* (12.5%), *Eubacterium* (12%) e *Pseudoramibacter* (10%), sendo *Eubacterium* e *Mogibacterium* as mais prevalentes.

Porphyromonas e *Prevotella*, bastonetes produtores de pigmento negro (BPPN), foram relacionados com sinais e sintomas das infecções do SCR e periápice (SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2001). A espécie *Porphyromonas endodontalis*, especificamente, foi encontrada em infecções agudas, mas não em infecções crônicas (MUNSON *et al.*, 2002).

A espécie *Mogibacterium* predominou nas lesões periapicais sintomáticas (SATO *et al.*, 2012).

Tani-Ishii *et al.* (1994) observaram que até o sétimo dia antes do desenvolvimento da lesão periapical houve um predomínio de *Streptococcus*, enquanto os *Bacteroides* predominaram em poucos canais radiculares. No décimo quinto dia, a microbiota foi caracterizada por níveis altos de *Streptococcus*, pela presença de *Neisseria* e *Peptostreptococcus*, e pela frequência aumentada de *Bacteroides*.

Há evidências de que a periodontite apical é também uma doença induzida por biofilme bacteriano (NAIR *et al.*, 2005; CHÁVEZ DE PAZ, 2007; RICUCCI; SIQUEIRA JÚNIOR, 2010). Os biofilmes bacterianos foram significativamente mais detectados em casos de cistos (95%), abscessos (83%) e granulomas (69,5%) (RICUCCI; SIQUEIRA JÚNIOR, 2010).

2.1.2 Resposta imunológica nas lesões periapicais

As lesões periapicais representam a resposta do hospedeiro que ativamente previne a disseminação de bactérias do SCR infectado para o tecido ósseo apical e periapical. As células envolvidas nesse processo incluem Linfócito B, Linfócitos T, plasmócitos, macrófagos e polimorfonucleares (PMN). A captura, a fagocitose e a morte da bactéria são as principais funções de defesa do hospedeiro na região periapical. Entretanto, a formação dessas lesões também está associada aos danos ocasionados nessa região pela perda óssea (METZGER, 2000).

Estudos qualitativos e quantitativos da composição celular de granulomas periapicais foram profundamente influenciados pela metodologia disponível no momento em que foram realizados. Tentativas iniciais de caracterizar as células que participam dessas lesões basearam-se em sua morfologia clássica (PIATELLI *et al.*, 1991). O uso intensivo de anticorpos monoclonais contra subgrupos de linfócitos T, Linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, plasmócitos e PMNs resultaram em maior avanço na compreensão da imunobiologia da resposta do hospedeiro na região periapical, tanto em humanos como em ratos (KOPP; SCHWARTING, 1989). Uma proporção maior de granulócitos (mais de 98% eram neutrófilos) e menor proporção de linfócitos e plasmócitos foi observada em lesões clinicamente sintomáticas. Esses resultados são coerentes com os achados em que lesões periapicais crônicas são compostas, principalmente, por células

mononucleares, enquanto os neutrófilos são característicos de periodontites agudas (fase exsudativa) e de exacerbação da inflamação crônica, como resultado de uma nova infecção proveniente do SCR (MARTON; KISS, 2000; NAIR, 2004). Os neutrófilos, primeira linha de defesa contra a invasão bacteriana proveniente do SCR, fagocitam e eliminam a maioria dos micro-organismos, prevenindo, dessa maneira, que eles se espalhem pela lesão (WALTON; ARDJMAND, 1992).

Os macrófagos constituem cerca de 46% das células inflamatórias nas lesões periapicais humanas (STERN *et al.*, 1981), são mais numerosos que os linfócitos T (PIATELLI *et al.*, 1991) e predominam durante todo o desenvolvimento dessas lesões (KAWASHIMA *et al.*, 1996). Akamine *et al.* (1994) verificaram, nesse mesmo tipo de modelo, que o número de macrófagos aumentou nos dez primeiros dias, manteve-se por 60 dias, declinando gradualmente em seguida.

Os macrófagos presentes na lesão periapical funcionam como fagócitos para prevenir eficientemente a disseminação das bactérias do SCR infectado (NAIR *et al.*, 2004). Bactérias que são novas para o hospedeiro podem ativar o sistema complemento pela via alternativa, resultando em sua opsonização pelo componente C3b. Isso, em geral, resultará na sua fagocitose pelos macrófagos por intermédio do receptor C3b. Quando anticorpos específicos para a bactéria estão presentes, uma forma mais eficiente de fagocitose ocorrerá, envolvendo uma opsonização dual pelo IgG e C3b e o envolvimento dos receptores Fc e C3b dos macrófagos (METZGER, 2000).

Os macrófagos, que também são células apresentadoras de antígenos, induzem a imunidade adquirida. Eles possuem moléculas *Major of Histocompatibility Complex* (MHC)II e foram identificados em granuloma periapical de humanos e de ratos (KOPP; SCHWATTING, 1989; OKIJI *et al.*, 1994). Esses macrófagos processam o antígeno e apresentam-lhe aos linfócitos T auxiliares por meio da molécula MHC. Adicionalmente, os linfócitos produzem a citocina IL-1, que é um sinal complementar essencial para a sua ativação (METZGER, 2000). Os macrófagos são considerados a principal fonte de citocinas IL-1 α , IL-1 β e *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF α), que contribuem para a ativação e regulação do processo inflamatório (DINARELLO, 1988). Além disso, as citocinas originadas pelos macrófagos ativam os osteoclastos, que provocam a reabsorção óssea, e também induzem a proliferação de fibroblastos, estimulando a geração de colágeno (METZGER, 2000). Os macrófagos também são responsáveis pela produção de

metaloproteinases, que contribuem para o resultado destrutivo do processo inflamatório periapical (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Os linfócitos Th 1, ativados pelo contato com os macrófagos infectados, fornecem IFN- γ , gerando uma série de respostas bioquímicas, que convertem o macrófago em uma potente célula efetora antimicrobiana (METZGER, 2000).

A ativação dos linfócitos T auxiliares é um pré-requisito para a criação local de anticorpos específicos para as bactérias que, periodicamente, emergem do SCR (BAUMGARTNER; FALKLER, 1991; KETTERING; TORABINEJAD; JONES, 1991). O anticorpo, em geral, possibilitará a opsonização efetiva da bactéria, seguida pela fagocitose e morte pelos macrófagos. Assim sendo, a função defensiva dos linfócitos T auxiliares também é, indiretamente, alcançada pela ativação dos linfócitos B, que se transformam em plasmócitos e produzem anticorpos (METZGER, 2000). As células T sintetizam e secretam uma variedade de citocinas pleiotrópicas (BUCY *et al.*, 1994). Nos estudos de Kawashima e Stashenko (1999), as citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 (IL-12 e IFN- γ), assim como as citocinas responsáveis pela reabsorção óssea nas lesões periapicais (IL-1 e TNF α), aumentaram em uma proporção linear, quatro semanas após a infecção. Já a expressão das citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 aumentou duas semanas após a infecção, com posterior declínio nos seus níveis. Esses dados sugerem que a inflamação mediada pelas citocinas provenientes das células Th1, geralmente, predominam em lesões ósseas inflamatórias e são, portanto, responsáveis pela potencialização da inflamação e reabsorção óssea na região periapical.

A IL-1 β é a citocina mais ativa e a sua capacidade de reabsorção óssea é cerca de 13 vezes a da IL-1 α e 1000 vezes a do TNF- α e *Tumor necrosis factor beta* (TNF- β) (STASHENKO *et al.*, 1987). Há indícios de que somente 2 a 3% dos macrófagos presentes nas lesões periapicais crônicas estão envolvidos na produção ativa de IL-1 (ARTESE, 1991; PIATTELLI, 1991). Wang e Stashenko (1993) mostraram que na lista de mediadores que podem ativar os osteoclastos e causar a reabsorção óssea periapical nas lesões periapicais crônicas, os principais são IL-1 β e TNF- β . O TNF- β é comumente considerado um produto dos linfócitos T ativados (PENNICA *et al.*, 1984). Kopp e Schwarting (1989) verificaram que somente 20% dos linfócitos T em granuloma periapical estavam ativos. Desse modo, não é o número total de linfócitos T ou macrófagos na lesão que é importante, mas sim o número de células ativas (METZGER, 2000). A ativação dos macrófagos, como parte da resposta imune adquirida, é realizada principalmente pela citocina IFN- γ ,

produzida pelos linfócitos Th1 ativados (MATSUO *et al.*, 1994). A IL-4, IL-5 e IL-6, secretadas principalmente pelos linfócitos Th2, ativam a resposta imune humoral. O desenvolvimento dos subgrupos Th é mutuamente regulado pela produção de suas citocinas. O IFN- γ induz a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th1 efectoras e a IL-4 leva ao desenvolvimento de células Th2 (MOSMANN; SAD, 1996). A IL-1 α e o IFN- γ aumentam a expressão das moléculas de adesão em células endoteliais *in vitro* (CARLOS; JHARLAN, 1994).

Segundo Walker *et al.* (2000), a resposta Th2 predomina sobre a Th1 nas lesões periapicais, pois há um número maior de células expressando IL-4 ou IL-6 em relação àquelas que expressam IL-2 ou IFN- γ . Hahn, Best e Tew (2000) observaram que em tecido pulpar inflamado, diferentes bactérias provocam tipos distintos de resposta imune, ou seja, em lesões cariosas superficiais, onde predominavam o *Streptococcus mutans*, prevaleceu uma resposta tipo Th1, já que a expressão do RNA mensageiro (RNAm) do IFN- γ era proeminente. Nas lesões cariosas com cavidades mais profundas, onde a espécie *Lactobacillus casei* predominava, a expressão do RNAm do IFN- γ revelou-se muito reduzida.

A fim de evitar uma ativação mútua sem fim entre macrófagos e linfócitos, o processo é ativamente controlado pelos linfócitos T supressores. Tanto os linfócitos T auxiliares quanto os supressores foram detectados em lesões periapicais (CYMERMAN *et al.*, 1984). Kopp e Schwarting (1989) encontraram uma razão de 3:2 entre linfócitos T auxiliares e supressores em granuloma periapical. Além disso, observaram um aumento de células T auxiliares CD4⁺, células T citotóxicas CD8⁺ e macrófagos nos cistos radiculares, em relação aos granulomas periapicais. Walker *et al.* (2000) observaram, entretanto, por intermédio da imunoistoquímica, que houve uma redução de células T CD4⁺ em cistos, quando comparados com granulomas periapicais. Stashenko e Yu (1989) demonstraram que durante as fases iniciais ativas de desenvolvimento da lesão, há um predomínio das células T auxiliares, enquanto no estágio mais tardio ou crônico da lesão, predominam os linfócitos T supressores. Kawashima *et al.* (1996) sugeriu que a progressão da lesão, com reabsorção óssea, requer células T auxiliares, enquanto as células T supressoras e os plasmócitos estão relacionados à cronicidade da lesão. As células T CD4⁺ apareceram em grande quantidade tanto no granuloma periapical quanto no tecido periapical em processo de regeneração. As células que produzem IFN- γ e IL-1 α foram detectadas no tecido de granulação, mas não no tecido em regeneração. Neste último, estavam presentes os

linfócitos Th2 e células tipo fibroblastos produtores de IL-4 e osteopontina (OPN), respectivamente (KAWASHIMA *et al.*, 1996). No entanto, Babal *et al.* (1987) relataram que a resposta imune humoral predomina sobre aquela mediada por células em granulomas periapicais.

2.2 Interferon-Gamma

O IFN- γ é produzido, principalmente, pelas células Th1 ativadas. Essa citocina ativa os macrófagos e, assim, o controle da ativação dos macrófagos está fortemente ligado ao controle da síntese de IFN- γ pelas células Th1. O RNAm do IFN- γ contém uma sequência de instabilidade (AUUUA)_n na sua região não codificada 3', que reduz grandemente a sua meia vida e limita o período de produção da citocina (SCHRODER *et al.*, 2004). A ativação dos macrófagos é marcadamente inibida pelo *Transforming growth factor beta* (TGF- β) e pela citocina IL-10, produzida por células CD4+ Th2. Sendo assim, a indução das células Th2 é importante para limitação da ativação dos macrófagos (MURPHY *et al.*, 2003).

Kusumi *et al.* (2004) detectaram a presença de IFN- γ em todas as amostras de cistos radiculares. Walker *et al.* (2000) observaram que os cistos radiculares apresentavam menor número de células Th1 em relação aos granulomas dentários. Sasaki *et al.* (2004) observaram que em granuloma periapical induzido em camundongos nocautes para o gene *IFNG*, a ausência do IFN- γ não exerceu efeito significativo na reabsorção óssea causada pela infecção, sugerindo uma redundância nas vias inflamatórias. Kawashima e Stashenko (1999) verificaram um aumento na transcrição dos genes *IFNG*, *IL-12* e *IL-2* nas lesões periapicais após a exposição pulpar, além de uma correlação entre os níveis de IL-1 α e os mediadores IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ .

No estudo de Kabashima *et al.* (2001) observou-se que o IFN- γ e a IL-1 α estavam presentes no granuloma periapical, mas a IL-4 não. Já na lesão periapical em processo de regeneração não havia IFN- γ e IL-1 α . Nestas estavam presentes a IL-4, que suprime a reabsorção óssea *in vitro* (WATANABE *et al.*, 1990) e estimula a expressão de RNAm de *alkaline phosphatase* (ALP), colágeno tipo I em células osteoblásticas e a síntese de OPN e osteocalcina (Oca), glicoproteínas não colagenosas, responsáveis pela mineralização da matriz óssea (RIANCHO *et al.*, 1993).

Colic *et al.* (2009) observaram que os níveis de IFN- γ e IL-17 em cultura de células mononucleares de lesão periapical — *Periapical lesion mononuclear cells* (PL-MNC) —,

provenientes de lesões periapicais sintomáticas se correlacionam positivamente, sugerindo que ambas as citocinas são importantes para a exacerbação da inflamação periapical.

Foi demonstrado que o IFN- γ , a IL-1 β ou o TNF α associados ao lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram negativas são potentes indutores de *inducible isoform nitric oxide synthases* (iNOS) (XIE *et al.*, 1992), aumentando a transcrição de iNOS nos cistos radiculares e, portanto, estimulando a produção de NO (*nitric oxide*) (XIE *et al.*, 1993). Kohara *et al.* (2011) observaram uma elevação dos níveis de NO em cultura de células da medula óssea de camundongos, tratada com IFN- γ , além da ampliação da expressão de iNOS. Como o NO causa um aumento na destruição tecidual (FEUERER *et al.*, 2006), um inibidor dessa substância poderia ser aplicado nos canais radiculares como terapia farmacológica para lesões periapicais (TAKEICHI *et al.*, 1999). Por outro lado, Ralston *et al.* (1995) verificaram que o IFN- γ inibe a reabsorção óssea induzida por citocinas, por gerar uma grande quantidade de NO, que exerce uma regulação bifásica na reabsorção óssea mediada por osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea em baixas concentrações e inibindo-a em altas (FEUERER *et al.*, 2006).

O IFN- γ apresenta, aparentemente, efeitos contraditórios na reabsorção óssea. Ele ativa macrófagos a produzir as citocinas IL-1 e TNF α , responsáveis pela reabsorção óssea (ARENZANA-SEISDEDOS; VIRELIZIER; FIERS, 1985), mas também inibe a reabsorção óssea induzida por essas citocinas em calvária de ratos (GOWEN; NEDWIN; MUNDY, 1986). Em calvária de camundongos pré-tratados com TNF- α e em cultura de células da medula óssea de ratos tratada com *receptor activator of nuclear factor kappa-beta* (RANKL) ou TNF- α , o IFN- γ inibe a osteoclastogênese (KOHARA *et al.*, 2011). Essa citocina também impede a formação de osteoclastos em cultura de células de medula óssea de camundongo, tratadas simultaneamente com *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), RANKL e diferentes doses de IFN- γ (GAO *et al.*, 2007). No estudo de Cheng *et al.* (2012), o IFN- γ , na concentração de 1.2 ng/mL, bloqueou completamente a osteoclastogênese. Todavia, quando as células foram pré-tratadas com RANKL, antes da adição do IFN- γ , numerosos osteoclastos foram formados (HUANG; O'KEEFE; SCHWARZ, 2003, CHENG *et al.*, 2012). Quando a cultura de células foi pré-tratada com IFN- γ , essa citocina prejudicou a diferenciação das células da medula em osteoclastos, em resposta à subsequente estimulação pela RANKL (CHENG *et al.*, 2012). Huang, O'Keefe e Schwarz (2003) relataram que a RANKL, mais expressa em granulomas periapicais que em tecidos saudáveis (MENEZES *et al.*, 2008), proporciona aos pré-osteoclastos

resistência ao IFN- γ pela indução da diferenciação terminal dessas células. Além disso, na perda óssea inflamatória, a exposição precoce à RANKL possibilita a formação de osteoclastos, mesmo na presença de altos níveis de IFN- γ , usando mecanismos independentes da sinalização pelas moléculas *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)1 e *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6). Takayanagi *et al.* (2000) afirmaram que o IFN- γ inibe a osteoclastogênese por degradar TRAF6, gerando a inativação das vias *c-jun-N-Terminal protein kinase* (JNK) e *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B). Contudo, outros estudos mostraram que o IFN- γ não era capaz de promover a degradação de TRAF6 (HUANG; O'KEEFE; SCHWARZ, 2003, CHENG *et al.*, 2012).

A RANKL media a osteoclastogênese por intermédio da regulação de alguns genes, entre eles, alguns marcadores típicos de osteoclastos como *matrix metalloproteinase* (MMP-9), *carbonic anhydrase* (Car2), *cathepsin K* (Ctsk) e *Tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) (RHO *et al.*, 2002). Cheng *et al.* (2012) revelaram que o IFN- γ foi capaz de inibir a expressão desses quatro genes, suprimindo a formação de osteoclastos. No entanto, observaram que esse efeito não ocorria quando os precursores de osteoclastos eram pré-tratados com RANKL.

Kohara *et al.* (2011) demonstraram que o IFN- γ causa apoptose de células da cultura ao observar que a morfologia das células tratadas somente com TNF- α era normal e que os núcleos das células da cultura tratadas com TNF- α e IFN- γ apresentavam-se fragmentados, característicos de células que sofreram apoptose. Nesse estudo, foi observado um aumento na expressão de *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), que é um membro da família TNF, capaz de promover a morte celular, e nenhuma modificação nos receptores TRAIL. Além disso, verificaram que a apoptose era acelerada diante da introdução de IFN- γ na cultura de células tratadas com TNF- α , por aumentar a expressão de *Fas ligand* (FasL) em osteoclastos.

Kotake *et al.* (2005) comprovaram que os linfócitos Th1 provocam a osteoclastogênese em cultura humana de monócitos na presença de M-CSF e que a formação de osteoclastos foi completamente interrompida, quando a osteoprotegerina (OPG) foi adicionada. Observaram, ainda, que o IFN- γ , introduzido na cultura, reduz a formação de osteoclastos de maneira dose-dependente, resultado também observado nos estudos de Gao *et al.* (2007). Além do mais, verificaram que o anticorpo anti-IFN- γ ,

também de forma dose-dependente, neutraliza o efeito do IFN- γ , estimulando a osteoclastogênese.

As células Th1 induzem a osteoclastogênese por meio da expressão da RANKL, desde que os efeitos indutores da RANKL excedam os efeitos inibitórios do IFN- γ (CHEN *et al.*, 2001; KOTAKE *et al.*, 2005; GAO *et al.* (2007).

A IL-27 suprime a osteoclastogênese pela indução do IFN- γ (PARK *et al.*, 2012). Esse estudo evidenciou que a IL-27 possui um efeito inibitório na *collagen induced arthritis* (CIA) em camundongos, por diminuir a osteoclastogênese. Os autores observaram que a formação de osteoclastos era inibida pela IL-27 por intermédio da via do IFN- γ , porque esse efeito não ocorria em camundongos nocautes para o gene *IFNG* ou em camundongos tratados com o anticorpo anti-IFN- γ .

O IFN- γ pode ser utilizado para controlar a movimentação dentária em razão de inibir a osteoclastogênese durante a movimentação ortodôntica (KOHARA *et al.*, 2012). Nesse estudo, a expressão do RNAm do IFN- γ e o número de osteoclastos aumentaram com a movimentação ortodôntica. Naqueles camundongos em que foi injetado o IFN- γ observou-se menor movimentação do dente e a formação de menor número de osteoclastos na área de reabsorção.

O IFN- γ é um potente indutor da expressão de MHC de classe II (SCHRODER *et al.*, 2004). Gao *et al.* (2007) revelaram que o pré-tratamento de *Antigen-presenting cell bone marrow-derived macrophages* (APC-BMMs) com *interferon-gamma recombinante* (rIFN- γ) levou a um aumento significativo da produção de TNF- α , RANKL e IFN- γ . Assim, com o estímulo da apresentação de antígenos pelos macrófagos, houve uma alta da produção de fatores osteoclastogênicos em consequência da ativação das células T. Nesse estudo, foram utilizados macrófagos de camundongos nocautes para o receptor IFN- γ , em que a atividade anti-osteoclastogênica direta do IFN- γ era, portanto, inviabilizada, e células T previamente ativadas *in vitro*. Observou-se que o número de osteoclastos formados no meio com IFN- γ foi duas vezes maior que no meio onde não foi introduzida a citocina. Quando o mesmo experimento foi realizado utilizando precursores de osteoclastos de camundongos *wild type*, as *antigen-presenting cells* (APCs) pré-tratadas com IFN- γ e as APCs não tratadas estimularam a formação da mesma quantidade de osteoclastos, sugerindo que o efeito pró-osteoclastogênico do IFN- γ é neutralizado pela atividade anti-osteoclastogênica do IFN- γ produzido pelas células T. Logo, o IFN- γ dificulta a osteoclastogênese, por reprimir a diferenciação de macrófagos em osteoclastos, mas,

indiretamente, ativa a formação de osteoclastos por meio da estimulação da apresentação de antígenos.

Outros estudos também comprovaram que o IFN- γ promove a formação de osteoclastos e incentiva a reabsorção óssea em humanos e em camundongos (MADYASTHA *et al.*, 2000). Mann *et al.* (1994) verificaram que injeção intra-peritoneal de IFN- γ provocou a osteopenia e Goodman *et al.* (1999) observaram que a administração sistêmica de IFN- γ causou perda de volume ósseo em ratos. Portanto, o IFN- γ possui ações contraditórias na osteoclastogênese e reabsorção óssea, dependendo do sistema e do modelo empregado.

Considerando o importante papel do IFN- γ na inflamação, as alterações na transcrição desse gene por meio de eventos epigenéticos como a metilação do DNA, podem influenciar a progressão e o desenvolvimento das doenças inflamatórias (GONSKY *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

2.3 Metilação do DNA

A metilação representa a adição do radical metil (CH₃) em regiões específicas do DNA, que contém, predominantemente, nucleotídeos citosina. Esse mecanismo exerce funções importantes no controle da expressão gênica, desenvolvimento embrionário, inativação do cromossomo-X e regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular (BIRD, 2002; ESTELLER, 2002).

Para que ocorra o processo de metilação é necessário que a citosina esteja na sequência 5'-CG-3', conhecida como dinucleotídeo CpG, em que se observa o nucleotídeo citosina seguido pela guanina, unidos entre si por uma ligação fosfodiéster (SINGAL, 1999). Os dinucleotídeos CpGs estão distribuídos heterogeneamente no genoma, encontrando-se principalmente em regiões de DNA altamente repetitivo e na heterocromatina (FAZZARI; GREALLY, 2004). Em cerca de 80% das vezes estão altamente metilados. No entanto, existem regiões no genoma, ricas em CpG, que não estão metiladas ou estão metiladas em baixa frequência. Trata-se de pequenas regiões do DNA variando entre 0,5 a 5 Kb, ocorrendo em média a cada 100 Kb, conhecidas como ilhas CpG. São encontradas nas extremidades 5' dos genes, geralmente na região promotora, mas podem estender-se para o interior do primeiro éxon. Entretanto, nem todas as ilhas

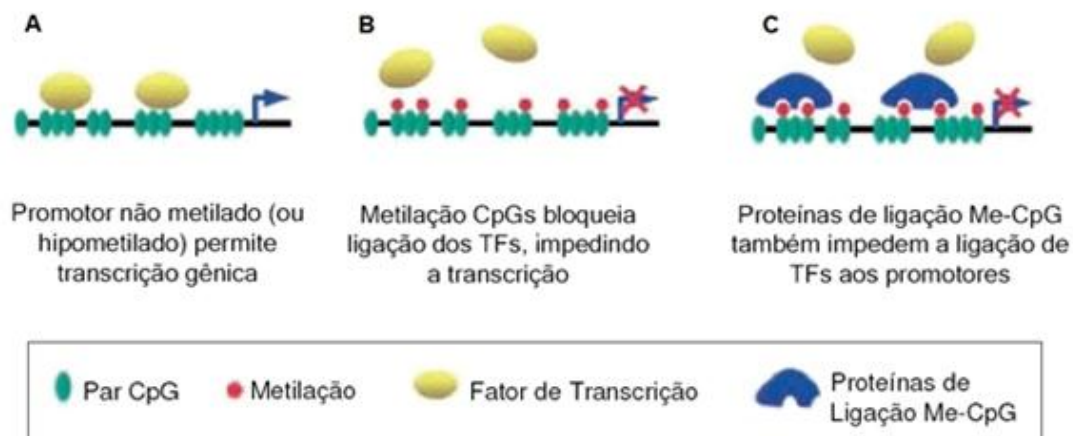
CpG localizam-se na região promotora do gene, podendo ser situadas no interior de éxons e íntrons (RUSH; PLASS, 2002).

As citosinas no DNA são convertidas em 5'metil-citosina pela ação de enzimas denominadas *DNA metiltransferases* (DNMTs). O grupo metil é doado pela S-adenosil-metionina (SAM), que é então convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) (GRØNBAEK; HOTHER; JONES, 2007).

Uma frequência maior de citosinas na região promotora pode intensificar o processo da metilação e, conseqüentemente, levar a um estado de silenciamento gênico. Esse mecanismo é capaz de reprimir a transcrição diretamente, pela inibição de fatores de transcrição ligados ao DNA e também, indiretamente, recrutando proteínas que ativam a enzima histona deacetilase, responsável por possuir complexos repressores do DNA metilado (JENUWEIN; ALLIS, 2001, ESTELLER, 2002; FRENCH *et al.*, 2002).

O mecanismo preciso pelo qual a metilação reprime a transcrição não é bem estabelecido. Uma teoria, relacionada ao silenciamento gênico pela metilação, é a da modificação da estrutura da cromatina, que bloqueia o acesso dos fatores de transcrição. Outra, corresponde ao bloqueio da transcrição, pela afinidade do DNA metilado a proteínas de ligação Me-CpG, que também impedem a ligação de TFs aos promotores (Figura 1), destacando a proteína de ligação metil-CpG (MeCP)1 e MeCP2. Nesse processo de silenciamento gênico, não só a metilação exerce uma influência; a deacetilação da proteína histona também instiga, sobremaneira, o mecanismo de modificação da estrutura da cromatina. A deacetilação das histonas é um mecanismo responsável por remover grupos acetil, levando ao enovelamento do DNA. Este, uma vez condensado em torno das histonas, compromete a ligação dos fatores de transcrição, podendo impedir a transcrição gênica. As citosinas metiladas tendem a recrutar histonas deacetilases, favorecendo a condensação do DNA (ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002; ENG; HERMAN; BAYLIN, 2000).

Figura 1 - Mecanismo de inibição da transcrição gênica por meio da metilação do DNA



Fonte: ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002.

Observa-se na figura 1A, que CpGs não-metilados permitem a ligação do DNA a fatores de transcrição (TFs), favorecendo a transcrição gênica. Na figura 1B, a transcrição é comprometida pela metilação dos CpGs, que bloqueia a ligação dos TFs ao DNA. A figura 1C mostra o bloqueio da transcrição pela afinidade do DNA metilado a proteínas de ligação Me-CpG, que também impedem a ligação de TFs aos promotores.

No mecanismo da metilação do DNA, três formas ativas de DNMTs foram identificadas em células de mamíferos, incluindo uma enzima de manutenção, a DNMT1, e duas enzimas que favorecem o processo da metilação *de novo*, destacando a DNMT3A e DNMT3B (HERMANN; GOWHER; JELTSCH, 2004). Embora tais enzimas atuem cooperativamente para estabelecer um padrão de metilação genômico, funções específicas são executadas pelas DNMTs. A metilação de manutenção, realizada pela DNMT1, ocorre, preferencialmente, pela adição de grupamentos metil a citosinas do DNA hemi-metilado, subsequente à replicação do DNA (LUCZAK; JAGODZIŃSKI, 2006). O processo da metilação *de novo*, realizado pela DNMT3A e DNMT3B, ocorre pela metilação do DNA não-metilado e hemi-metilado, com igual eficiência (HSIEH, 2000).

Os fatores que influenciam a expressão das DNMTs e a metilação em células humanas não são claramente determinados. Acredita-se que a idade pode alterar o padrão de metilação do DNA. Os mecanismos pelos quais esse fator leva ao aumento ou redução da metilação do DNA não são bem esclarecidos (RICHARDSON, 2003). Evidências apontam uma importante associação entre tabagismo e metilação, ou seja, a exposição a

fatores carcinogênicos do tabaco pode influenciar o processo de metilação do DNA (HASEGAWA *et al.*, 2002).

A infecção bacteriana (*C. rectus*) induz a hipermetilação da região promotora do gene *Insulin-like growth factor (igf2)* em camundongos (BOBETSIS *et al.*, 2007). Além disso, Yin e Chung (2011) observaram que a exposição a diferentes bactérias orais resulta em diferentes perfis de metilação. Por exemplo, quando células epiteliais foram expostas à *P. gingivalis*, os níveis de metilação do gene CD276, um imunorregulador, e o do gene elastase 2 — uma serina protease que apresenta função nas doenças inflamatórias — aumentaram. Contudo, verificou-se que os níveis de metilação da elastase 2 e *Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3* (GATA 3) após a exposição das células à *F. nucleatum* diminuíram.

2.3.1 Metilação do gene *IFNG*

Infecções virais e bacterianas podem produzir modificações no padrão de metilação do gene *IFNG* (MIKOVITS *et al.*, 1998; JUEDES *et al.*, 2004; VUILLERMIN *et al.*, 2009). O *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) provoca a hipermetilação do gene IFN- γ nas células T CD8+ (MIKOVITS *et al.*, 1998). A infecção com o vírus *Lymphocytic choriomeningitis* resulta na demetilação do gene *IFNG* em células T CD8+ virgens (JUEDES *et al.*, 2004). Vuillermin *et al.* (2009), em artigo de revisão, concluíram que a exposição microbiana na infância pode diminuir o risco de doenças alérgicas, por motivar a demetilação do gene *IFNG* de células T virgens. No linfoma de Burkitt, o gene *IFNG* mostra hipometilação associada a níveis aumentados de produção de IFN- γ (PANG *et al.*, 1992).

Gonsky *et al.* (2009) verificaram que uma redução de cerca de 5% na metilação das células T da mucosa gástrica de pacientes com doença inflamatória do intestino estava correlacionada a um aumento de três vezes na expressão de *IFNG*. Bonilla-Henao *et al.* (2005) verificaram que o uso de inibidores da metilação de DNA aumentou a transcrição de *IFNG* em células JURKAT e linfócitos T do sangue periférico.

A região promotora do gene *ifng* (Interferon-Gamma) de potros apresentava-se hipermetilada e sua demetilação foi correlacionada ao aumento da expressão no RNAm do *IFNG* e com a idade (SUN *et al.*, 2012).

O fumo passivo e a poluição ambiental estão associados à hipermetilação e à diminuição da expressão de IFN- γ em células T efetoras e de *transcription factor forkhead box P3* (Foxp3) em células T reguladoras de indivíduos entre sete e 18 anos sujeitos a essas situações (KOHLI *et al.*, 2012).

Nos estudos de Viana *et al.* (2011), somente algumas amostras de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica apresentavam-se não metiladas (11,11%), todavia, nenhuma associação foi encontrada entre a gravidade da doença periodontal e o padrão de metilação do DNA. O nível de metilação de todos os dinucleotídeos CpGs avaliados dentro da região promotora do gene *IFNG* foi menor em biópsias de periodontite crônica, em relação à gengiva saudável e à gengivite nos estudos de Zhang *et al.* (2010). Outras doenças inflamatórias, como a asma brônquica e a inflamação das vias aéreas apresentam a maioria dos dinucleotídeos CpGs do gene *IFNG* metilados (KWON *et al.*, 2008).

Em pacientes com atresia biliar, que apresentavam hipometilação da região promotora das células CD4+, foi observado um aumento na expressão do RNAm do *IFNG* (DONG *et al.*, 2011).

Cardoso *et al.* (2010) verificaram que cerca de 94% das amostras de polpa dentária inflamada apresentavam a região promotora do gene *IFNG* demetilada ou parcialmente metilada. Também, em todas as amostras de polpa dentária, que apresentavam metilação total da região promotora do gene *IFNG*, não havia transcrição de *IFNG*. Sendo assim, este trabalho mostrou fortes evidências da possível participação de eventos epigenéticos no desenvolvimento da inflamação pulpar.

Apesar de diversos estudos salientarem o impacto da metilação na expressão do RNAm do *IFNG*, ainda não foram realizadas pesquisas para avaliar o padrão de metilação do gene *IFNG* e seus efeitos em lesões inflamatórias periapicais, como o granuloma periapical e o cisto radicular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os aspectos moleculares do gene *IFNG* no granuloma periapical e no cisto radicular.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o padrão de metilação do gene *IFNG* no granuloma periapical e no cisto radicular;
- Comparar o perfil de metilação entre o granuloma periapical e o cisto radicular;
- Investigar a associação do padrão de metilação com a transcrição do gene *IFNG* no granuloma periapical e no cisto radicular;
- Averiguar se há diferença na expressão do RNAm do gene *IFNG* no granuloma periapical em relação ao cisto radicular;
- Pesquisar, no granuloma periapical e no cisto radicular, a associação entre o número de células inflamatórias e o padrão de metilação do gene *IFNG*;
- Avaliar, no granuloma periapical e no cisto radicular, a associação do padrão de metilação do gene *IFNG* com a imunolocalização da proteína;
- Averiguar a correlação entre o número de células inflamatórias, células imunomarcadas e os níveis de RNAm do gene *IFNG*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 1), obedecendo à resolução brasileira do Conselho Nacional de Saúde CNS nº 196/96, que dispõe sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

4.2 Desenho do estudo

Este trabalho trata-se de um estudo transversal.

O universo da pesquisa envolveu indivíduos assistidos na Clínica de Cirurgia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG, que apresentavam evidência radiográfica de perda óssea na região periapical do dente com necrose pulpar e com indicação de exodontia. Foram excluídos do estudo pacientes que utilizaram anti-inflamatórios e antibióticos nos dois meses anteriores à data da coleta e aqueles portadores de doenças sistêmicas. As questões éticas foram obedecidas e o paciente e/ou responsável foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa. Solicitou-se a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), específico, de acordo com a idade do paciente (Apêndices 1 e 2).

Participaram da pesquisa 29 indivíduos, foram coletadas 16 amostras de granulomas periapicais e 13 de cistos radiculares. Cada uma das espécimes foi imediatamente seccionada em três partes iguais. Uma delas foi armazenada em Tissue-tek (*Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA*) e mantida a -80°C até extração do DNA. O segundo fragmento foi armazenado em RNA Holder (*BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brazil*) e mantido a -80°C até a extração do *ribonucleic acid* (RNA). O último fragmento foi inserido em solução de Formaldeído a 10%, processado e incluído em parafina, para ser submetido à análise histopatológica e imunoistoquímica.

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Diagnóstico das lesões periapicais

O diagnóstico baseou-se em critérios clínicos, radiográficos e histopatológicos. O dente a ser extraído deveria responder negativamente aos testes de sensibilidade pulpar e, radiograficamente, apresentar uma área radiolúcida, bem delimitada, próxima à sua região periapical. Histopatologicamente, as lesões periapicais eram diagnosticadas como granuloma periapical quando não apresentavam epitélio odontogênico e como cisto radicular quando exibiam uma cavidade cística limitada por epitélio odontogênico.

4.3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado de amostras congeladas utilizando o kit Qiagen DNeasy Tissue Kit (*Qiagen Inc., Valencia, CA, USA*), segundo as instruções do fabricante.

O DNA foi quantificado e verificou-se a sua viabilidade por intermédio de reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* específicos para o gene da β -globina (F: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' e R: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final por 7 minutos.

4.3.3 Extração de RNA

O RNA total foi isolado de amostras de tecido congelado, utilizando o reagente TRIzol® (*Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA*), de acordo com a especificação do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria e a sua pureza considerada satisfatória quando apresentava de 1,8 a 2,0 (leitura 260/280). Além disso, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de Agarose 1%, contendo a solução reveladora Gelred, sensível à luz ultravioleta (*Biotium, Hayward, CA*). Foram identificadas duas bandas distintas que representam o RNA ribossomal (28S e 18S), e confirmam a viabilidade do RNA (Apêndice 3).

4.3.4 Análise da metilação do gene *IFNG*

A metilação do gene *IFNG* foi verificada por meio da técnica MSP-PCR (*methylation-specific PCR*). O DNA foi tratado com o bissulfito de sódio, como descrito por VIANA *et al.* (2011). As citosinas não-metiladas foram convertidas em uracila por

meio de uma reação de deaminação, enquanto as citosinas metiladas foram resistentes a essa modificação. Após esse tratamento, verificou-se a viabilidade do DNA mediante a amplificação de um fragmento do gene *ACTB* (*actin, beta*) (NM 001101), utilizando os seguintes *primers* F: 5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3' e R: 5'-;PIIIII pós-tratamento *in silico* com bissulfito de sódio, no software Methprimer (LI; DAHIYA, 2002).

As amostras tratadas pelo bissulfito foram então submetidas ao MSP-PCR, usando dois pares de *primers*, um específico para o DNA não metilado (5'-GTG ATA ATG GGT TTG TTT TAT T-3' e R: 5'-CCT AAT TAA AAT CTC CTA AAA ATT ACA TA-3') e outro para o DNA metilado (F: 5'-GTG GGT ATA ATG GGT TTG TTT TAT C-3' e R: 5' AAT TAA AAT CTC CTA AAA ATT ACG TA-3') (BONILLA *et al.*, 2005). Para uma reação com volume final de 25µL foram utilizados 1X PCR buffer, 2.5mM MgCl₂, 5 µLdNTP (1mmol/L cada), 1µM de cada *primer* e 1 unidade de Taq polymerase (*AmplyTaq Gold; PE Applied Biosystems, Foster City, CA*). As condições térmicas de amplificação foram 12 minutos a 95 °C, 10 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 1 minuto a 50° C e 3 minutos a 68° C, seguido de 25 ciclos de 15 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 3 minutos a 68° C, acrescentando o tempo de extensão em cada ciclo por 20 segundos.

A amostra era considerada não metilada quando havia amplificação somente para o *primer* específico para DNA não metilado. Nas amostras parcialmente metiladas, havia amplificação tanto para o *primer* para DNA não metilado quanto para o *primer* para DNA metilado. Nas amostras totalmente metiladas, a amplificação era positiva somente para o *primer* específico para DNA metilado (GOMES *et al.*, 2011) (Apêndice 4). Células mononucleares de sangue periférico tratadas pelo bissulfito foram usadas como controle positivo para as reações não metiladas. Outras células do mesmo tipo tiveram o DNA metilado pela enzima *MSsI Methylase* (*New England Biolabs, Beverly, USA*). Em seguida, estas últimas foram tratadas com o bissulfito e usadas como controle positivo da reação metilada (CARDOSO *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2011, FARIAS *et al.*, 2012).

4.3.5 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para o gene *IFNG*

A técnica de PCR quantitativo em tempo real, para verificar a expressão gênica do *IFNG*, foi realizada após a extração do RNA total e sua conversão em *complementary DNA* (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa, conforme descrito a seguir.

4.3.5.1 Síntese do cDNA e transcrição reversa

O Kit SuperScript First-Strand Synthesis System para RT-PCR (*real time polymerase chain reaction, Invitrogen, USA*) foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA total, tratado com DNase (*Invitrogen, USA*). Ao RNA equivalente a 8 µl, foram adicionados 1 µl de Oligo(dT) (50 µM) e 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após esse período, a mistura permaneceu no gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 2 µl de tampão específico 10X concentrado, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNase OUT (40U/ml) e 1 µl da enzima SuperScript III RT (200U/ml). Imediatamente, a mistura de amostra e reagentes foi incubada a 50 °C durante 50 minutos, seguido por 85 °C por 5 minutos. Um µl da enzima Ribonuclease (RNase) H foi adicionado para remover a fita de RNA complementar ao cDNA. Logo após, as amostras foram aquecidas a 37 °C por 20 minutos e o conteúdo final foi diluído em água livre de RNase e armazenado a -20 °C.

4.3.5.2 Quantificação relativa do gene IFNG

A expressão quantitativa dos níveis de transcrição do gene *IFNG* foi analisada por meio da técnica qRT-PCR, utilizando-se o sistema TaqMan Gene Expression Assays (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) e o equipamento Step-One Real-time PCR 48-well plate (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). A reação foi padronizada, usando-se 500 ng de cDNA em volume final de 20 µl, nas condições recomendadas pelo fabricante (50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Foi adotado o método da quantificação relativa para avaliar os níveis de transcrição do gene *IFNG* (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Utilizou-se como controle endógeno das reações o gene *large ribosomal protein* (RPLPO), n.º 4333761F (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Um conjunto (*pool*) de amostras de sangue de indivíduos saudáveis foi usado como amostras calibradoras. A expressão gênica foi calculada empregando-se o método 2- $\Delta\Delta$ Ct (*Applied Biosystems User Bulletin n.º 2*) como previamente descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O método 2- $\Delta\Delta$ Ct ou *Threshold cycle* (Ct) é uma

equação matemática, na qual as mudanças na expressão gênica são calculadas com base nas diferenças entre as calibradoras e as experimentais, normalizadas por uma amostra de referência. O valor inferido para ΔCt equivale às diferenças entre o valor da média dos Cts do gene de interesse (alvo) e a média dos Cts do gene normalizador (endógeno). O cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor do ΔCt para as amostras calibradoras.

4.3.6 Imunoistoquímica para a proteína *IFNG*

As amostras incluídas em parafina foram cortadas em secções de 5 μm e, posteriormente, coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para a avaliação histológica. A contagem das células inflamatórias foi realizada em microscópio óptico com ampliação de 400X, considerando o maior número de campos possíveis de cada corte. O número de campos passíveis de avaliação variou entre dois e seis, dependendo do tamanho do fragmento.

As reações de imunoistoquímica foram realizadas em todas as amostras. Inicialmente, foram desparafinizadas e hidratadas e, em seguida, submetidas à recuperação antigênica com uma solução Trilogy Solution® (*Cell Marque, Rocklin, CA, USA*) a 98 °C, durante 20 minutos, em uma panela a vapor. Logo após, os cortes foram incubados em solução de peróxido de hidrogênio para bloqueio da peroxidase endógena.

As secções foram incubadas com anticorpo primário anti IFN- γ policlonal (*ab 9657, Abcam, Cambridge, UK*), na diluição 1:200, por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, as lâminas foram lavadas com Tris-HCl e incubadas com o sistema de detecção Envision (*Dako® Corporation, Carpinteria, CA, USA*). As reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina (*Sigma, St Louis, MO, USA*), contracoradas com hematoxilina de Mayer e montadas em Permount (*Fischer Scientific, NJ, USA*). Realizou-se manualmente todas as reações de imunoistoquímica, usando-se lesões orais de líquen plano, com reatividade conhecida para o anticorpo primário como controle positivo das reações. Como controle negativo, efetuaram-se reações nas quais omitia-se o anticorpo primário. A expressão da proteína foi avaliada com base na quantidade de imunomarcção nuclear em leucócitos. Foi obtida, em seguida, a percentagem de células imunomarcadas em relação ao infiltrado inflamatório total.

4.3.7 Análise estatística

O Teste Exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre as variáveis categóricas. Efetuou-se Teste de Shapiro-Wilk para analisar a distribuição de todas as variáveis quantitativas. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi usado para comparar dois grupos de casos e uma variável. O coeficiente de correlação Serman avaliou a associação entre as variáveis contínuas. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 17.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com valor de $p < 0,05$.

5 ARTIGO

O artigo dessa seção foi publicado no periódico Journal of Endodontic (ISSN 0099-2399, Fator de impacto: 2.929), conforme abaixo.

Basic Research—Biology

Methylation Pattern of *IFNG* in Periapical Granulomas and Radicular Cysts

Kelma Campos, DDS, MSc,* Carolina Cavaliéri Gomes, DDS, PhD,[†]
 Jeane de Fátima Correia-Silva, DDS, PhD,* Lucyana Conceição Farias, DDS, PhD,*
 Thiago Fonseca-Silva, DDS, MSc,* Vanessa Fátima Bernardes, DDS, PhD,*
 Cláudia Maria Pereira, DDS, PhD,* and Ricardo Santiago Gomez, DDS, PhD*

Abstract

Introduction: Interferon- γ plays an important role in the pathogenesis of periapical lesions, and the methylation of *IFNG* has been associated with transcriptional inactivation. The purpose of the present study was to investigate *IFNG* promoter methylation in association with gene transcription and protein levels in periapical granulomas and radicular cysts. **Methods:** Methylation-specific polymerase chain reaction was used to assess the DNA methylation pattern of the *IFNG* gene in 16 periapical granulomas and 13 radicular cyst samples. The transcription levels of *IFNG* mRNA were verified by quantitative real-time polymerase chain reaction, and protein expression was evaluated by immunohistochemistry. **Results:** All the periapical lesion samples exhibited partial or total methylation of the *IFNG* gene. In addition, an increased methylation profile was found in radicular cysts compared with periapical granulomas. Increased *IFNG* mRNA expression was observed in the partially methylated periapical lesion samples relative to the samples that were completely methylated. **Conclusions:** The present study provides the first evidence of the possible impact of *IFNG* methylation on *IFNG* transcription in periapical lesions. (*J Endod* 2013;39:493–496)

Key Words

Interferon-gamma, methylation, periapical granuloma, periapical lesion, radicular cyst

From the *Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; and [†]Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MS/SCITIE/Decit, and the Pró-Reitoria de Pesquisa (Universidade Federal de Minas Gerais), Brazil. Professor R. S. Gomez is a research fellow of CNPq.

Address requests for reprints to Dr Ricardo Santiago Gomez, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270 901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail address: rsomez@ufmg.br
 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2013 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.026>

Periapical lesions are a group of immune inflammatory diseases that occur as a result of pulp necrosis, which may be caused by caries, trauma, or iatrogenic procedures (1). The presence of viable microorganisms in the root canal system is considered to be the main requirement for the development of periapical lesions (2). These lesions can show concomitant resorption of hard tissues and the destruction of the periradicular periodontal ligament (3, 4).

Several studies regarding human periapical lesions have indicated cytokines as mediators of bone resorption and lesion development (5, 6). Interferon (IFN)- γ , encoded by the *IFNG* gene and mainly secreted by Th-1 lymphocytes, plays a central role in the containment of infection and represents one of the most efficient cytokines for the triggering of antimicrobial activity in macrophages (7). In addition, IFN- γ has been associated with contradictory actions on bone resorption and osteoclastogenesis (8). It has been reported that IFN- γ may inhibit (9, 10) or accelerate bone resorption *in vivo* (11, 12). Considering the important role of this cytokine in inflammation, alterations in *IFNG* mRNA expression through DNA methylation may influence the progression and development of inflammatory diseases (13–15). However, there is no information concerning epigenetic alterations of the *IFNG* gene in periapical lesions.

DNA methylation is the most common epigenetic event, which is characterized by the addition of the methyl group on cytosine within cytosine-phosphate-guanine (CpG) regions (16). Unmethylated CpG islands are related by a transcriptionally active structure, whereas methylated DNA recruits methyl-binding proteins, leading to chromatin compaction and preventing the binding of transcription factors (17, 18). Studies have reported the importance of methylation in the pathogenesis of some inflammatory diseases such as chronic gastritis (19), airway inflammation (20), periodontitis (21, 22), and bronchial asthma (23). In addition, a previous study conducted in our laboratory showed that DNA methylation may be relevant to *IFNG* transcription in human dental pulp (13). Because of the importance of IFN- γ in the pathogenesis of periapical lesions, the purpose of the present study was to investigate *IFNG* gene methylation, together with gene transcription, at the mRNA and protein levels in periapical granulomas and radicular cysts.

Materials and Methods

Patients and Tissue Samples

This study was approved by the Research Ethics Committee from the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE -0462.0.203.000-11), and the patients signed informed consent forms.

Sixteen periapical granulomas and 13 radicular cyst samples were included in the study. The subjects were patients with radiographic evidence of periapical alveolar bone loss and with an indication for tooth removal. The patients had not taken any medications for 2 months before the surgery, and they were apparently free of systemic diseases. All samples were obtained from teeth without pulpal sensitivity and without endodontic treatment. Samples were collected during surgical care in the Department of Oral Surgery and Pathology. Each sample was immediately sectioned into 3 equal parts. The first part of the lesion was stored in Tissue-tek (Sakura Finetek Inc, Torrance, CA) at -80°C for DNA extraction. The second fragment was stored in RNA Holder

Basic Research—Biology

TABLE 1. Distribution of Samples According to *IFNG* Methylation Status, mRNA Levels, Number of Inflammatory Cells, and Percentage of IFN- γ Immunostained Cells

	Periapical granulomas	Radicular cysts	<i>P</i> value
Methylation			
n	16	13	
Totally methylated	2 (12.5%)	7 (53.8%)	.041*
Partially methylated	14 (87.5%)	6 (46.2%)	
<i>IFNG</i> mRNA levels			
n	14	9	
Median (range)	0.72 (0.17–10.84)	0.52 (0.14–2.92)	NS [†]
Inflammatory cells			
n	16	13	
Median (range)	350.38 (105–551.33)	340.5 (101.5–669.0)	NS [†]
Immunohistochemistry			
n	16	13	
Median (range)	89.73 (66.47–97.48)	84.04 (47.44–98.21)	NS [†]

NS, not significant.

*Fisher exact test.

[†]Mann-Whitney *U* test.

(BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brazil) for RNA extraction, and the third part was placed in a formaldehyde solution, embedded in paraffin, and submitted to histopathologic and immunohistochemical analysis.

The diagnoses were based on clinical, radiographic, and histologic criteria. The periapical lesions included in the periapical granuloma group did not present odontogenic epithelium. The lesions were classified as radicular cysts when they exhibited a cystic cavity lined by odontogenic epithelium (24). The periapical granuloma group was composed of 7 male and 9 female patients (age range, 16–75 years). The radicular cyst group was composed of 7 male and 6 female patients (age range, 16–75 years).

DNA Isolation and Methylation Analysis of the *IFNG* Gene

Genomic DNA was extracted from frozen tissue samples by using the Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. To assess the methylation of *IFNG* CpG dinucleotides, genomic DNA was modified by sodium bisulfite treatment, as described elsewhere (22). The treated samples were submitted to methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) by using previously described primer pairs that target promoter region CpG from the *IFNG* gene (25). A sample was considered to be non-methylated when only the unmethylated target primers were amplified; in partially methylated samples, both PCR reactions were amplified; and in totally methylated samples, only the methylated specific primer reactions were positive (26). Bisulfite-treated unmethylated DNA of peripheral blood mononuclear cells was used as a positive control of the unmethylated reaction, and the methylation-induced DNA of same cells, treated with MspI methylase enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA) and bisulfite, was used as a positive control of the methylated reaction, similarly to previous reports (13, 22, 27).

RNA Extraction and Quantitative PCR

Because of the minute amount of tissue available, the extraction of RNA was not possible in all samples. The total RNA was extracted from 13 periapical granulomas and 9 radicular cysts by using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. RNA integrity was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Reverse transcription of 1 μ g RNA to cDNA was performed by using SuperScript III First-Strand (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR (quantitative PCR) was performed by using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a step-one real-time PCR 48-well plate (Applied Biosystems, Warring-

ton, UK). Relative gene expression was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method as previously described (28). The data were presented as the relative quantity of target *IFNG* normalized to endogenous RPLPO (large ribosomal protein) (Applied Biosystems) and relative to a calibrator sample. As the calibrator, we used a pool of blood samples of healthy individuals to ensure that the reaction occurred properly in different experiments. All reactions were run in duplicate.

Histopathologic Evaluation and Immunohistochemistry

Hematoxylin-eosin sections of 5 μ m were histopathologically evaluated. The histologic sections were submitted to inflammatory cell counting in $\times 400$ magnification. The number of fields considered ranged from 2–6, depending on the size of each sample. Immunohistochemistry was performed in 16 periapical granulomas and 13 radicular cysts by using anti-human IFN- γ (ab 9657; Abcam, Cambridge, UK) at a 1:200 dilution under standard procedures. The deparaffinization, hydration, and antigen retrieval of the slides were performed as described elsewhere (29). Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was used as chromogen, and the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). All immunostainings were performed manually, and oral lesions with known reactivity to the primary antibody were used as positive controls. Negative controls were run with the omission of the primary antibody, resulting in no detectable staining. The expression of the protein was evaluated on the basis of the extent of nuclear immunolabeling in leukocytes in high-power fields ($\times 400$), independent of staining intensity. The number of considered fields ranged from 2–6 in each sample. The percentage of the IFN- γ immunostained cells was obtained.

Statistical Analysis

The Fisher exact test was used to evaluate the association between variables for categorical data. The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the distribution of all quantitative variables. Nonparametric Mann-Whitney test was used to compare 2 groups of cases on 1 variable. Nonparametric Spearman correlation test was used to assess the association between continuous variables. Statistical analyses were performed by using SPSS 17.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL), and *P* values $< .05$ were considered to be statistically significant.

Results

The distribution of the samples according to *IFNG* methylation status, mRNA levels, number of inflammatory cells, and percentage of IFN- γ immunostained cells are shown in Table 1. All the periapical

Basic Research—Biology

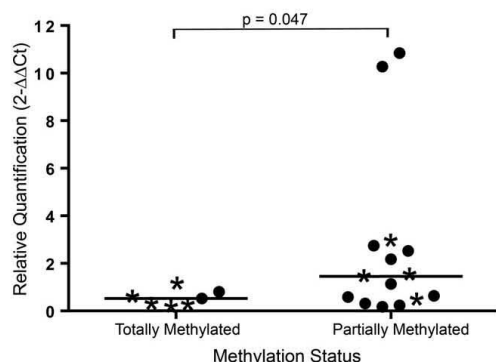


Figure 1. Association between relative quantification of *IFNG* mRNA and the methylation status of the *IFNG* gene in periapical granulomas and radicular cysts. (●, periapical granuloma; *, radicular cyst). Mann-Whitney *U* test, statistically significant difference, $P < .05$.

lesions exhibited partial or total methylation of the promoter region of the gene. In addition, an increased methylation profile was found in radicular cysts compared with periapical granulomas ($P = .041$).

The *IFNG* mRNA expression in periapical granulomas was not significantly different from that in radicular cysts. Increased mRNA expression levels were observed in the partially methylated periapical lesions (periapical granuloma + radicular cyst) compared with the totally methylated samples (periapical granuloma + radicular cyst) ($P = .047$) (Fig. 1). No association was found between the methylation status and the number of inflammatory cells in either periapical granulomas or radicular cysts. In addition, the number of IFN- γ immunostained cells was not different between partially and totally methylated samples (data not shown). No correlation was found among the number of inflammatory cells, the number of IFN- γ positive cells, and the *IFNG* mRNA levels in any of the lesion groups (data not shown).

Discussion

The methylation pattern of the promoter region CpG from the *IFNG* gene was evaluated in our study. All the lesions presented partial or total methylation of the promoter region of the gene, which suggests that this epigenetic alteration is a common alteration in periapical inflammatory lesions. In addition, we found an increased methylation profile in radicular cysts compared with periapical granulomas. Because the immunopathologic mechanisms involved in cyst development and its relationship with periapical granulomas are controversial (30), the biological significance of *IFNG* gene methylation in radicular cyst development is only speculative, and we cannot make any conclusions regarding a cause and consequence of this alteration to the formation of these lesions. Another important variation between periapical granulomas and radicular cysts that may potentially influence the methylation status is bacterial infection. Bobetsis et al (31) observed that bacterial infection (*Campylobacter rectus*) induces hypermethylation of the placental *igf2* promoter of mice. In addition, Yin and Chung (32) observed that exposure to different oral bacteria results in differential methylation profiles. For example, when gingival epithelial cells were exposed to *Porphyromonas gingivalis*, increases were observed in the methylation levels of the *CD276* gene, an immune regulator, and of the *elastase*

2 gene, a serine protease that has a role in inflammatory diseases, among others. On the other hand, it was verified that the methylation levels of *elastase 2* and *GATA 3* decreased after cells were stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. Therefore, one possible explanation for the differing methylation statuses among periapical lesions may be the prevalence of different bacteria in both lesions.

An important finding in the present study was the inverse association that was found between *IFNG* mRNA levels and the methylation status of the periapical lesions. In other words, the lesions that showed total methylation presented decreased expression of the cytokine. This finding was previously demonstrated in inflammatory bowel disease (14), dental pulp inflammation (13), and chronic periodontitis (15). The inability of transcription factors to bind to their DNA binding sites when methylated has been proposed as a possible mechanism of gene silencing, and it may provide one possible explanation for the transcriptional down-regulation of this gene (31). Therefore, our study suggests that epigenetic regulation of *IFNG* transcription may be involved in the modulation of IFN- γ secretion in periapical lesions.

The present research shows evidence that the methylation of the *IFNG* gene is a frequent event in periapical lesions and that the methylation of the gene is associated with distinct mRNA transcription levels of the gene. These findings suggest that epigenetic mechanisms might be important to *IFNG* modulation in periapical lesions.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

- Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small: understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 2007;52:S38–51.
- Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44:55–66.
- Zecchi-Orlandini S, Fornigili L, Giannelli M, et al. Radicular cysts are involved in the recruitment of osteoclast precursors. *J Oral Pathol Med* 1996;25:325–30.
- Stashenko P, Teles R, Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:498–521.
- Fukata SY, Silva TA, Garlet GP, et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:25–31.
- Teixeira-Salim TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, et al. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2010;39:250–6.
- Maeda I, Gasperini S, Ceska M, et al. Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. *Cell Immunol* 1994;157:448–61.
- Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, et al. IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol Lett* 2011;137:53–61.
- Sato K, Satoh T, Shizume K, et al. Prolonged decrease of serum calcium concentration by murine gamma-interferon in hypercalcemic, human tumor (EC-GI)-bearing nude mice. *Cancer Res* 1992;52:444–9.
- Thokin M, Kakudo S, Kasai H, et al. Comparative study of inhibitory effects by murine interferon gamma and a new bisphosphonate (alendronate) in hypercalcemic, nude mice bearing human tumor (LJC-1-JCK). *Cancer Immunol Immunother* 1994;39:155–60.
- Goodman G, Dissanayake I, Gorodetsky E, et al. Interferon-alpha, unlike interferon-gamma, does not cause bone loss in the rat. *Bone* 1999;25:459–63.
- Madyasha PR, Yang S, Ries WL, et al. IFN-gamma enhance osteoclasts generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:645–52.
- Cardoso FP, Viana MB, Ribeiro Sobrinho AP, et al. Methylation pattern of the IFN- γ gene in human dental pulp. *J Endod* 2010;36:642–6.
- Gonsky R, Deem RL, Targan SR. Distinct methylation of *IFNG* in the gut. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:407–14.
- Zhang S, Crivello A, Offenbacher S, et al. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:953–61.

Basic Research—Biology

16. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427–40.
17. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187–91.
18. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457–63.
19. Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastric, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003;163:1551–6.
20. Adcock IA, Tsaprouni L, Bhavsar P, et al. Epigenetic regulation of airway inflammation. *Curr Opin Immunol* 2007;19:694–700.
21. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol* 2008;79:1577–84.
22. Viana MB, Cardoso FB, Diniz MG, et al. Methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in periodontal tissues. *Immunobiology* 2011;216:936–41.
23. Kwon NH, Kim JS, Lee JY, et al. DNA methylation and expression of IL-4 and IFN- γ promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol* 2008;28:139–46.
24. Peixoto RF, Pereira J dos S, Nonaka CF, et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol* 2012; 57:1159–64.
25. Bonilla-Henao V, Martinez R, Sobrinho F, et al. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN- γ in human lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2005;78:1339–46.
26. Gomes CC, Diniz MG, Oliveira CS, et al. Impact of WWOX alterations on p73, Δ Np73, p53, cell proliferation and DNA ploidy in salivary gland neoplasms. *Oral Dis* 2011; 17:564–71.
27. Farias LC, Gomes CC, Rodrigues MC, et al. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma. *BMC Clin Pathol* 2012;12:11.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
29. Amaral FR, Bernardes VF, Duarte AP, et al. Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. *Tumour Biol* 2011;32:997–1003.
30. Torabinejad M, Bakland LK. Immunopathogenesis of chronic periapical lesions: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46:685–99.
31. Bohetsis YA, Barros SP, Lin DM, et al. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res* 2007;86:169–74.
32. Yin L, Chung WO. Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunol* 2011;4:409–19.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho, que visou, principalmente, verificar o padrão de metilação do gene *IFNG* e a possível associação do perfil encontrado com a transcrição e com a expressão da proteína no granuloma periapical e no cisto radicular, foi possível concluir que as lesões periapicais pesquisadas apresentavam-se metiladas ou parcialmente metiladas e que nenhuma das amostras apresentou perfil não metilado. Além disso, as amostras metiladas demonstraram menor transcrição do gene *IFNG* em relação às aquelas parcialmente metiladas. Em razão da importância do IFN γ nas reações inflamatórias, faz-se necessário investigar o impacto da ação da metilação e, conseqüentemente, da expressão desse gene na patogênese das lesões periapicais. Ademais, outros importantes genes envolvidos na reação inflamatória e que são susceptíveis à regulação epigenética como o IL-6 (NILE *et al.*, 2008; PROVENÇAL *et al.*, 2013), a MMP-2 (FARIAS *et al.*, 2012), a MMP-9 (CHICOINE *et al.*, 2002; FARIAS *et al.*, 2012), o TNF- α (GOMEZ-URIZ *et al.*, 2014), o Foxp3 (PION *et al.*, 2013; MORIKAWA *et al.*, 2014), a IL1, a IL-4, a IL-8 e a IL-10 (PROVENÇAL *et al.*, 2013) também deverão ser estudados em amostras de lesões periapicais.

Não foi encontrada associação entre o padrão de metilação nem correlação entre a expressão do RNAm do gene *IFNG*, e o número de células inflamatórias. De acordo com Kopp e Schwarting (1989), somente 20% dos linfócitos T em amostras de granuloma periapical estudadas estavam ativos, em estudo similar. Desse modo, não é o número total de linfócitos T ou macrófagos na lesão que é importante, mas sim o número de células ativas (METZGER, 2000). E, ainda, diferentes tipos celulares apresentaram papéis distintos quanto à produção de citocinas. Como exemplo, durante a contagem do número total de leucócitos incluíram-se células produtoras de IFN γ , como linfócitos Th1 e natural killer, mas também células não produtoras como Linfócitos B.

A falta de associação entre o padrão de metilação e o número de células imunomarcadas pode ser devido ao fato de a imunoistoquímica ser uma técnica basicamente qualitativa e não quantitativa, apesar de muito usada em pesquisa, em diagnóstico e para avaliar biomarcadores terapêuticos (WALKER, 2006). O mesmo motivo pode explicar a falta de correlação entre a expressão do RNAm do *IFNG* e o número de

células imunomarcadas. Portanto, outras técnicas que forneçam dados quantitativos deverão ser utilizadas.

A ausência de correlação entre transcrição e expressão de proteína pode ser explicada pela ação de outros mecanismos epigenéticos como os MicroRNAs (miRNAs). Os miRNAs 155 e 146a interferem na expressão do IFN- γ (DAI *et al.*, 2008; BANERJEE *et al.*, 2010; HUFFAKER *et al.*, 2012; TROTTA *et al.*, 2012). Dessa forma, a sua presença e o seu impacto sobre a expressão do IFN- γ nas lesões periapicais também deverão ser investigados.

Os dados sobre metilação do gene *IFNG*, além daqueles presentes na literatura, sugerem que eventos epigenéticos podem modular o perfil da resposta imune em lesões periapicais inflamatórias. Sendo assim, marcadores epigenéticos podem representar uma ferramenta terapêutica promissora e de grande potencial para pesquisa.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. A. *et al.* Epigenetic regulation of airway inflammation. **Curr Opin Immunol.** 2007; 19:694-700.

AKAMINE, A. *et al.* Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.** 1994; 10:121-8.

ARENZANA-SEISDEDOS, F.; VIRELIZIER, J. L.; FIERS, W. Interferons as macrophage-activating factors. III. Preferential effects of interferon-gamma on the interleukin 1 secretory potential of fresh or aged human monocytes. **J Immunol.** 1985; 134:2444-8.

ARTESE, L. *et al.* Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. **J Endod.** 1991; 17:483-7.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci.** 2002; 59:241-57.

BABAL, P. *et al.* In situ characterization of cells in periapical granuloma by monoclonal antibodies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1987; 64:348-52.

BALDASSO, F. E. *et al.* Microflora associated with primart endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiografic fidings. **Microsc Res Tech.** 2012; 000-000.

BARNEJEE, A. *et al.* Micro-RNA-155 inhibits IFN- γ signaling in CD4⁺ T Cells. **Eur J Immunol.** 2010; 40: 225-31.

BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. Experimentally induced infection by oral anaerobic micoorganisms in a mouse model. **Oral Micro Immun.** 1992; 7:253.

BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. Reactivity of IgG from explant cultures of periapical lesions with implicated microorganisms. **J Endod.** 1991; 17:207-12.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.** 2002; 16:6-21.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol.** 1993; 64:474-84.

BLOME, B. *et al.* Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real time polymerase chain reaction. **Oral Microbiology Immunology.** 2008; 23:384-90.

BOBETSIS, Y. A. *et al.* Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. **J Dent Res.** 2007; 86, 169-174.

BONILLA-HENAO, V. *et al.* Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN- γ in human lymphocytes. **J Leukoc Biol.** 2005; 78:1339-46.

BUCY, R. P. *et al.* Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. **J Exp Med.** 1994; 180:1251-62.

CARDOSO, F. P. *et al.* Methylation pattern of the IFN- γ gene in human dental pulp. **J Endod.** 2010; 36:642-46.

CARLOS, T. M.; JHARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood.** 1994; 84:2068-101.

CHÁVEZ DE PAZ, I. E. Redefining the persistence infection in root canals: possible role of biofilm communities. **J Endod.** 2007; 33:652-62.

CHEN, N. J.; HUANG, M. W.; HISEH, S. L. Enhanced secretion of IFN γ by activated Th1 cells occurs via reverse signaling through TNF-related activation-induced cytokine. **J Immunol.** 2001; 166:270-6.

CHENG, J. *et al.* Molecular Mechanisms of the Biphasic Effects of Interferon- γ on Osteoclastogenesis. **J Interferon Cytokine Res.** 2012; 32:34-45.

CHICOINE, E. *et al.* Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002; 297:765-72.

CHUGAL, N. *et al.* Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. **J Endod.** 2011; 37:1359-64.

COLIC, M. *et al.* Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Mol Immunol.** 2009; 47:101-13.

CYMERMAN, J. J. *et al.* Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. **J Endod.** 1984; 10:9-11.

DAHLE, U. R.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Observation of an unusually large spirochete in endodontic infection. **Oral Microbiol Immunol.** 1993; 8:251-3.

DAI, R. *et al.* Suppression of LPS-induced Interferon- γ and nitric oxide in splenic mechanism of immune modulation lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune regulation. **Blood.** 2008; 112:4591-97.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Ann N Y Acad Sci.** 1988; 546:122-32.

DONG, R.; ZHAO, R.; ZHENG, S. Changes in epigenetic regulation of CD4⁺ T lymphocytes in biliary atresia. **Pediatr Res.** 2011; 70:555-9.

EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature.** 2004; 429:457-63.

ENG. C.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. A bird's eye view of global methylation. **Nat Genet.** 2000; 24:101-2.

ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene.** 2002; 21:5427-40.

FABRICIUS, L. *et al.* Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canal after varied times of closure. **Scand J Dent Res.** 1982; 90:134-44.

FARIAS, L. C. *et al.* Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma. **BMC Clin Pathol.** 2012; 12:11.

FAZZARI, M. J.; GREALLY, J. M. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nature Rev Gen.** 2004; 5:446-455.

FEUERER, M. *et al.* Self-Limitation of Th1-Mediated Inflammation by IFN- γ . **J Immunol.** 2006; 176:2857-63.

FIGDOR, D.; SUNDQVIST, G. A big role for the very small-understanding the endodontic microbial flora. **Aust Dent J.** 2007; 52:S38-51.

FORMIGLI, L. *et al.* Osteolytic processes in human radicular cysts: morphological and biochemical results. **J Oral Pathol Med.** 1995; 24:216-20.

FRENCH, S. W. *et al.* DNA methylation profiling: a new tool for evaluating hematologic malignancies. **Clin Immunol.** 2002; 103:217-230.

FUKATA, S. Y. *et al.* Factors involved in the t helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbial Immunol.** 2009; 24:25-31.

GALLEGO, R.D. *et al.* Differential diagnosis and therapeutic approach to periapical cysts in daily dental practice. **Med Oral.** 2002; 7: 54-8.

GAO, Y. *et al.* IFN- γ stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. **J Clin Invest.** 2007; 117:122-32.

GAO, Z.; FLAITSZ, C. M.; MACKENZIE, I. C. Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. **J Dent Res.** 1996; 75:1658-63

GAO, Z. *et al.* Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. **J Oral Pathol.** 1988; 17: 84-90.

GOMES, C. C. *et al.* Impact of WWOX alterations on p73, Δ Np73, p53, cell proliferation and DNA ploidy in salivary gland neoplasms. **Oral Dis.** 2011; 17:564-71.

GÓMEZ-URIZ, A.M. *et al.* Epigenetic patterns of two gene promoters (TNF- α and PON) in stroke considering obesity condition and dietary intake. **J Physiol Biochem.** 2014.

- GONSKY, R. *et al.* Distinct methylation of IFNG in the gut. **J Interferon Cytokine Res.** 2009; 29:407-14.
- GOODMAN, G. *et al.* Interferon-alpha, unlike interferon-gamma, does not cause bone loss in the rat. **Bone.** 1999; 25:459-63.
- GOWEN, M.; NEDWIN, G. E.; MUNDY, G. R. Preferential inhibition of cytokine-stimulated bone resorption by recombinant interferon-gamma. **J Bone Miner Res.** 1986; 1:469-74.
- GRØNBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS.** 2007; 115(10):1039-59.
- HAHN, C.; BEST, A. M.; TEW, J. G. Cytokine Induction by Streptococcus mutans and Pulpal Pathogenesis. **Infection and Immunity.** 2000; 68:6785-9.
- HASEGAWA, M. *et al.* Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. **Oncogene.** 2002; 21:4231-6.
- HERMANN, A., GOWHER, H., JELTSCH, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell Mol Life Sci.** 2004; 61:2571-87.
- HSIEH, C.L. Dynamics of DNA methylation pattern. **Curr Opin Genet Dev.** 2000; 10:224-8.
- HUANG, W.; O'KEEFE, R. J.; SCHWARZ E. M. Exposure to receptor activator of NFkappaB ligand renders pre-osteoclasts resistant to IFN-gamma by inducing terminal differentiation. **Arthritis Res Ther.** 2003; 5:49-59.
- HUFFAKER, T. B. *et al.* Epistasis between MicroRNAs 155 and 146a during T Cell-Mediated Antitumor Immunity. **Cell Reports.** 2012; 27:1697-1709.
- JENUWEIN, T. e ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science.** 2001; 293:1074-1080.
- JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet.** 1999; 21:163-167.
- JUEDES, A. E. *et al.* T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes. **J Exp Med.** 2004; 199:1153-62.
- KABASHIMA, H. *et al.* Presence of IFN-gamma and IL-4 in human periapical granulation tissues and regeneration tissues. **Cytokine.** 2001; 14:289-93.
- KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1965; 20:340-9.

KANG, G. H. *et al.* Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastric, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. **Am J Pathol.** 2003; 163:1551-6.

KAWASHIMA, N. *et al.* Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **J Endod.** 1996; 22:311-6

KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Arch Oral Biol.** 1999; 44:55-66.

KETTERING, J. D.; TORABINEJAD, M.; JONES, S. L. Specificity of antibodies present in human periapical lesions. **J Endod.** 1991; 17:213-6.

KOHARA, H. *et al.* IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. **Immunol Lett.** 2011; 137: 53-61.

KOHARA, H. *et al.* Inhibitory Effect of interferon-gamma on experimental tooth movement in mice. **J Interferon Cytokine Res.** 2012; 32:428-31.

KOHLI, A. *et al.* Secondhand smoke in combination with ambient air pollution exposure is associated with increased CpG methylation and decreased expression of IFN- γ in T effector cells and Foxp3 in T regulatory cells in children. **Clinical Epigenetics.** 2012; 4:17.

KOPP, W.; SCHWARTING, R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. **J Endod.** 1989; 15:72-5.

KOTAKE, S. *et al.* IFN- γ -producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. **Eur J Immunol.** 2005; 35:3353-63.

KUSUMI, A. *et al.* High IL-6 synthesis in cultured fibroblasts isolated from radicular cysts. **Arch Oral Biol.** 2004; 49:643-52.

KWON, N. H. *et al.* DNA methylation and expression of IL-4 and IFN-g gene promoter genes in patients with bronchial asthma. **J. Clin. Immunol.** 2008; 28, 139-46.

LIN, L. M. *et al.* Detection of epidermal growth factor in inflammatory periapical lesions. **Int Endod.** 1996; 29:179-84.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods.** 2001; 25:402-8.

LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clin Infect Dis.** 1993; Jun;16 Suppl 4: S203-10.

LUCSAK, M.W.; JAGODZIŃSKI, P. P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochem Cytobiol.** 2006; 44:143-54.

MADYASTHA, P. R. *et al.* IFN γ enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production. **J Interferon Cytokine Res.** 2000; 20:645-52.

MAEDA, L. *et al.* Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma-interferon. **Cell Immunol.** 1994; 157:448-61.

MANN, G. N. *et al.* Interferon-gamma causes loss of bone volume in vivo and fails to ameliorate cyclosporine and induced osteopenia. **Endocrinology.** 1994; 135:1077-83.

MARIN, B. *et al.* Nuevos enfoques em cirurgia perirradicular: revisión de la literatura. **Rev. Fac. Odontol. Antioquia.** 2000; 11:37-46.

MARTON, I. J. *et al.* The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1993; 8:254-7.

MARTON, I. J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15:139-50.

MATSUO, T. *et al.* Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. **J Endod.** 1994; 20:432-5.

MENEZES, R. *et al.* The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. **J Endod.** 2008; 34:1480-4.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.** 2000; 16:1-8.

MIKOVITS, J. A. *et al.* Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma-interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. **Mol Cell Biol.** 1998; 18:5166-77.

MORIKAWAA, H. *et al.* Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. **PNAS.** 2014; 111: 5289-94.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T cell subsets Th1, Th2 and more. **Immunol Today.** 1996; 17:138-146.

MUNSON, M. A. *et al.* Molecular and cultural of the microflora associated with endodontic infections. **J Dent Res.** 2002; 8:761-6.

MURPHY, W. J. *et al.* Synergistic anti-tumor responses after administration of agonistic antibodies to CD40 and IL-2: coordination of dendritic and CD8+ cell responses. **J Immunol.** 2003; 158:5501-6.

NAIR, P. N. R.; SCHROEDER, H. E. Epithelial attachment at diseased human tooth-apex. **J Periodontal Res.** 1985; 20:293-300.

NAIR, P. N. R. *et al.* Microbial status of apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2005; 99:231-52.

NAIR, P. N. R.; PAJAROLA, G.; SCHROEDER, H. E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1996; 81:93-102.

NAIR, P. N. R.; SUNDQVIST, G.; SJÖGREN, U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008; 106:294-303.

NAIR, P. N. R. Light and electron microscopic studies on root canal flora and periapical lesions. **J Endod.** 1987; 13:29-39.

NAIR, P. N. R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2004; 15:348-81.

NAIR, P. N. R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol.** 2000 1997; 13:121-48.

NEAVERTH, E. J.; BURG, H. A. Decompression of large periapical cyst and granulomas. **Oral Surg.** 1982; 57:82-94.

NEVILLE, B. W. *et al.* **Patologia oral e maxilo facial.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 144-420.

NILE, C. J. *et al.* Methylation Status of a Single CpG Site in the IL6 Promoter Is Related to IL6 Messenger RNA Levels and Rheumatoid Arthritis. **ARTHRITIS & RHEUMATISM.** 2008; 58:2686-93.

OFFENBACHER, S. *et al.* Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. **J Periodontol.** 2007; 78:1911–25.

OKIJI, T. *et al.* Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. **J Endod.** 1994; 20:27–31.

PANG, Y. *et al.* Interferon-gamma gene expression in human B-cell lines: induction by interleukin-2, protein kinase C activators, and possible effect of hypomethylation on gene regulation. **Blood.** 1992; 80:724–32.

PARK, J. S. *et al.* Interleukin-27 suppresses osteoclastogenesis via induction of interferon- γ . 2012. Accepted Article.

PEIXOTO, R. F. *et al.* Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch Oral Biol.** 2012; 57:1159-64.

PENNICA, D. *et al.* Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**. 1984; 312:724-9.

PIATELLI, A. *et al.* Imune cells in periapical granuloma: morphological and imunohistochemical characterization. **J Endod**. 1991; 17:26-29.

PION, M. *et al.* HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the Foxp3 gene. **AIDS**. 2013; 27:2019-29.

PROVENÇAL, N. *et al.* Differential DNA Methylation Regions in Cytokine and Transcription Factor Genomic Loci Associate with Childhood Physical Aggression. **PLOS one**. 2013; 8:1-19.

RALSTON, S. H. *et al.* Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **J Bone Miner Res**. 1995; 10:1040-9.

RHO, J. *et al.* Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray analysis. **DNA Cell Biol**. 2002; 21:541-9.

RIANCHO, J. A. *et al.* Effects of interleukin-4 on human osteoblast-like cells. **Bone Mineral**. 1993; 21:53-61.

RIBEIRO, A. C. *et al.* Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. **J Endod**. 2011; 37:922-6.

RICHARDSON, B. Impact of aging on DNA methylation. **Ageing Res Rev**. 2003; 2:245-61.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to phatologic conditions and treatment procedures. **J Endod**. 2010; 36:1-15.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. **J Clin Microbiol**. 2008; 46:3599-3606.

ROCHA, M. M. N. P. *et al.* Estudo bacteriológico de lesões periapicais. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 215-223, jul/set. 1998.

ROSENBERG, P. A. *et al.* Evaluation of pathologists (histopathology) and radiologists (Cone Beam Computed Tomography) differentiating radicular cysts from granulomas. **J Endod**. 2010; 36:423-8.

RUSH, L. J.; PLASS, C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. **Cancer Letters**. 2002; 185:1-12.

SANT'ANA FILHO, M.; RADOS, P. V. Lesões apicais. In: **Exodontia**, de José Omar Lopes da Silveira e Gilson Correia Beltrão. Porto Alegre: Missau, 1998. Cap. 22, p. 275-85.

SANTOS, A. L. *et al.* Comparing the bacterial Diversity of acute and chronic dental root canal infections. **PLoS ONE**. 2011; 6:1-8.

SASAKI, H. *et al.* Gamma-Interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (Il-12) and Il-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2004; 11:106-10.

SATO, K. *et al.* Prolonged decrease of serum calcium concentration by murine gamma-interferon in hypercalcemic, human tumor (EC-GI)-bearing nude mice. **Cancer Res**. 1992; 52:444-9.

SATO, T. *et al.* Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals. **Int J Den**. 2012; 2012:1-5.

SCHRODER, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**. 2004; 75:163-189.

SEN, B. H.; PISKIN, B.; DEMIRCI, T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endod Dent Traumatol**. 1995; 11:6-9.

SHAH, N. Nonsurgical management of periapical lesions: a prospective study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1988; 66: 365-71.

SIMON, H. S. *et al.* Differential Diagnosis of Large Periapical Lesions Using Cone-Beam Computed Tomography Measurements and Biopsy. **J Endod**. 2006; 36:833-7.

SIMON, J. H. S. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. **J Endod**. 1980; 6:845-8.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. **Blood**. 1999; 93:4059-70

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. *et al.* Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J Endod**. 2001; 27:563.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. e LOPES, H. P. Patologia da polpa e dos tecidos perirradiculares. In: **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. Cap. 2, p. 13-60.

STASHENKO, P. *et al.* Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. **J Immunol**. 1987; 138:1464-8.

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

STASHENKO, P.; YU, S. M. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. **J Dent Res.** 1989; 68:830-4.

STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.** 1990; 6:89-96.

STERN, M. H. *et al.* Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. **J Endod.** 1981; 7:117-22.

SUN, L. *et al.* The promoter region of interferon-gamma is hypermethylated in neonatal foals and its demethylation is associated with increased gene expression. **Dev Comp Immunol.** 2012.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod.** 1992; 18:427-30.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1994; 78:522-30.

TAKAYANAGI, H. *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. **Nature.** 2000; 408:600-5.

TAKEICHI, O. *et al.* Inducible nitric oxide synthase activity by interferon- γ producing cells in human radicular cysts. **Int Endod J.** 1999; 32:124-30.

TANI-ISHII, N. *et al.* Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol.** 1994; 9:129-35.

TEIXEIRA-SALUM, T. B. *et al.* Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **J Oral Pathol Med.** 2010; 39:250-6.

TERONEN, O. *et al.* Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. **Eur J Oral Sci.** 1995; 103:141-7.

THOKIN, M. *et al.* Comparative study of inhibitory effects by murine interferon-gamma and a new bisphosphonate (alendronate) in hypercalcemic, nude mice bearing human tumor (LJC-1-JCK). **Cancer Immunol Immunother.** 1994; 39:155-60.

TOLLER, P. A. The osmolarity of fluids from cysts of the jaws. **Br Dent J.** 1970; 129:275-8.

TORABINEJAD, M.; BAKLAND, L. K. Immunopathogenesis of chronic periapical lesions. A review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1978; 46: 685-99.

TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. D. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. **J Endod.** 1985; 11:122-5.

TROTTA, R. *et al.* miR 155 regulates IFN- γ production in natural killer cells. **Immunobiology.** 2012; 119:3478-85.

TSURUMACHI, T.; SAITO, T. Treatment of large periapical lesions by inserting a drainage tube into the root canal. **Endod Dent Traumatol**. 1995; 11: 41-6.

VIANA, M. B. *et al.* Methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in periodontal tissues. **Immunobiology**. 2011; 216:936-41.

VUILLERMIN, P. J. *et al.* Microbial exposure, interferon-gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. **Allergy**. 2009; 64: 348-53.

WALKER, K. F. *et al.* Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. **Eur J Oral Sci**. 2000; 108:195-201.

WALKER, R.A. Quantification of Immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. **Histopathology**. 2006; 49:406-10.

WALTIMO, T. *et al.* Examination on *Candida* spp. in refractory periapical granulomas. **Int Endod J**. 2003; 36:643-7.

WALTON, R. E.; ARDJMAND, K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. **J Endod**. 1992; 18:216-27.

WANG, C. Y, STASHENKO, P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. **Oral Microbiol Immunol**. 1993; 8:50-6.

WATANABE, K. *et al.* Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. **Biochem Biophys Res Commun**. 1990; 172:1035.

WAYMAN, B. E. *et al.* A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. **J Endod**. 1992; 18:152-5.

XIE, Q. W. *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**. 1992; 256:225-8.

XIE, Q. W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. **J Exp Med**. 1993; 177:1779-84.

YIN, L.; CHUNG, W. O. Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. **Mucosal Immunol**. 2011; 4: 409-19.

ZHANG, S. *et al.* Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2010; 37:953-61.

ANEXO 1 - PROJETO CAAE - 0462.0.203.000-11 COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE - 0462.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia
Odontológica
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 05 de outubro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Influência de fatores epigenéticos sobre a expressão do interferon gamma nas lesões de granuloma dentário e cisto peripical** " bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

APÊNDICE 1 - TERMO DE ESCLARECIMENTO/CONSENTIMENTO DESTINADO A ADOLESCENTES (13 A 18 ANOS), QUE POSSUEM DENTE COM LESÃO PERIAPICAL E EXTRAÇÃO INDICADA

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa **“Influência de fatores epigenéticos sobre a expressão do interferon-gamma nas lesões de granuloma dentário e cisto radicular”**.

As doenças inflamatórias da região próxima à raiz do dente são influenciadas pela agressividade e pelo número de microrganismos que invadem essa área, além da dinâmica das respostas do organismo a essa agressão. Essa interação entre os microrganismos e as respostas do organismo agredido determina os diferentes tipos de alterações que podem se estabelecer. As lesões da região próxima à raiz do dente são doenças inflamatórias que evoluem com períodos de exacerbação e remissão e exibem manifestações clínicas e radiográficas.

Alterações genéticas e epigenéticas podem estar associadas ao desenvolvimento dessas lesões. Essa doença produz a perda óssea, que pode evoluir, levando à perda das estruturas de suporte do dente e levar à perda dentária e comprometimento da saúde geral. No entanto, pouco se conhece sobre a influência de alterações epigenéticas no desenvolvimento da doença.

Para este estudo, será necessário remover a lesão que se encontra próxima à raiz do dente a ser extraído. Trata-se de procedimento necessário após a exodontia de um dente com lesão nessa região. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino.

Estamos à sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os processos envolvidos na formação da lesão na região próxima à raiz do dente e isso será muito

importante para que possamos prevenir o seu desenvolvimento e melhorar o tratamento da doença que pode levar a perdas dentárias.

Ricardo Santiago Gomez (Orientador)

Kelma Campos (Pesquisador)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta da lesão periapical, que já será removida por motivo de cirurgia de extração dentária. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

Local: _____

Data: ___/___/___

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/Kelma Campos – Tel.: (31) 3409-2477

Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º Andar – Sala 2005

Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Belo Horizonte/MG

Tel.: (31) 3409-4592

APÊNDICE 2 - TERMO DE ESCLARECIMENTO/CONSENTIMENTO DESTINADO A INDIVÍDUOS MAIORES DE 18 ANOS, QUE POSSUEM DENTE COM LESÃO PERIAPICAL E EXTRAÇÃO INDICADA

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa **“Influência de fatores epigenéticos sobre a expressão do interferon-gamma nas lesões de granuloma dentário e cisto radicular”**.

As doenças inflamatórias da região próxima à raiz do dente são influenciadas pela agressividade e pelo número de microrganismos que invadem essa área, além da dinâmica das respostas do organismo a essa agressão. Essa interação entre os microrganismos e as respostas do organismo agredido determina os diferentes tipos de alterações que podem se estabelecer. As lesões da região próxima à raiz do dente são doenças inflamatórias que evoluem com períodos de exacerbação e remissão e exibem manifestações clínicas e radiográficas.

Alterações genéticas e epigenéticas podem estar associadas ao desenvolvimento dessas lesões. Essa doença produz a perda óssea, que pode evoluir, levando à perda das estruturas de suporte do dente e levar à perda dentária e comprometimento da saúde geral. No entanto, pouco se conhece sobre a influência de alterações epigenéticas no desenvolvimento da doença.

Para este estudo, será necessário remover a lesão que se encontra próxima à raiz do dente a ser extraído. Trata-se de procedimento necessário após a exodontia de um dente com lesão nessa região. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino.

Estamos à sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os processos envolvidos na formação da lesão na região próxima à raiz do dente e isso será muito

importante para que possamos prevenir o seu desenvolvimento e melhorar o tratamento da doença que pode levar a perdas dentárias.

Ricardo Santiago Gomez (Orientador)

Kelma Campos (Pesquisador)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta da lesão periapical, que já será removida por motivo de cirurgia de extração dentária. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

Local: _____

Data: ___/___/___

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/Kelma Campos – Tel.: (31) 3409-2477

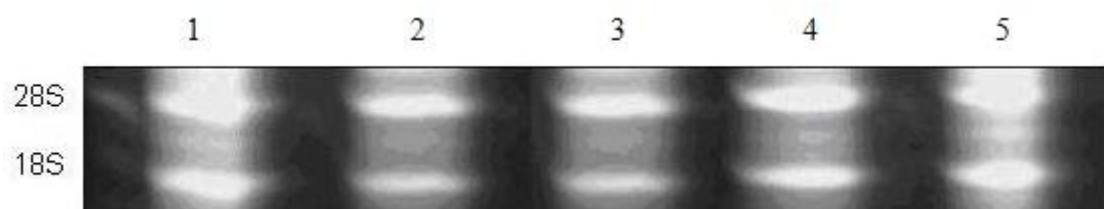
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º Andar – Sala 2005

Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Belo Horizonte/MG

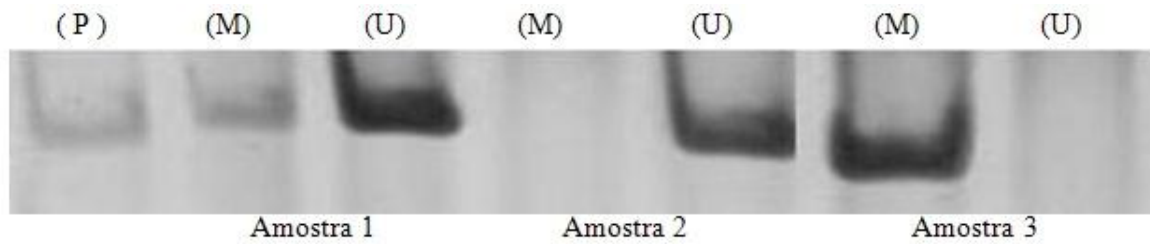
Tel.: (31) 3409-4592

APÊNDICE 3 - GEL DE AGAROSE PARA VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA EM AMOSTRAS DE LESÃO PERIAPICAL



As colunas 1 a 5 representam amostras de RNA de lesões periapicais e as bandas 18S e 28S correspondem às subunidades do RNA ribossomal.

APÊNDICE 4 - GEL DE POLIACRILAMIDA PARA VERIFICAR O PADRÃO DE METILAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LESÃO PERIAPICAL



Análise do padrão de metilação do gene *IFNG* em amostras de lesões periapicais de granuloma periapical e cisto radicular, onde P = Padrão, M = amplificação somente para *primer* específico para DNA metilado (180 Pb) e U = amplificação somente para *primer* específico para DNA não metilado (183 Pb). Nas amostras parcialmente metiladas, havia amplificação tanto para o *primer* para DNA não metilado, quanto para o *primer* para DNA metilado.